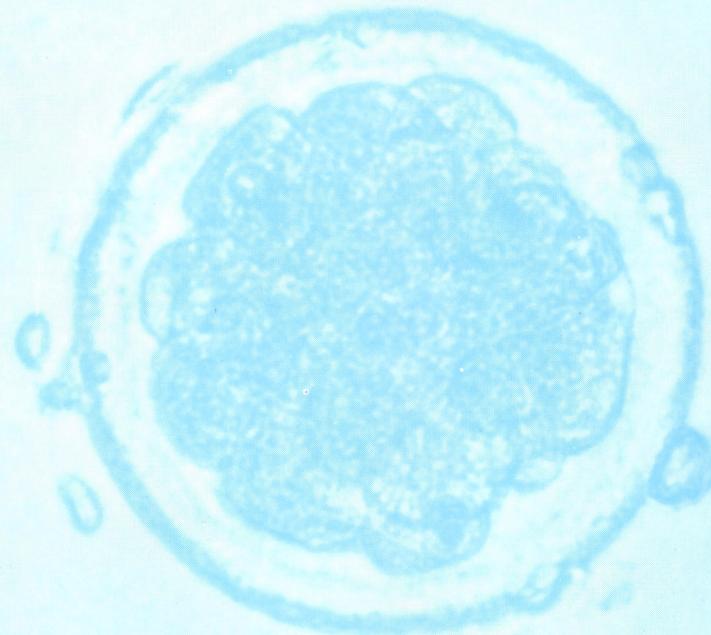


哺乳動物卵子研究会誌

Journal of Mammalian Ova Research



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

Vol. 7 No. 2

October 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

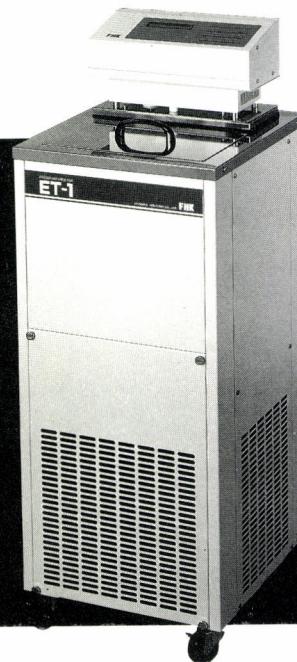
提携
帝国臓器製薬株式会社

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専用の植氷・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	A.C100V 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 ファクシミリ(03)812-3663

第32回 哺乳動物卵子学会開催のお知らせ

第32回 哺乳動物卵子学会

大 会 長 豊 田 裕

下記により第32回哺乳動物卵子学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3年4月27日(土) 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、哺乳動物卵子学会誌第8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、会場の都合などで一部示説発表をお願いすることもありますのでご了承下さい。

○演題申込：締切 平成3年1月31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3年2月28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

哺乳動物卵子研究会誌

第7卷2号

平成2年10月

目 次

原 著

- マウスの加齢に伴う卵母細胞の△⁵-3β-ヒドロキシステロイド脱水素酵素活性の変化（英文）
成田 成、新村末雄、石田一夫 55
- マウスの加齢に伴う卵母細胞の脂質含量の変化（英文）
成田 成、新村末雄、石田一夫 61
- 家兔の着床界面における胚盤胞および子宮内膜の走査型電顕像
戸津川 清、菅原七郎、正木淳二 66
- ガラス化法によるラット2細胞期胚の超低温保存
平林真澄、茶谷伸夫 72
- 集合マウス胚における移植後のSize Regulationに関する研究
中川 明、日野雅生、鈴木達行、菅 徹行 78
- 過排卵処理した各種系統マウスの交尾率と正常胚の回収数について
横山峯介・日置恭司 89

Journal of Mammalian Ova Research

Vol. 7 No. 2

October 1990

Contents

Originals

Age-related changes of Δ^5 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in mouse oocytes.

NARITA,A.,S.NIIMURA & K.ISHIDA 55

Age-related changes in the amount of lipids in mouse oocytes.

NARITA,A.,S.NIIMURA & K.ISHIDA 61

Scanning electron microscopy on rabbit blastocyst and endometrium during implantation stages.

TOTSUKAWA,K.,S.SUGAWARA & J.MASAKI 66

Low temperature storage of rat 2-cell embryos by vitrification.

HIRABAYASHI,M. & N.CHAYA 72

Size regulation of aggregated mouse embryos in postimplantation.

NAKAGAWA,A.,M.HINO,T.SUZUKI & T.SUGA 78

The copulation rate and the embryo recovery rate following induced superovulation in various strains of mice.

YOKOYAMA,M. and K. HIOKI 89

Age-Related Changes
of Δ^5 -3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase
Activity in Mouse Oocytes

Akira NARITA*, Sueo NIIMURA and Kazuo ISHIDA

*Graduate School of Science and Technology,
Niigata University, Niigata-shi 950-21,
and Faculty of Agriculture, Niigata University,
Niigata-shi 950-21

Abstract: Age-related changes of Δ^5 -3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (Δ^5 -3 β -HSD) activity, using dehydroepiandrosterone as the substrate, were histochemically examined in the oocytes of 30-day-old, 60- to 90-day-old and 180- to 210-day-old mice. The activity was found in all the oocytes observed, and the percentage of the oocytes with a strong activity was significantly lower in 180- to 210-day-old mice than in 30- or 60- to 90-day-old mice. In order to ascertain whether Δ^5 -3 β -HSD activity in the oocytes of senescent animals is stimulated by gonadotrophins, as is in young animals, the activity in the oocytes of 180- to 210-day-old mice was detected after the oocytes were immersed in hCG-containing solutions. The percentage of the oocytes with a strong activity showed no significant differences between the percentage of the oocytes immersed in hCG-free solution. This result suggests that the oocytes of aged mice have lost sensitivity toward gonadotrophins.

Introduction

It had biochemically been proved that the blastocysts of rabbits, swine, cows and mares contain varied kinds of estrogens, androgens as well as progestins, and that they have ability to synthesize these hormones¹). In 1973 for the first time, Dickmann and Dey²) histochemically demonstrated Δ^5 -3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (Δ^5 -3 β -HSD) directly related in steroid biosynthesis in rat embryos at 4 to 6 days of pregnancy, and suggested that the embryos do have steroid synthesis, and that the steroids synthesized in the embryos play important roles in the transformation of morulae into blastocysts and in the control of implantation. More recently, different kinds of HSDs were histochemically demonstrated in the embryos of mice, guinea pigs, hamsters, Mongolian gerbils, rabbits, swine, sheep, cows and mares, suggesting that such mammalian embryos also have synthesizing ability of steroid hormones¹).

The oocytes, also, have histochemically been ascertained to have kinds of HSDs as in those in antral follicles of hamsters³), swine⁴), cows⁴), and mares⁴), suggesting the presence of synthesizing ability of estrogens, androgens and progestins in such oocytes as well as in embryos.

This investigation dealt with the comparison of the intensities of Δ^5 - 3β -HSD activity in the oocytes among mice of different ages in order to check age-related changes in the ability of steroid biosynthesis in the oocytes, and further with the effect of hCG on Δ^5 - 3β -HSD activity in the oocytes of senescent animals.

Materials and Methods

Thirty-four female mice of the ICR strain were normally kept and fed in a chamber (Koitotron, EA-8HW) at 24 °C, lit 14 hours a day 4 a.m. through 6 p.m. They were divided into three lots consisting each of about 10 animals; i.e. the mice of 30 days of age, 60 to 90 days and 180 to 210 days. All the oocytes were taken at 13 hours after hCG injection from the mice treated with superovulation, in which treatment 5 i.u. PMSG (Serotropin, Teikoku Hormone Manufacturing Co. Ltd., Tokyo, Japan) were peritoneally injected and 48 hours later, 5 i.u. hCG (Gonatropin, Teikoku Hormone Manufacturing Co. Ltd.). Naked oocytes, suspected to be abnormal, were excluded from the object of study.

For the demonstration of Δ^5 - 3β -HSD, the oocytes were incubated for 60 min at 37 °C in a substrate solution prepared according to the Dickmann and Dey method²), using dehydroepiandrosterone as the substrate. As the histochemical reaction of Δ^5 - 3β -HSD depends upon the reaction of NADH₂ dehydrogenase (NADH₂-DH)⁵), the demonstration of NADH₂-DH was also carried out using the Barka and Anderson method⁶). As controls, some oocytes were incubated in substrate-free solution.

In order to examine whether the Δ^5 - 3β -HSD activity in the oocytes of aged animals is stimulated by gonadotrophins, the oocytes taken from 180- to 210-day-old mice were preimmersed for 30 min in 0.1 M phosphate buffer solutions (pH 7.4) at 37 °C, the solutions containing 5, 50 and 100 i.u. of hCG per 1 ml respectively.

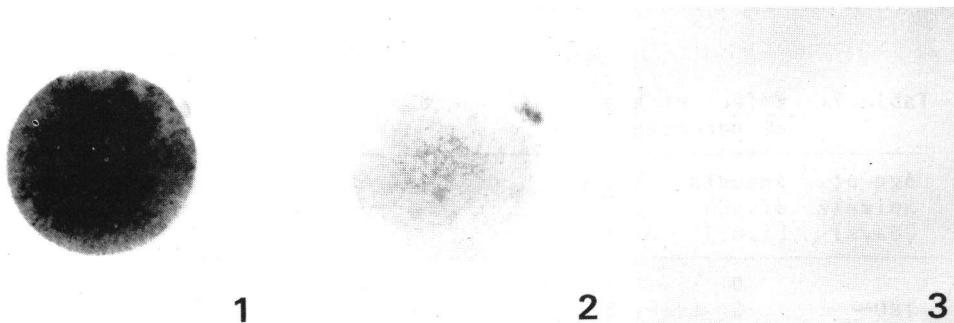
After incubation in the substrate solutions, the oocytes were placed in the center of four vaseline spots on a slide. A cover slip was then carefully placed on the vaseline spots and pressed gently to anchor the oocytes between the cover slip and the slide.

A statistical analysis was carried out on the percentages of the oocytes in each age group, using the t test after the angle transformation.

Results

When incubated in a substrate solution, the oocytes from the mice of different ages always showed diformazan granules in their cytoplasm (Figs. 1 and 2). Since diformazan granules did not appear when incubated in a substrate-free solution (Fig. 3), it was confirmed that such granules represented Δ^5 - 3β -HSD activity; a small amount of such indicating a weak activity, and a large

amount a strong activity. Moderate to strong NADH₂-DH activity also was found in the cytoplasm of all the oocytes observed.



Explanation of Figures

Microphotographs of oocytes obtained from 30-day-old mice, 13 hrs after hCG injection. Dickmann and Dey method. $\times 200$.

Fig. 1. An oocyte showing a strong Δ^5 - 3β -HSD activity.

Fig. 2. An oocyte showing a weak Δ^5 - 3β -HSD activity.

Fig. 3. A control oocyte showing no Δ^5 - 3β -HSD activity.

The results obtained about the intensity of Δ^5 - 3β -HSD activity in the oocytes from the mice at different ages are given in Table 1. As shown in Table 1, the percentage of oocytes showing strong activities was 62.9 among 30-day-old mice, 63.4 among 60- to 90-day-old mice, and 36.2 among 180- to 210-day-old mice. The percentage among 180- to 210-day-old mice was significantly lower than that among 30- and 60- to 90-day-old mice ($P < 0.01$).

Table 1. Δ^5 - 3β -HSD activity in mouse oocytes of varied age groups

Age groups (days)	No. of oocytes observed*	No. (%) of oocytes showing the activity	
		Weak	Strong
30	97	36 (37.1) ^a	61 (62.9) ^c
60~90	153	56 (36.6) ^b	97 (63.4) ^d
180~210	105	67 (63.8) ^{a,b}	38 (36.2) ^{c,d}

* 13 hrs after hCG injection

Significant differences are seen between the percentages superscribed with same letters (a, b, c, d; $P < 0.01$).

The results obtained about the effect of hCG on the intensity of Δ^5 - 3β -HSD activity in the oocytes of senescent mice are given in Table 2. As shown in Table 2, the percentage of oocytes with strong activities was 34.8 when immersed in hCG-free solution, 34.6 immersed in 5 i.u. hCG-containing solution, 33.3 immersed in 50 i.u. hCG-containing solution, and 35.3 immersed in 100 i.u. hCG-

containing solution. Thus, concerning the oocytes from senescent mice, there were no significant differences among the percentages of oocytes with strong activities either immersed in hCG-free solution or in solutions of different concentrations of hCG.

Table 2. Effect of hCG on Δ^5 - 3β -HSD activity in oocytes of senescent mice

Age of animals [days]	Amounts of hCG [i.u.]	No. of oocytes examined*	No. (%) of oocytes showing the activity	
			Weak	Strong
180~ 210	0	66	43(65.2)	23(34.8)
	5	52	34(65.4)	18(34.6)
	50	57	38(66.7)	19(33.3)
	100	68	44(64.7)	24(35.3)

* 13 hrs after hCG injection

Discussion

From the results of present investigation, that is, the percentage of the oocytes with a strong Δ^5 - 3β -HSD activity being significantly lower in 180- to 210-day-old mice than in 30- or 60- to 90-day-old mice, it may be concluded that steroid-synthesizing ability in the oocytes in senescent animals tends to be lower when compared to that in the oocytes of immature and mature animals. It had biochemically been shown that, with the advance of animals' ages, the Δ^5 - 3β -HSD activity of mouse ovaries⁷⁾ and adrenals⁸⁾, and of rat testes⁹⁾ became lower. From these facts, it can be concluded that the lowering of steroid-synthesizing ability in cells, tissues or organs of senescent animals is a common phenomenon.

Niimura and Ishida¹⁰⁾ reported that pronuclear eggs from mature hamsters showed a higher activity of Δ^5 - 3β -HSD when immersed in hCG-containing solutions than in hCG-free solution. In the present investigation, however, the Δ^5 - 3β -HSD activity in the oocytes from senescent mice did not rise even when preimmersed in hCG-containing solutions. On the other hand, Parkening et al.^{11, 12)} reported that the amounts of FSH and LH in the serum of senescent mice were significantly larger than those in the serum of young mice either at estrus or diestrus.

Considering from these results¹⁰⁻¹²⁾, present investigation that proved of no effect of hCG on the steroid-synthesizing ability in the oocytes of senescent mice should suggest the loss of sensitivity in the oocytes of senescent animals toward gonadotrophins.

References

- 1) Niimura, S. and Ishida, K. (1989). Morphological and histochemical characteristics of the mammalian egg. In *Progress in Veterinary Science*, Edited by Izawa, H., Shimizu, Y., Mikami, S., Takahashi, M., Goto, N., Kamiya, M., Mituoka, T., Mikami, T., Ueda, Y., Kojima, Y. and Too, K., Tokyo, Kindai Press, P. 148.
- 2) Dickmann, Z. and Dey, S.K. (1973). Two theories: the pre-implantation embryo is a source of steroid hormones controlling (1) molura-blastocyst transformation, and (2) implantation. *J. Reprod. Fert.*, 35, 615-617.
- 3) Niimura, S., Sasaki, H. and Ishida, K. (1980). Histochemical studies on steroid synthesis in follicular eggs of the hamster. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 51, 192-196.
- 4) Niimura, S. and Ishida, K. (1983). Histochemical demonstration of hydroxysteroid dehydrogenases in the oocytes in antral follicles of pigs, cattle and horses. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 29, 150-153.
- 5) Baillie, A.H., Ferguson, M.M. and Hart, D.McK. (1966). *Developments in Steroid Histochemistry*, London and New York, Academic Press, P. 1.
- 6) Barka, T. and Anderson, P.J. (1965). *Histochemistry*, New York, Evanston and London, Hoeber Medical Division, Harper and Row, Publishers, Inc., P.296.
- 7) Wehrenberg, W.B., Gottlieb, S.F. and Albrecht, E.D. (1976). Aging and ovarian Δ^5 - 3β -hydroxysteroid dehydrogenase in the pregnant mouse. *J. Endocr.*, 70, 183-187.
- 8) Albrecht, E.D., Koos, R.D. and Wehrenberg, W.B. (1977). Aging and adrenal Δ^5 - 3β -hydroxysteroid dehydrogenase in female mouse. *J. Endocr.*, 70, 183-187.
- 9) Leathem, J.H. and Albrecht, E.D. (1974). Effect of age on testis Δ^5 - 3β -hydroxysteroid dehydrogenase in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 145, 1212-1214.
- 10) Niimura, S. and Ishida, K. (1979). Histochemical observations on the effects of HCG and prolactin on the hydroxysteroid dehydrogenase activities in hamster eggs. *Jpn. J. Anim Reprod.*, 25, 126-130.
- 11) Parkening, T.A., Collins, T.J. and Smith, E.R. (1980). Plasma and pituitary concentrations of LH, FSH and prolactin in aged female C57BL/6 mice. *J. Reprod. Fert.*, 58, 377-386.
- 12) Parkening, T.A., Collins, T.J. and Smith, E.R. (1982). Luteinizing hormone levels in aged female laboratory rodents as measured by a radioimmunoassay and a radioreceptor assay. *J. Endocr.*, 95, 417-422.

マウスの加齢に伴う卵母細胞の
 $\Delta^5\text{-}3\beta\text{-ヒドロキシステロイド脱水素酵素活性}$ の変化

*成田 成・新村末雄・石田一夫

*新潟大学大学院自然科学研究科, 新潟市 950-21

新潟大学農学部, 新潟市 950-21

30日齢、60～90日齢および180～210日齢のマウスから採取した排卵直後の卵母細胞について、 $\Delta^5\text{-}3\beta\text{-ヒドロキシステロイド脱水素酵素}$ ($\Delta^5\text{-}3\beta\text{-HSD}$, 基質にdehydroepiandrosteroneを使用) 活性を組織化学的に比較した。その結果、どの日齢においても、この酵素活性は観察したすべての卵母細胞に認められたが、強い活性を示す卵母細胞の割合は180～210日齢の動物のもので他の日齢の動物のものより有意に低かった。また、180～210日齢のマウスの卵母細胞については、hCG を含む液に浸漬後、 $\Delta^5\text{-}3\beta\text{-HSD}$ 活性を観察したが、強い活性を示す卵母細胞の割合に増加はみられず、hCG を含まない液に浸漬した卵母細胞のものと差がなかった。したがって、高齢動物の卵母細胞のステロイド合成能は低下しており、この原因として卵母細胞のゴナドトロビンに対する感受性の低下が考えられた。

Age-Related Changes
in the Amount of Lipids in Mouse Oocytes

Akira NARITA*, Sueo NIIMURA and Kazuo ISHIDA

*Graduate School of Science and Technology,
Niigata University, Niigata-shi 950-21,
and Faculty of Agriculture, Niigata University,
Niigata-shi 950-21

Abstract: Using mice of the ICR strain, sudsanophilic lipids, lipoids and neutral fats were histochemically detected in the oocytes immediately after ovulation, and the amounts were compared among 30-day-old, 60- to 90-day-old and 180- to 210-day-old ones. Sudan IV-positive lipids and Ciaccio-positive lipoids were demonstrated in all the oocytes as droplets of different sizes, showing no significant difference among different age groups. Concerning nile blue sulfate-positive neutral fats observed as droplets of varied sizes, none was detected in the oocytes of 30-day-old mice, but came to appear in 1.0 % of the oocytes from 60- to 90-day-old mice, and extended to 6.3 % of those from 180- to 210-day-old mice, even showing a significant difference between 180- to 210-day-old mice and 30-day-old or 60- to 90-day-old mice. These results show that neutral fats in mouse oocytes first come to exist when the animals become mature, and the percentages of neutral fat-containing oocytes tend to be higher with the advance of animals' ages; while the amounts of sudsanophilic lipids and lipoids do not change with aging.

Introduction

It is a well-known fact that mammalian oocytes and early embryos usually have either one, two or all of such inclusions; proteinous structures^{1, 2)}, glycogen granules³⁻⁸⁾ and lipid droplets⁹⁻¹²⁾. As for mouse oocytes and early embryos, it is ascertained that they possess all the inclusions described above. It is also said, in general, that these inclusions gradually get accumulated while the eggs are growing as oocytes, and then are utilized as energy sources in the course of embryonic development^{1, 4, 6, 7, 10)}.

As for age-related changes of such inclusions in mammalian oocytes and early embryos, Narita et al.^{13, 14)} observed proteinous structures and glycogen granules in mouse oocytes, and Parkening and Soderwall⁸⁾ examined glycogen granules in hamster blastocysts. Generalizing the above mentioned investigations, an increase of proteinous structures and a decrease of glycogen granules are observed in mouse oocytes^{13, 14)}, while no fluctuation was seen in the amount of glycogen granules in hamster blastocysts⁸⁾. But, no one has studied age-related changes in the amount of lipids contained in mammalian oocytes and early embryos.

This histochemical investigation dealt with age-related changes in the amounts of sudanophilic lipids (lipids in general), lipoids and neutral fats in the mouse oocytes immediately after ovulation.

Materials and Methods

Seventy two female mice of the ICR strain were used in this study out of three age groups of 30-day-old, 60- to 90-day-old and 180- to 210-day-old animals. They were fed in cages in a room at 24 °C and lit 14 hours a day, 4 a.m. through 6 p.m. They were superovulated with 5 i.u. PMSG (Serotropin, Teikoku Hormone Manufacturing Co. Ltd., Tokyo, Japan), and 48 hours later with 5 i.u. hCG (Gonatropin, Teikoku Hormone Manufacturing Co. Ltd.). In order to detect general lipids, as well as neutral fats, the oocytes were collected at 13 hours after hCG injection by tearing oviducts in a 0.1 M phosphate buffer solution (pH 7.4), and then fixed in a 10 % formalin phosphate buffer solution (pH 7.4); while to detect lipoids, the oviducts were taken at 13 hours after hCG injection, and then were fixed in a solution composed of 8 ml 5 % potassium bichromate solution, 2 ml formalin and 5 ml acetic acid. Naked oocytes, suspected to be abnormal, were excluded from the object of study.

For the demonstration of general lipids, the oocytes were stained with sudan IV^{1,5}; for neutral fats, with nile blue sulfate^{1,5}; and for lipoids, by the Ciaccio method^{1,5}, in which oocyte-containing oviducts were embedded in paraffin, sectioned at the thickness of 6 μ m, and then stained with sudan IV.

A statistical analysis was carried out on the percentages of the oocytes in each age group, using the t test after the angle transformation.

Results

The presence of general lipids was observed as reddish-orange droplets of different sizes in the cytoplasm, when the oocytes were stained with sudan IV (Fig. 1). The presence of lipoids was shown as similar-looking droplets when treated by the Ciaccio method (Fig. 2). The presence of neutral fats was shown as varied-sized pink droplets, when stained with nile blue sulfate (Fig. 3). The number of oocytes containing either small or large amounts of such inclusions are given in Table 1.

As shown in Table 1, a small or a large amount of sudanophilic lipids and lipoids were contained in all the oo-

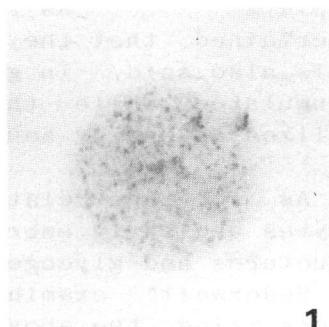


Fig. 1. A large amount of droplets of general lipids is seen in an oocyte obtained from an 180-day-old mouse. Sudan IV stain. $\times 200$.

Table 1. Numbers (percentages) of mouse oocytes containing varied amounts of sudsanophilic lipids, lipoids and neutral fats

Age groups [days]	Sudsanophilic lipids			Lipoids			Neutral fats			
	No. of oocytes observed	None	Small	Large	No. of oocytes observed	None	Small	Large	No. of oocytes observed	
30	165	0(0.0)	149(90.3)	16(9.7)	182	0(0.0)	164(90.1)	18(9.9)	150	150(100.0) ^a
60~90	264	0(0.0)	235(89.0)	29(11.0)	288	0(0.0)	257(89.2)	31(10.8)	208	206(99.0) ^b
180~210	211	1(0.5)	191(90.5)	19(9.0)	234	1(0.4)	207(88.5)	26(11.1)	160	150(93.7) ^{a,b}

Significant differences are seen between the percentages superscribed with same letters (a, c: $P < 0.01$; b, d: $P < 0.05$).

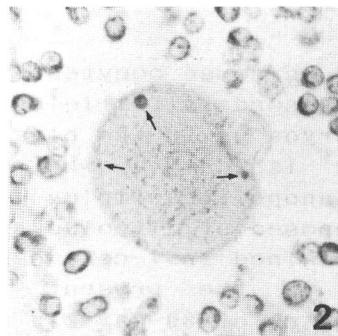


Fig. 2. A small amount of droplets of lipoids (arrows) is seen in an oocyte obtained from an 180-day-old mouse. Ciaccio method. $\times 200$.

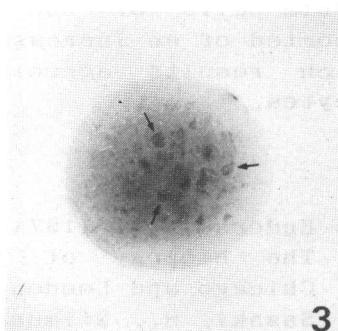


Fig. 3. A small amount of droplets of neutral fats (arrows) is seen in an oocyte obtained from an 180-day-old mouse. Nile blue sulfate stain. $\times 200$.

cytes observed, though there was but one oocytes of 180- to 210-day-old mouse including none, showing no significant differences among age groups. No neutral fats were contained in the oocytes of 30-day-old mice, while those were found in 1.0 % of the oocytes of 60- to 90-day-old mice, and in 6.3 % of the oocytes of 180- to 210-day-old mice, showing a significant difference between the latter two age groups.

Discussion

In mouse oocytes, sudanophilic lipids first appeared in those in secondary follicles^{9, 10)}, and the lipids always existed in the embryos up to the blastocyst stage^{10, 11)}. According to Niimura and Ishida¹⁰⁾ who examined histochemical characteristics of sudanophilic lipids in early mouse embryos, the lipids were composed of lipoids and neutral fats, though the latter was not contained in 1-cell eggs¹⁰⁾.

In the present investigation, sudanophilic lipids in the oocytes of 30-day-old mice were made only of lipoids, while only a few oocytes of 60- to 90-day-old and 180- to 210-day-old mice came to contain neutral fats though slightly. The percentage of the oocytes containing a little neutral fats became higher with the advance of animals' ages.

Kaler and Haensly¹⁶⁾ histochemically studied age-related changes in the amount of fettrot-positive neutral fats in urinary tubule cells of the kidney of 60- to 2700-day-old cats, and reported of an increase in the amount of neutral fats with aging, which results agreeing to the present one obtained of mouse oocytes.

References

- 1) Enders, A.C. (1971). The fine structure of the blastocyst. In The Biology of The Blastocyst, Edited by Blandau, R.J., Chicago and London, Univ. of Chicago Press, P. 73.
- 2) Sasaki, H., Niimura, S. and Ishida, K. (1979). Lamellar or fibrous inclusions in mammalian oocytes. Jpn. J. Zootech. Sci., 50, 88-94.
- 3) Ishida, K. (1952) Histochemical studies of rat ova with special reference to glycogen of them after ovulation. Tohoku J. Agr. Res., 3, 39-49.
- 4) Ishida, K. (1954). Cytochemical studies of tubal ova. Tohoku J. Agr. Res., 5, 1-11.
- 5) Ishida, K. (1962). Differential counts of glycogen-free and glycogen-laden ova of the sow and rabbit with special reference to the tubal ova. Jpn. J. Fertil. Steril., 7, 251-256.
- 6) Thomson, J.L. and Brinster, R.L. (1966). Glycogen content of preimplantation mouse embryos. Anat. Rec., 155, 97-102.
- 7) McReynolds, H.D. and Hadek, R. (1972). Periodic acid Schiff-positive material in hamster preimplantation embryos. J. Reprod. Fert., 30, 173-175.
- 8) Parkening, T.A. and Soderwall, A.L. (1974). Histological localization of glycogen in preimplantation and implantation stages of young and senescent golden hamsters. J. Reprod. Fert., 41, 285-295.
- 9) Ishida, K. (1960). Histochemical studies of lipids in the ovaries of domestic animals. Arch. Hist. Jap., 19, 547-556.
- 10) Niimura, S. and Ishida, K. (1980). Histochemical observations

- of lipid droplets in mammalian eggs during the early development. Jpn. J. Anim. Reprod., 26, 46-49.
- 11) Ozdzenski, W. and Czolowska, R. (1980). Lipid inclusions in oocytes and preimplantational embryos of different strains of mice. Folia. Morphol., 39, 497-502.
- 12) Hishinuma, M., Nakata, H., Urano, K., Takahashi, Y. and Kanagawa, H. (1985). Histochemical observations of lipid droplets in mouse embryos. Jpn. J. Vet. Res., 33, 51-57.
- 13) Narita, A., Niimura, S. and Ishida, K. (1990). Ultrastructural changes of oocytes with the advancement of age of mice. Jpn. J. Anim. Reprod., 36, 83-87.
- 14) Narita, A., Niimura, S. and Ishida, K. (1990). Age-related changes in the percentage of glycogen-laden oocytes in mice. Jpn. J. Fertil. Steril., 35, 444-449.
- 15) Mallory, F.B. (1961). Pathological Technique, New York, Hafner Publishing Co., P. 117.
- 16) Kaler, L.W. and Haensly, W.E. (1977). Kidney in the aging cat: neutral lipids and adenyl cyclase histochemistry. Am. J. Vet. Res., 38, 897-901.

マウスの加齢に伴う卵母細胞の脂質含量の変化

*成田 成・新村末雄・石田一夫

*新潟大学大学院自然科学研究科, 新潟市 950-21

新潟大学農学部畜産学科, 新潟市 950-21

30日齢、60～90日齢および180～210日齢のマウスから採取した排卵直後の卵母細胞について、スダン好性脂質（脂質一般）、類脂質および中性脂肪の検出を組織化学的に行い、これらの量が動物の加齢に伴って変化するか否かを調べた。

各日齢のマウスにおいて、ほとんどすべての卵母細胞は一般脂質と類脂質を少量ないし多量含んでおり、これらの脂質の含量は各日齢の動物の間で差がなかった。一方、中性脂肪は30日齢のマウスの卵母細胞には検出されなかったが、60～90日齢および180～210日齢の動物の卵母細胞の1.0 % と6.3 % に、それぞれ少量観察され、180～210日齢の動物における割合は60～90日齢の動物のものに比べて有意に高かった。これらのことから、動物の加齢に伴って、卵母細胞のスダン好性脂質と類脂質の含量には変化がみられないが、卵母細胞に中性脂肪が出現し、これを含有する卵母細胞の割合は増加することがうかがわれた。

家兎の着床界面における胚盤胞および 子宮内膜の走査型電顕像

Scanning electron microscopy on rabbit blastocyst
and endometrium during implantation stages.

戸津川 清・菅原七郎¹⁾・正木淳二¹⁾

Kiyoshi TOTSUKAWA, Shichiro SUGAWARA¹⁾
and Junji MASAKI¹⁾

山形大学農学部畜産学教室

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

¹⁾ 東北大学農学部家畜繁殖学教室

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

Abstract: The study was conducted to elucidate the interrelationship between the blastocyst and endometrium at early stage of implantation. Japanese White does were autopsied at 7 and 8 days post coitum. The samples were prepared with the method described by us elsewhere, and observed by use of Scanning electron microscopy. The results were as follows. 1. The inner part of the trophoblast was smoothly at 7 days post coitum, and the cellular borders of the trophoblast was covered yet an abundance of microvilli. The endometrium richly provided round shaped cells with short microvilli. A small number of ciliated cells could be found at the antimesometrial surface of the uterus. 2. The blastocyst at 8 days post coitum contacted loosely with the endometrium antimesometrial portion. The surface of endometrium at this stage contained the characteristic microvilli which formed like a flower structure by the bundle of microvilli.

緒 言

家兎胚盤胞は、一定期間子宮腔内を浮遊した後、子宮内膜上皮の一定部位に定着し、いわゆる着床(implantation)を始める。この時期の胚胞盤と子宮内膜上皮の変化を電顕的に検索することは、着床のメカニズムを知る有力な手段となり得る。

これまで、種々の哺乳動物の着床界面における胚盤胞および子宮内膜上皮について走査型電顕(SEM)を利用して、細胞表面の微絨毛(microvilli)や細胞質突起(cytoplasmic projection)等

の観察が行われている¹⁻⁶⁾が、家兎に関するもの⁷⁾は少なく、その知見は殆んど得られていない。

そこで、著者らはこれまで5日および6日齢家兎胚盤胞の細胞表面について観察を行って⁸⁻⁹⁾きたが、今回着床時の胚盤胞と子宮内膜の関係を明らかにする目的で、7日および8日齢について比較検討した。

材料および方法

日本白色種家兎より、交尾後7日および8日目の子宮を採取した。7日齢胚盤胞は、ピンセットで子宮を切開することにより回収し、他方8日齢の胚盤胞は子宮内膜と共に着床部位をそのままカミソリで切り取り電顕用材料とした。2.5%グルタール・アルデヒドで5~24時間固定し、リン酸緩衝液(pH=7.4、0.2M)で12~14時間洗った後、1%四酸化オスミウムで1時間固定した。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。観察は、日立S-70型電子顕微鏡で行った。

結果

7日齢の胚盤胞と子宮上皮：

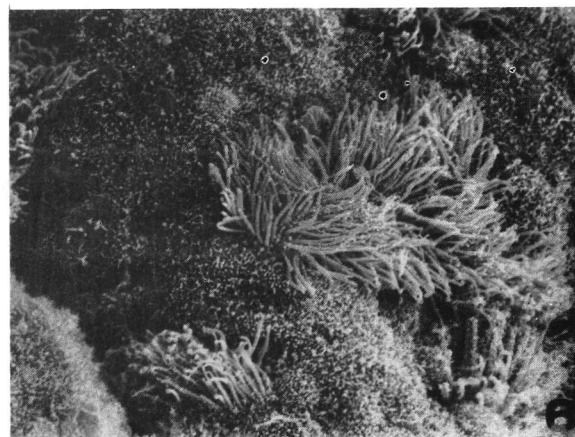
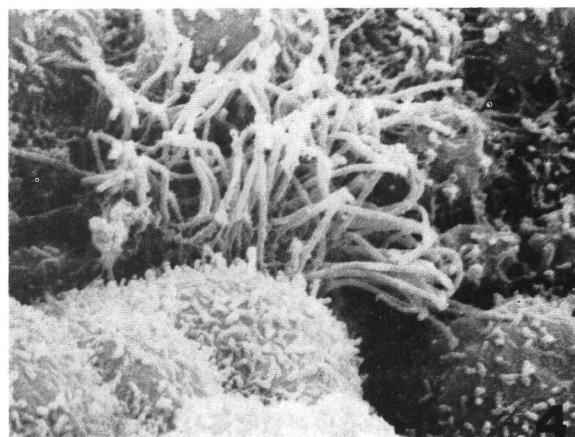
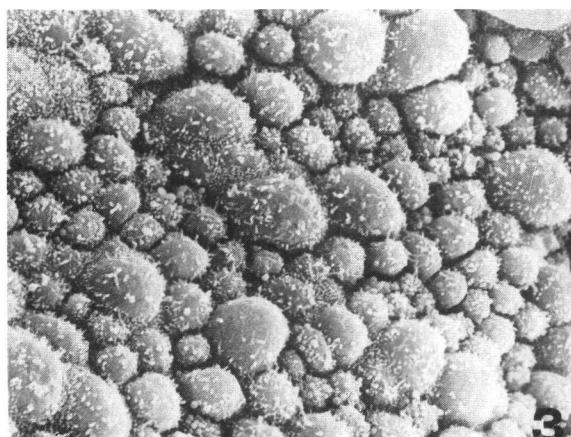
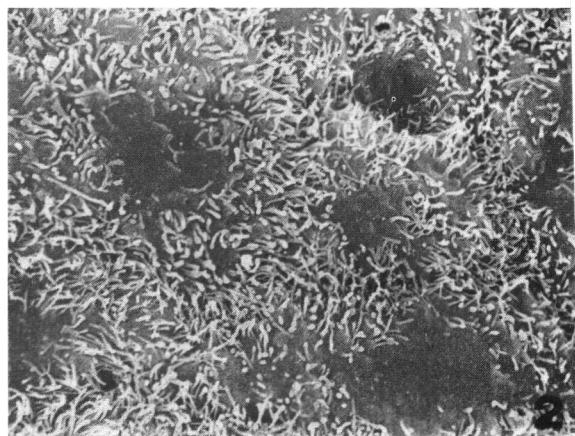
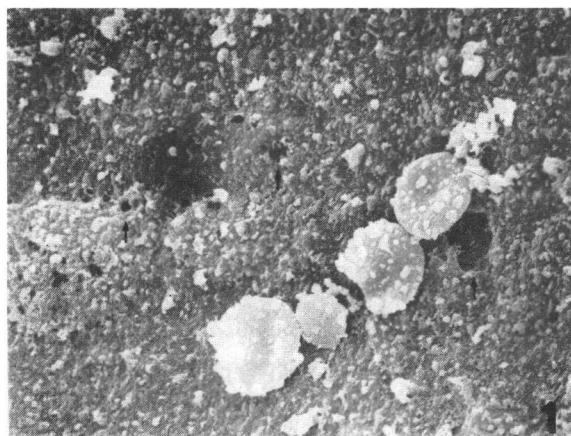
胚盤胞は子宮内膜に大きく拡がり、子宮内膜上皮の上に等間隔に配列する、いわゆるorientation(定位)の像を呈し始める。

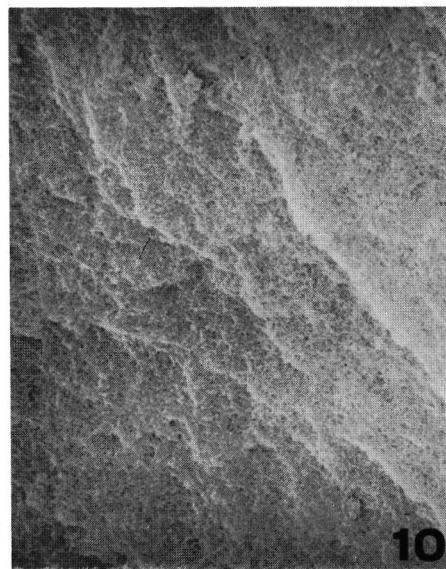
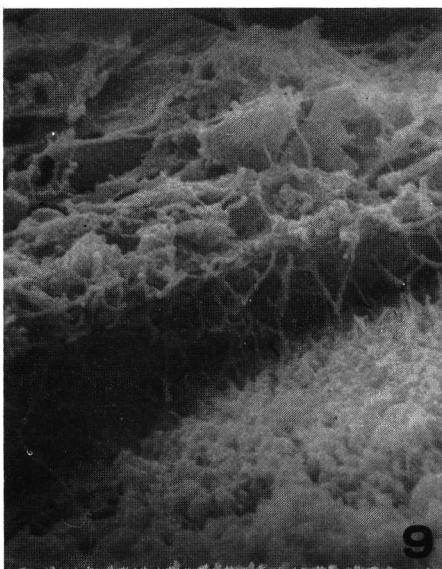
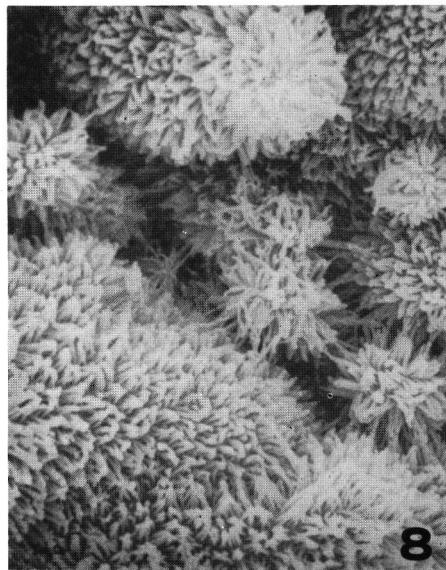
胚盤胞被膜は依然として、ほぼ完全な状態であるが、子宮上皮と接したと思われる部位の所々に溶解を開始している像が観察される(図1)。胚盤胞の栄養膜細胞表面は、細胞の中央部分からmicrovilli(微絨毛)が消失し、なめらかになったが、細胞と細胞との境界部分には依然として長いmicrovilliが存在していた(図2)。

この時期の子宮内膜上皮細胞の多くは、比較的小型の丸型細胞で占められていた。その細胞表面には短いmicrovilliがまばらに認められた(図3)。また、長く伸びた線毛細胞は少ないが顕著に認められた(図4)。特に、mesometrial side(間膜側)では短いmicrovilliが結合して、小さな花状を呈するものが多数みられた(図5)。他方、antimesometrial side(反間膜側)では長く伸びた線毛細胞が特徴的に認められた(図6)。

8日齢の胚盤胞と子宮上皮：

この時期の胚盤胞はすでに子宮内の一定部位に位置し、attachmentを開始している。すなわち、図7に認められるように、胚盤胞は antimesometrial side の子宮上皮細胞と数か所においてゆるく接觸し、mesometrial portionにおいては遊離の状態である。





EXPLANATION OF FIGURES

1. The surface of blastocyst covering recovered from the uterus at 7days P.C. ; showing the portions of resolving of blastocyst covering. (arrows) $\times 3600$
2. The surface a 7-day trophoblastic cell ; the middle of the cell is smoothly. note the long microvilli at the cell border line. $\times 3600$
- 3.-6. Scanning electron micrographs of the rabbit uterus 7days P.C..
3. Note many round non-ciliated cells with short microvilli. $\times 2400$
4. Note the ciliated cell and many round cells with short microvilli. $\times 7200$
5. Uterus 7days P.C. at the mesometrial site ; note the characteristic microvilli which formed like a flower by bundle of microvilli. $\times 12000$
6. Uterus 7days P.C. at the antimesometrial site ; note the some ciliated cells. $\times 7200$
7. Uterus and blastocyst 8days P.C. ; the upper part of the picture is shown the antimesometrial site. the trophoblastic cells loosely contact with endometrium. (arrows) $\times 6.3$
8. Endometrium 8days P.C. ; note the bundle of microvilli which formed like a flower or rosette structure. $\times 3600$
9. Amoeba-like projection (arrow) which extend from trophoblastic cell to endometrium can be seen at the antimesometrial site. $\times 12000$
10. Blastocyst cavity is full of the sponge-like structure. $\times 3600$

7日齢で認められた胚盤胞被膜はすでに消失し、認めることはできなかった。

Antimesometrial sideの子宮上皮は比較的薄く、他方、mesometrial sideに近づくにつれて上皮の肥厚が増し、上皮細胞が集まり、大きな襞が形成されている。この時期の子宮上皮細胞のSEM像は、細長く伸びたmicrovilliといくつかのmicrovilliが結合したゆり花状を呈するのが特徴である(図8)。

Antimesometrial sideでは、胚盤胞の栄養膜細胞から細長く伸びたアメーバ偽足様突起が子宮上皮細胞表面と結合している像が随所に観察された(図9)。

また、胚盤胞内を電顕的に観察すると、図10にみられるようにスponジ様の構造物で満たされていた。

考 察

家兔の7日齢胚盤胞は、すでにsyncitiotroblastおよびcytotrophoblastに分化し、西脇¹⁰⁾による透過型電子顕微鏡を用いた観察からは、絨毛様突起、細胞質の電子密度および細胞質成分、細胞間の接合様式などが形態的特徴であることが明らかにされている。他方、Hafetz & Kanagawa⁷⁾はSEMでの観察で、栄養膜細胞の外観が凸状になり、細胞と細胞との境界の区別がつかなくなっていることを報告している。著者らも同様に6日齢の胚盤胞とは明らかに異なった栄養膜細胞表面像を認めた。すなわち、細胞の中央部分からmicrovilliは消失し、やや隆起し、わずか細胞境界面だけにmicrovilliは残存していた。この変化は胚盤胞自身の着床への準備を示す形態的変化であることを推測させる。一方、子宮の内膜上皮細胞に関しては、Larsen¹¹⁾により胚盤胞の着床前に、“synplasma”すなわち細胞間膜の消失、結果として多核細胞形成へと転換していくことが観察されている。著者らの観察から特に注目すべきは、尖端の鈍化した、またはゆり花状に結合したmicrovilliの出現であり、これらは着床現象へと移行する重要な要因となっていることが考えられる。

続く8日齢はattachmentの時期に入り、胚盤胞および子宮内膜上皮は互いに密着し、ときにdesmosome様構造を形成し、さらに栄養膜細胞の細胞質突起が子宮内膜上皮の細胞間膜に沿ってinvasionを起こしてくる。

Larsen¹¹⁾は、syncitiotrophoblastと腺細胞の細胞質が互いに融合し、その境界面にはhomogenな物質が存在し、両細胞の区別がつかなくなってくることを観察している。著者らの観察からは、胚盤胞側から長く伸びたアメーバ偽足様突起や、子宮内膜上皮細胞の微絨毛の変形および細胞間の離開など着床への積極的な形態的変化を認めることができた。

文 献

1) BERGSTROM, S. and NILSSON, O. (1970). Morphological changes of the trophoblast surface

- at implantation in the mouse. *J. Reprod. Fert.* 23, 339-340.
- 2) NILSSON, O. (1972). Ultrastructure of the process of secretion in the rat uterine epithelium at preimplantation, *J. Ultrastruct. Res.*, 40, 572-580.
- 3) BERGSTROM, S. (1972). Delayed of blastocysts implantation in the mouse by ovariectomy or lactation. A scanning electron microscope study. *Fert. steril.*, 23, 548-561.
- 4) CALARCO, P. G., and EPSTEIN, C. J. (1973). Cell surface changes during preimplantation development in the mouse. *Dev. Biol.* 32, 208-213.
- 5) 佐々木博之・新村末雄・石田一夫 (1979)。
妊娠13日におけるブタ胞胚の微細構造について, *日畜会報*, 50, 721-726.
- 6) TAKAHASHI, J., SUGAWARA, S., and MASAKI, J. (1980). Scanning electron microscopic studies of uterine epithelial cytoplasmic protrusions during the estrus cycle, pregnancy, pseudopregnancy and early stages of decidualization in rat. *Tohoku J. Agric. Res.*, 31, 33-41.
- 7) HAFEZ, E. S. E. and KANAGAWA, H. (1975). Blastocyst-endometrial interactions (rabbit). In *Electron Microscopic Atlas of Mammalian Reproduction*, Edited by Hafez, E. S. E., Tokyo, Igaku Shoin, 334.
- 8) 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。
- 9) 戸津川清・菅原七郎・正木淳二 (1990)。
家兔胚盤胞の走査型電子顕微鏡による観察, *哺乳卵研誌*, 7, 1-6.
- 10) 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。
- 11) LARSEN, J. F. (1961). Electron microscopy of the implantation site in the rabbit, *Amer. J. Anat.* 109, 319-334.

ガラス化法によるラット2細胞期胚の 超低温保存

Low Temperature Storage of Rat 2-cell Embryos by Vitrification.

平林 真澄、茶谷 伸夫

Masumi HIRABAYASHI and Nobuo CHAYA

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.

Abstract: Rat 2-cell embryos were preserved successfully in liquid nitrogen by vitrification. Embryos needed to be equilibrated in 90%VS1 in a stepwise manner, while protective agents could be removed directly from the vitrified embryos. The vitrified embryos developed to live youngs at high rates (59~67%) by transferring to pseudopregnant recipients.

緒 言

哺乳動物初期胚の凍結保存は、1972年にWhittinghamら¹⁾がマウス胚を用いて成功して以来、ラット²⁾、ウサギ³⁾、ヒツジ⁴⁾、ウシ⁵⁾など多くの動物種に適用されている。その後、多くの研究が凍結方法の簡略化に費やされてきた^{6, 7)}。1985年、RallとFahy⁸⁾は高濃度の凍害保護物質溶液に胚をさらし、氷晶形成させることなく液体窒素中へと浸漬させるガラス化法によってマウス胚が保存できることを報告した。そして、このガラス化法はウサギ⁹⁾およびウシ¹⁰⁾の胚に適用されている。しかしながら、ラット胚については、Konoら¹¹⁾が胚盤胞を用いて報告しているが、さらに初期の発生段階の胚への適用については明らかでない。また、凍害保護物質の添加および除去操作は煩雑で、その簡略化が必要とされている。

本研究では、ガラス化法によるラット2細胞期胚の超低温保存を試み、さらに凍害保護物質の添加および除去方法の簡略化について検討を加えた。

材料および方法

(1) 胚の採取

動物は8～25週齢のWistar系ラット（日本チャールス・リバー）を用いた。20単位の妊娠馬血清性性腺刺激ホルモン(PMSゼンヤク, 日本全薬工業) およびヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(ペベローゲン, 三共) を腹腔内投与することにより過剝排卵誘起^{1,2)} を施した雌ラットを同系統雄と交配させ、膣栓を確認したものを実験に供した。hCG 投与後42～46時間に動物を屠殺し、HB1³⁾ あるいはHER⁴⁾ 液を用いて卵管を灌流することにより2細胞期胚を採取した。

(2) ガラス化法

ラット2細胞期胚のガラス化は、RaillとFahy(1985)の報告⁵⁾に準じて行った。すなわち、ガラス化に用いる90%VS1液はDulbecco's PBSに18%DMSO(Sigma), 14%アセトアミド(和光純薬工業), 9%プロピレンゲリコール(和光純薬工業) および5.4%ポリエチレンゲリコール(MW8000, Sigma)を含む。ラット2細胞期胚は4℃下で90%VS1液に5分間平衡させた後、0.25mℓ容量のプラスチックストロー(富士平工業)の中央部に90μℓの90%VS1液中に充填した。ストローの上端部をヒートシールした後、直接液体窒素中に投入し、1～14日間保存した。加温はストローを2℃冷水中に浸漬することにより急速に行った。

90%VS1液への平衡を段階的に行う場合は、室温で25%VS1液に20分、4℃で50%VS1液に10分、そして90%VS1液へ5分間かけて平衡させた。90%VS1液への平衡を一段階で行う場合は4℃で5分間平衡させた後、ストロー内に胚を充填した。また、加温後の凍害保護物質の除去を段階的に行う場合は、4℃で50%VS1液3mℓにストロー内の胚を含む液を回収して10分、25%VS1液に10分、そして室温で12.5%VS1液に10分間静置した後、HB1あるいはHER液に胚を移した。凍害保護物質の除去を一段階で行う場合は、室温でHB1あるいはHER液3mℓに直接胚を回収した。

(3) 生存性の検定

凍害保護物質を除去した胚は、実体顕微鏡下で形態を観察し、その正常性を判定した。そして精管結紮雄と交配させた偽妊娠1日目の受卵雌の卵管に胚を移植し、その後の胎仔あるいは産仔への発生能を調べた。また、対照として無処理の2細胞期胚を受卵雌に移植した。

結 果

ガラス化法によって保存されたラット2細胞期胚の加温および凍害保護物質除去後の生存性をTable 1に示した。ほぼすべての胚(97.0%, 356/367)が加温後に回収できた。凍害保護物質の添加および除去を多段階で行った場合、ガラス化胚の89.3%(67/75)が正常形態を維持していた。凍害保護物質の添加を多段階、除去を1段階で行った場合、その生存率は84.8%(123/145)であった。また、凍害保護物質の添加および除去を1段階で行った場合も91.9%(125/136)と高い生存率を示した。従って、凍害保護物質の添加および除去方法が異なってもガラス化後の生存性には統計的に有意な差は認められなかった(χ^2 検定)。

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

Treatment addition	dilution	n	No. of embryos vitrified	No. of embryos recovered	No. of morphologically normal embryos(%)*
stepwise	stepwise	5	77	75	67 (89.3)
stepwise	one-step	5	151	145	123 (84.8)
one-step	one-step	3	139	136	125 (91.9)

* Percentage was calculated to recovered embryos.

ガラス化胚の移植による胎仔および産仔への発生能をTable 2に示した。胚を移植した受卵雌の90.9%(20/22)において妊娠が成立した。凍害保護物質の添加および除去を多段階で行った場合、移植胚の66.7%(28/42)が生存胎仔および産仔として得られた。凍害保護物質の添加を多段階、除去を1段階で行った場合でも、59.3%(48/81)の生存胎仔および産仔が得られた。しかし、凍害保護物質の添加および除去を1段階で行った場合、加温後の胚の形態評価における生存率には有意差がなかったにも係わらず、胎仔および産仔への発生率は22.4%(28/125)と統計的に有意に低値を示した($p<0.01$)。この処理区では胚の移植により妊娠に至らなかった受卵雌が2例あり、これらを差し引いた妊娠雌当たりの産仔率を見ても段階的に凍害保護物質の添加を行った場合と比べて低値であった(29.5%, 28/95)。なお、得られた産仔には外見上何ら異常は観察されなかった。また一部の産仔についてはその後の繁殖成績を調べたが異常は認められなかった(結果は示していない)。

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

Treatment addition	dilution	n	No. of pregnant/recipients	No. of embryos transferred	No. of live fetuses or youngs(%)
stepwise	stepwise	3	3/3	42	28(66.7) ^a
stepwise	one-step	3	6/6	81	48(59.3) ^a
one-step	one-step	3	7/9	125	28(22.4) ^b
untreated	control	2	4/4	61	43(70.5) ^a

Significant difference between different superscripts ($p<0.01$).

考 察

ラットの過剰排卵誘起処置は胚の卵管下降を促進し、hCG投与後の時間の経過とともに採卵可能胚数が減少することが知られている^{12, 15)}。従って、雌一匹当たりの採取胚数を多くするためには初期の発生段階で胚を採取することが望ましい。著者らは10%DMSOを凍害保護物質とし、0.5°C/minで-30°Cまで冷却する二段階凍結法を用いてラット2細胞期胚の凍結保存が可能なことを報告した¹⁵⁾。しかし、二段階凍結法はプログラムフリーザー等の高価な設備を必要とし、さらに一連の凍結操作に長い時間を必要とする。一方、ガラス化保存法は胚に凍害保護物質を添加した後、直接液体窒素中に浸漬し保存する方法で、冷却に要する時間の大幅な短縮が可能となる。マウス以外の動物種への適用において、Smoragら⁹⁾はウサギの1細胞期～胚盤胞期胚の超低温保存にガラス化法を用い、効率よく保存が可能になったと報告した。また、Massipら¹⁰⁾はウシの桑実期胚～初期胚盤胞をガラス化法で保存することを試み、約50%の胚を蘇生させることに成功している。一方、ラット胚でのガラス化法による保存は、Konoら¹¹⁾が胚盤胞期胚を用いて良好な成績を得ている。そして本研究において初めて、ラット2細胞期胚の保存にもガラス化法の適用が可能であることが明らかになった。ガラス化保存されたラット2細胞期胚の産仔への発生率は、桑実期から初期胚盤胞期のラット胚の産仔への発生率と同様であった（平林、未発表）。

マウスで最初に報告されたガラス化法⁸⁾では、凍害保護物質の添加および除去を低温下(4°C)で段階的に行うという操作の煩雑さが指摘されている¹⁶⁾。最近、中瀧¹⁶⁾はVS1

液の組成に修正を加えることにより、添加を室温で一段階で行うことが可能なマウス4細胞期胚のガラス化保存法を報告している。また、Kasaiら¹⁷⁾はエチレングリコール、フィーコール、シュークロースからなるガラス化液を開発し、添加および除去を一段階で行つてもマウス桑実期胚が効率よく保存できることを報告した。ラット胚を用いた本研究では、凍害保護物質の除去を一段階で行った場合の産仔への発生率は多段階で除去した場合と同等であり、90%VS1液からの凍害保護物質の急激な除去はその後の胚の生存に影響を及ぼさないことが明らかとなった。しかし、凍害保護物質の添加を一段階で行った場合加温後の胚の形態には何ら遜色はないが、移植後の胎仔および産仔への発生率は低く、胚の機能に何らかの支障をきたしている可能性が示唆された。このように、ラット2細胞期胚に90%VS1液をガラス化液として用いた場合、凍害保護物質の除去操作の簡略化は可能であったが、添加にはなお段階的な処理が必要であった。この結果は、ラット胚の凍害保護物質に対する感受性がマウス胚と異なっていることを示唆しており、ラット胚凍結保存の全操作を簡略化するためには今後さらに検討を要すると思われる。

文 献

- 1) Whittingham, D. G., Leibo, S. P. and Mazur, P. (1972) Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -296°C. *Science* NY 178, 411-414.
- 2) Whittingham, D. G. (1975) Survival of rat embryos after freezing and thawing. *J. Reprod. Fert.* 43, 575-578.
- 3) Bank, H. and Maurer, R. R. (1974) Survival of frozen rabbit embryos. *Exp. Cell Res.* 89, 188-196.
- 4) Willadsen, S. M., Polge, C., Rowson, L. E. A. and Moor, R. M (1976) Deep freezing of sheep embryos. *J. Reprod. Fert.* 46, 151-154.
- 5) Wilmut, I. and Rowson, L. E. A. (1973) Experiments on the lowtemperature preservation of cow embryos. *Vet. Rec.* 92, 686-690.
- 6) Renard, J. P., Bui-Xuan-Nguyen and Garnier, V. (1984) Two-step freezing of two-cell rabbit embryos after partial dehydration at room temperature. *J. Reprod. Fert.* 71, 573-580.
- 7) Biery, K. A., Seidel, Jr. G. E., and Elsden, R. P. (1986) Cryopreservation of mouseembryos by direct plunging into liquid nitrogen. *Theriogenology* 25, 140(12th IETS suppl.).
- 8) Rall, W. F. and Fahy, G. M. (1985) Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 313, 573-575.
- 9) Smorag, Z., Gajda, B., Wieczorek, B. and Jura, J. (1989) Stage-dependent viability of vitrified rabbit embryos. *Theriogenology* 31, 1227-1231.

- 10) Massip, A., Van der Zwalmen, P., Scheffen, B. and Ectors, F. (1986) Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryo-Letters* 7, 270-273.
- 11) Kono, T., Suzuki, O. and Tsunoda, Y. (1988) Cryopreservation of rat blastocysts by vitrification. *Cryobiology* 25, 170-173.
- 12) 石橋 功 (1983) 種々の量のPMSGとhCG を投与した成熟ラットにおける排卵数と受精および発育について、家畜繁殖誌、29, 1-7.
- 13) Rall, W. F. (1987) Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 24, 387-402.
- 14) Ogawa, S., Satoh, K., Hamada, M. and Hashimoto, H. (1971) *In vitro* culture of rabbit ova from the single cell to the blastocyst stage. *Nature* 233, 422-424.
- 15) 水野 敦子、星 雅樹、平林 真澄 (1987) 新しい系統維持技術—SHR胚の凍結保存—、日本疾患モデル動物研究会誌、3, 42-45.
- 16) 中瀬 直己 (1989) 体外受精由来マウス4細胞期胚の超急速凍結保存について、日本実験動物学会誌、38, 279-282.
- 17) Kasai, M., Komi, J. H., Takakamo, A., Tsudera, H., Sakurai, T. and Machida, T. (1990) A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J. Reprod. Fert.* 89, 91-97.

集合マウス胚における移植後の

S I Z E R E G U L A T I O N に関する研究

Size Regulation of Aggregated Mouse Embryos in Postimplantation

中川 明 · 日野雅生 · 鈴木達行 · 菅 徹行

Akira NAKAGAWA, Masao HINO, Tatsuyuki SUZUKI, Tetsuyuki SUGA

山口大学農学部獣医学科家畜臨床繁殖学教室

Laboratory of Theriogenonogy, Department of Veterinary Medicine,

Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yamaguchi.

A b s t r a c t :

The development of mouse embryos formed by the aggregation of two 8-cell embryos was analysed in comparison with control single (normal) embryos. The analysis revealed that: (1) No significant difference was observed in the weights of fetus and placenta from postimplantation embryo at 18 days post coitum of recipient mice between aggregated and control embryos. (2) Postimplantation aggregated embryo was at about the same developmental stage as control embryo of the same chronological age, both before and after size regulation. (3) Size regulation of the aggregated embryos was brought about by 6 days and 5 hours post coitum of recipient mice.

緒 言

哺乳動物において2個以上の胚を人為的に接着・集合させて单一の個体を得る最初の試みは、NicholasとHall(1942)が、ラットの1~2細胞期の胚を用いて行い、胎子が得られることを報告した。マウスでは1960年代初頭、Tarkowski(1961)およびMintz(1962)によって試みられ、8細胞期胚の集合、移植によって産子が得られることが明らかにされた。

集合胚の“size regulation”については、Tarkowski(1963)が初めて言及し、2個の胚から作成した集合胚は体外培養により1個の巨大な胚盤胞に成長したが、これを移植して得られた6.5日目の胎子はすでに正常な大きさに戻っていたことを報告している。その後、BowmanとMcLaren(1970)が妊娠17日目における集合胚由来胎子および胎盤の重量について報告した。さらに“size regulation”の

時期については、BuehrとMcLaren(1974)およびRands(1986)は胎子の体積を計測して、LewisとRossant(1982)は胎子の細胞数を計測して、それぞれ報告している。しかし、胎子の“size regulation”に関する報告については、実験に供した胎子の例数が少なく、集合胚および対照胚由来胎子について受胚マウスごとの発育ステージおよび胎子体積の比較・検討が行われていない。

本実験は、マウス8細胞期胚を用いて、(1)2個の胚を接着、集合して作成した集合胚の單一個体への発育能について、体外培養後および移植後の妊娠18日目について検討する。(2)次に、着床初期における集合胚と対照(正常)胚の発育ステージおよび胎子の体積について経時的変化を記録し、“size regulation”の時期について検討することを目的として行った。

実験材料と方法

静岡実験動物共同組合より購入し、山口大学獣医学科内で繁殖、飼育したICR系未経産成熟マウス(8~16週齢)を供胚マウスとして308匹、受胚マウスとして64匹、合計372匹を使用した。マウス飼育室は13時から翌朝3時まで14時間点灯し、3時から13時までの10時間は消灯した。マウス・ラット飼育繁殖固体飼料(日本クレア:CE-2)および水は自由に採取させた。飼育室の温度は22~25°Cに保持した。

供胚マウスに過剰排卵を誘起する目的で、妊娠馬血清性性腺刺激ホルモン(帝国臓器:セロトロピン)5.0 i.u.を23時に腹腔内投与し、48時間後に入絨毛性性腺刺激ホルモン(帝国臓器:ゴナトロピン、以下HCGと略す)5.0 i.u.を腹腔内投与した。HCG投与後、同系の雄マウスと一緒に同居させ、翌日、腔栓の有無を確認した(腔栓を確認した日を妊娠1日目とした)。

供胚マウスを交配後3日目の21~23時、すなわちHCG投与後70~72時間に頸椎脱臼法にて屠殺し、卵管および子宮を摘出し、M16培養液(Whittingham, 1971)で灌流して胚を回収し、形態に異常が認められなかった胚のうち8細胞期の胚を選び、実験に供した。

胚の接着・集合操作はMintzら(1973)の方法に準じて行った。胚の透明帯は0.5%プロナーゼ溶液にて融解除去した後、M16培養液で3回洗浄した。なお、接着・集合操作を行わない胚を対照胚として用いた。

胚の体外培養は、Brinster(1963)の方法に準じて行った。すなわち、M16培養液0.05mlの微小滴内に集合胚または対照胚1個を入れ、37°C、5%CO₂-95%空気の湿度飽和気相下で培養を行った。

体外培養終了時の胚の発育形態は、次のように分類した。すなわち:(1)形態の正常な1個の桑実胚または初期胚盤胞、(2)1個の胚に発育したものの、完全な球状にならなかった胚、(3)集合されずに2個のまま発育した胚、(4)変性胚、以上4種に分類した。

精管結紮した雄マウスと1晩同居させ、翌日腔栓を確認した雌マウスを、受胚マウスとして準備した。なお、腔栓を確認した日(精管結紮した雄と1晩同居させた翌日)を偽妊娠1日目とし、受胚マ

ウスの交配時刻は、消灯時間の中間点（すなわち、午前8時）とした。

集合胚および対照胚は体外培養20～22時間後に桑実胚または初期胚盤胞に到達したものを移植に供した。それらの胚の移植は、偽妊娠3日目の受胚マウスの一方の子宮角に集合胚を、他方の子宮角に対照胚を、それぞれ7～8個注入して行った。移植後の胚の日齢は受胚マウスの妊娠日齢をもってした。すなわち、受胚マウスの偽妊娠1日目を妊娠1日目とした。

受胚マウスは移植後、妊娠18日目に屠殺し、左右の子宮角別に、着床数、生存胎子の数と性別、生存胎子および胎盤の重量を測定・記録した。生存胎子の性は、肛門から外尿道口までの長さにより判定した。

着床初期における移植胚の“size regulation”の時期を調べるために、子宮の薄切標本を作製した。子宮は屠殺後摘出され、AFA固定液（酢酸：ホルムアルデヒド溶液：エチルアルコール：水=1:3:3:5）（LevisとRossant, 1982）によって固定されパラフィン包埋された。包埋された標本は、7 μ mの厚さで連続薄切標本にし、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。受胚マウスは妊娠6日目12時（交配後5日と5時間）、同7日目0時、同7日目12時、同8日目0時に供試された。

子宮の薄切標本内の胚は、その形態を鏡検し、Fig. 1 の分類に従って、発育ステージを分類した。さらに、描画装置を用いて薄切標本内の胎子組織の輪郭部分を118倍あるいは236倍で拡大描画した。なお、胎子は近位内胚葉（proximal endoderm）と胚体外外胚葉（extraembryonic ectoderm）によって囲まれた部分とし、遠位内胚葉（distal ectoderm）および外胎盤錐（ectoplacental cone）は胎子組織から除外した。描画は、各胎子ごとに、胎子組織が認められる連続薄切標本すべて、あるいは一枚おきに行った。

描画した胎子組織の輪郭は、三次元画像解析システム（ニコン製、COSMOZONE-2SA）付属のデジタライザー・タブレットを用いてトレース入力した。入力した原画データは三次元像として再構築され、胎子組織の体積を算出した。

集合胚の発育形態別の割合、着床率、生存胎子の割合、胎子の発育ステージ別の割合の差の検定は χ^2 検定を使用した。生存胎子および胎盤の重量、胎子の体積の差の検定は t 検定を使用した。

結 果

合計308匹の供胚マウスより8細胞期の胚1002個を得て、実験に供した。集合胚および対照胚の体外培養20～22時間後の発育形態をTable 1に示した。形態学的に正常な1個の桑実胚および初期胚盤胞に発育した割合は、両者の間に有意な差は認められなかった。

妊娠18日目における集合胚および対照胚の移植成績をTable 2に示した。移植胚に対する着床数、生存胎子数の割合は、両者の間でそれ有意差は認められなかった。生存胎子の雄と雌の割合について、両者の間に有意差は認められなかった。

妊娠18日目に屠殺・解剖した受胚マウスのうち、左右両子宮角に着床のみられた11匹について、生

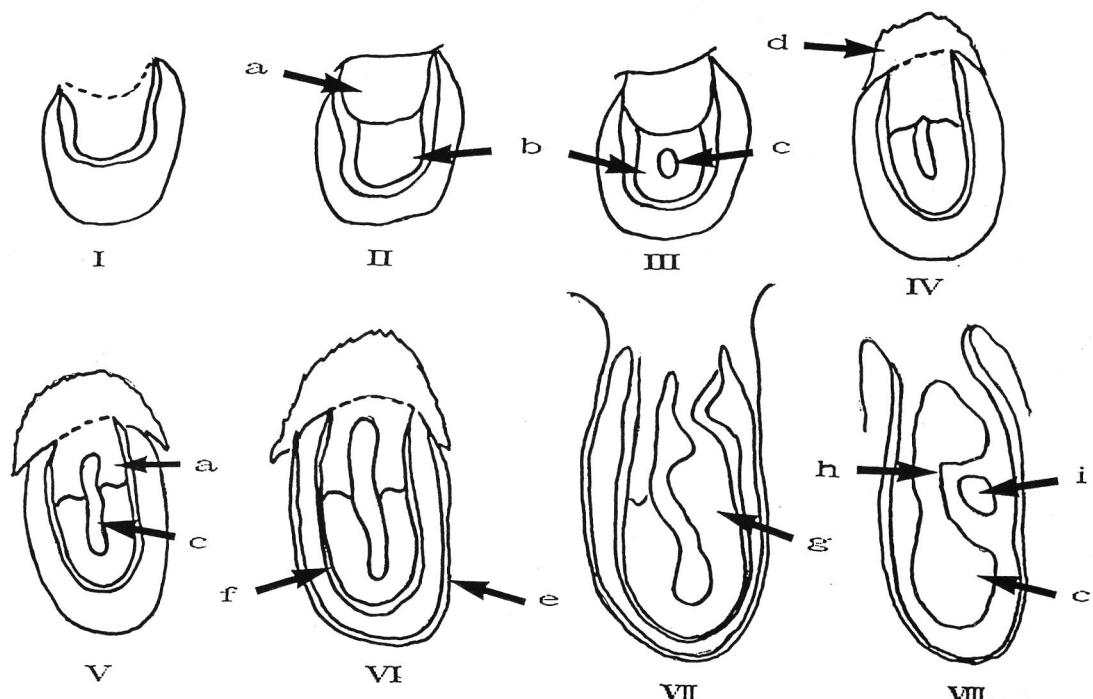


Fig. 1 Morphological stage criteria for the mouse embryos at early postimplantation

- I: Egg cylinder partly formed, thickening of ectoderm but no obvious extraembryonic ectoderm.
- II: Embryonic ectoderm (b) distinct from extraembryonic ectoderm (a).
- III: Proamniotic cavity (c) beginning to form in embryonic ectoderm (b).
- IV: First appearance of ectoplacental cone (d).
- V: Proamniotic cavity (c) extending into extraembryonic ectoderm (a).
- VI: On the exterior of proximal endoderm (f), distal endoderm (e) formed along the inside of trophectoderm.
- VII: Appearance of mesoderm (g) as clear migrating layer.
- VIII: Beginning of exocoelom (i) in posterior amniotic fold (h), projecting amniotic fold (c).

存胎子および胎盤の重量をTable 3に示した。集合胚および対照胚由來の胎子および胎盤の重量の平均値は、それぞれ両者の間に有意差は認められなかった。妊娠6日目12時（交配後5日と5時間）、妊娠7日目0時、妊娠7日目12時、妊娠8日目0時における集合胚および対照胚の移植成績をTable 4に示した。さらに、その中の着床胚の発育ステージを、Fig. 1の分類に従って分類した（Table 5）。

Table 1 Morphological classification of aggregated and control embryos after in vitro culture[#]

Embryos	No. (%) of embryo cultured	No. (%) of embryos developed			
		Normal ^a	Imperfect agg. ^b	Not agg. ^c	Degenerated
Aggregated	239 (100)	224 (93.7)	9 (3.8)	5 (2.1)	1 (0.4)
Control	238 (100)	235 (98.7)	—	—	3 (1.3)

[#] : Morphological examination was done after in vitro culture for 20~22h.

a : A morphologically normal morula or blastocyst

b : Developed to an aggregated, but a morphologically abnormal embryo

c : Not aggregated

Table 2 The viability of aggregated and control embryos at postimplantation^a

Embryos	No. (%) of embryos transferred	No. of recipient mice	No. (%) ^b of implant.	No. (%) ^b of live fetuses	No. (%) ^c of fetuse sex		
					male	female	unknown
Aggregated	106 (100)	14	57 (53.8)	44 (41.5)	25 (56.8)	17 (38.6)	2 (4.6)
Control	103 (100)	14	48 (46.6)	34 (33.0)	18 (52.9)	16 (47.1)	0 (0)

a : Examination was done 18 days post coitum of recipient mice to determine viability.

b : Percentage to the embryos transferred

c : Percentage to the live fetuses

Table 3 The weights of fetuses and placentae at Day 18 of pregnancy obtained from the transfer of aggregated and control embryos

Embryos	No. of recipient mice	Weight: Mean \pm S.D. (g)	
		Live fetuses	Placentae
Aggregated	11	1.38 \pm 0.15 (36) ^a	0.15 \pm 0.04 (36)
Control	11	1.35 \pm 0.17 (32)	0.14 \pm 0.03 (32)

a : Numbers examined

Table 4 The viability of aggregated and control embryos at early postimplantation stages.

Post-implantation stages	No. of recipient mice	Transfers		Implantations(%)	
		Agg.	Control	Agg.	Control
Day 6 12:00 (5 d, 5 h ^a)	12	86	87	53 (61.6%)	34 (39.1%)
Day 7 0:00 (5 d, 17 h)	4	30	30	22 (73.3%)	13 (43.3%)
Day 7 12:00 (6 d, 5 h)	6	47	46	27 (57.4%)	24 (52.2%)
Day 8 0:00 (6 d, 17 h)	10	73	73	44 (60.3%)	34 (46.6%)
合 計	32	236	236	146 (61.9%)	105 (44.5%)

a: 5 days and 5 hours post coitum of recipient females

集合胚および対照胚それぞれが、各々の発育ステージに占める割合については、屠殺・解剖日時ごとに、両者の間に有意差は認められなかった。

受胚マウス32匹のうち、左右両子宮角のいずれにも着床し、各子宮角の着床数が3個以上のもの12匹についてその胎子の体積を計測した (Table 6)。妊娠6日目12時屠殺・解剖の受胚マウス3匹および同7日目0時屠殺・解剖の2匹について、集合胚由来胎子の体積は、それぞれ、対照胚由来胎子の体積に比べて有意に高値であり ($P<0.01$)、胎子体積の比 (集合胚由来胎子の体積/対照胚由来胎子の体積) は1.9~2.1であった。妊娠7日目12時屠殺・解剖の受胚マウス3匹については、胎子体積の比は1.1~1.5であったが、集合胚および対照胚由来胎子の体積の間には有意差は認められなかった。妊娠8日目0時屠殺・解剖の受胚マウス4匹については、胎子体積の比は1.0~1.1で、両者の間に有意差は認められなかった。

考 察

Tarkowski(1961)はマウス8細胞期胚の透明帯を機械的に除去して作成したところその38%が集合胚であったことを報告した。Mintz(1969)、Mintz(1971)、McLaren(1976)、中川ら(1985)は、透明帯をプロナーゼ溶液で融解除去し同様に集合胚を作成したところ、それぞれ85%、85%、85%、90%の集合胚を得ている。本実験においても、プロナーゼ溶液で透明帯を融解除去した8細胞期胚2個を接着・集合させ、体外培養20~22時間後に、過去の報告に準ずる成功率 (93.7%) であった。マウス

Table 5 The developmental stages of aggregated and control embryos on early postimplantation.

Post-implantation stages	Recipient mice	Embryos transferred	Total	No. (%) of embryos at each developmental stage ^a						
				I ~ II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Day 6 12:00 (5 d, 5 h ^b)	R-01	Agg.	3	2	1					
		Cont.	3	2	1					
	R-02	Agg.	4	2	2					
		Cont.	3	1	2					
	R-03	Agg.	7	1	6					
		Cont.	7	2	5					
	Total	Agg.	14	5(35.8%) 9(64.2%)						
		Cont.	13	5(38.5%) 8(61.5%)						
	Day 7 0:00 (5 d, 17 h)	Agg.	5		1	4				
		Cont.	5		1	4				
	R-05	Agg.	6			4		2		
		Cont.	7			7				
Day 7 12:00 (6 d, 5 h)	Total	Agg.	11		1(9.1%)	8(72.7%)	2(18.2%)			
		Cont.	12		1(8.3%)	1(91.7%)				
	R-06	Agg.	6			5		1		
		Cont.	4			3		1		
	R-07	Agg.	5			1		4		
		Cont.	4			1		3		
	R-08	Agg.	4			2		2		
		Cont.	5			3		2		
	Total	Agg.	15			8(53.3%)	7(46.7%)			
		Cont.	13			7(53.8%)	6(46.2%)			
Day 8 0:00 (6 d, 17 h)	R-09	Agg.	6				3	3		
		Cont.	4				3	1		
	R-10	Agg.	6					6		
		Cont.	3					3		
	R-11	Agg.	6				1	5		
		Cont.	8				2	6		
	R-12	Agg.	6				5	1		
		Cont.	6				4	2		
	Total	Agg.	24				9(37.5%)	15(62.5%)		
		Cont.	21				9(42.9%)	12(57.1%)		

a : See Fig. 1 for key to stage number

b : 5 days and 5 hours post coitum of recipient mice

胚の8~16細胞期は割球(細胞)のそれぞれの分化が開始される発育段階とされている(Ducibella, 1977, Johnson et al., 1977, Johnson, 1979)。マウス胚の内側にある割球と外側の割球が胚盤胞に発育した時に、それぞれ内部細胞塊と栄養外胚葉に分化すると考えられている(Tarkowski & Wroblewska, 1967; Hillman et al., 1972)。8細胞期の2個の胚を接着・集合し、体外培養20~22時間後に1個の桑実胚または初期胚盤胞に発育したことから、8細胞期では、人為的

Table 6 The sizes of aggregated and control embryos at early postimplantation stage.

Post-implantation stage	Recipient mice	Mean size \pm S.D. ^a (no. of fetuses)		t-test ^b	Mean size ratio ^c
		Aggregated	Control		
Day 6 12:00 (5 d, 5 h ^d)	R-01	0.47 \pm 0.06 (3)	0.22 \pm 0.04 (3)	**	2.1
	R-02	0.38 \pm 0.03 (4)	0.19 \pm 0.02 (3)	**	2.0
	R-03	0.45 \pm 0.04 (7)	0.21 \pm 0.03 (7)	**	2.1
	Total	0.43 \pm 0.05 (14)	0.22 \pm 0.02 (13)	**	2.0
Day 7 0:00 (5 d, 17 h)	R-04	0.68 \pm 0.13 (5)	0.33 \pm 0.03 (5)	**	2.1
	R-05	0.83 \pm 0.08 (6)	0.42 \pm 0.05 (7)	**	1.9
	Total	0.76 \pm 0.13 (11)	0.38 \pm 0.06 (12)	**	2.0
Day 7 12:00 (6 d, 5 h)	R-06	1.42 \pm 0.27 (6)	0.92 \pm 0.18 (4)	NS	1.5
	R-07	1.72 \pm 0.33 (5)	1.57 \pm 0.37 (4)	NS	1.1
	R-08	1.31 \pm 0.16 (4)	0.95 \pm 0.16 (5)	NS	1.4
	Total	1.49 \pm 0.31 (15)	1.13 \pm 0.38 (13)	NS	1.3
Day 8 0:00 (6 d, 17 h)	R-09	5.71 \pm 0.83 (6)	5.63 \pm 1.13 (4)	NS	1.0
	R-10	6.78 \pm 1.02 (6)	6.81 \pm 0.49 (3)	NS	1.0
	R-11	6.98 \pm 1.17 (6)	6.56 \pm 0.98 (8)	NS	1.1
	R-12	4.85 \pm 0.80 (6)	5.03 \pm 0.71 (6)	NS	1.0
Total		6.07 \pm 1.25 (24)	5.98 \pm 1.10 (21)	NS	1.0

a: Volumes are expressed as $\mu\text{m}^3 \times 10^6$

b: t-test compares aggregated and control

** Significant differences ($P < 0.01$)

NS non-significant difference

c: Aggregated/Control

d: 5 days and 5 hours post coitum of recipient mice

な集合操作に対して分化の調整能を有していることが示唆された。

妊娠18日目の集合胚および対照胚由来の胎子の重量には、有意差は認められなかった。胎盤についても、同様の傾向が認められた。妊娠後期の集合胚由来の胎子および胎盤の重量については、BowmanとMcLaren (1970)、Tarkowski (1963)、Mintz (1971)、中川ら (1985) が、対照胚由来の胎子および胎盤の重量との間にそれぞれ、有意差は認められなかったと報告しており、本実験の結果と一致する。2個の胚から成る集合胚は、作成時に細胞数が対照胚の2倍であるにもかかわらず、妊娠18日目には、胎子および胎盤の重量に有意差が認められなかった。集合操作を施してから、妊娠

18日までの間に発育の調整が行われたことが示された。Tarkowski (1963) およびMintz (1971) は胚の“size regulation”は着床期になされると報告している。本実験では、集合胚および対照胚を受胚マウスに移植し、着床初期の時期に屠殺・解剖して、左右両子宮各に集合胚および対照胚がともに3個以上着床した受胚マウスについて、胎子の体積計測をおこなった。受胚マウスの解剖時刻が、妊娠6日目12時（交配後5日と5時間）の受胚マウス3匹、同7日目0時の受胚マウス2匹については、集合胚由来胎子の体積は、対照胚由来のものに比べて有意に高く、およそ2倍であった。しかし、同7日目12時の3匹では、両者の体積に有意差は認められず、体積比は受胚マウスの個体により、1.1～1.5であった。同8日目0時にあると、両者に体積の差は認められず、体積比は1.0～1.1となつた。Tarkowski (1963) は、8細胞期胚2個からなる集合胚由来胎子は、交配後6日半以降に正常な大きさの範囲に戻ると報告しており、BuehrとMcLaren (1974) は交配後5.7日以後、さらにRands (1986) は8細胞期胚4個からなる集合胚の胎子についても、交配後6.5日以降、両胎子の体積に有意差が認められないと報告している。本実験においても、妊娠7日目12時（交配後6日と5時間）以後は両者に有意差が認められず、過去の報告例とほぼ同じ傾向を示した。

本実験では、着床初期においては、妊娠日数が進むにつれて胎子体積は増加し、発育ステージが進む傾向が認められた。また、妊娠7日目12時および同8日目0時においては、胎子体積の平均値が高値の受胚マウスが、発育ステージがより進んでいた。妊娠7日目12時のR-07マウスは、R-06マウスに比べて胎子体積が高値で、発育ステージもより進んでいた。一方、体積比は、R-06マウスが1.5に対して、R-07マウスは1.1であった。したがって、R-07マウスはR-06マウスに比べて発育はより進んでおり、大きさ（体積）の調整（つまり体積比が1.0に近づくこと）の程度も進んでいたと思われる。

妊娠6日目12時から妊娠8日目0時までの時期を通して、集合胚と対照胚の間に発育に差は認められなかった。BuehrとMcLaren (1974) およびRands (1986) も同様の傾向があったことを報告している。しかし、LewisとRossant (1982) は、前羊膜腔の出現 (Fig. 1 の発育ステージの分類IIIにあたる) は集合胚の方が早く、これは胚の細胞数に依存している可能性を報告している。本実験では、集合胚と対照胚の発育の進み方に差は認められず、発育ステージの進み方は、胎子体積とは無関係であることが示された。

中川ら (1985) によれば、集合胚由来の胚盤胞の直径は、対照胚由来のものに比べて有意に大きく、およそ2倍であるという。胚盤胞に発育すると、割球は栄養外胚葉と内部細胞塊に分化するが、胎子は内部細胞塊から発生することが知られている (Gardner, 1972)。また、著者は集合胚由来の胚盤胞の内部細胞塊の細胞数は、対照胚由来のものに比べておよそ2倍であることを観察している (中川、未発表)。以上より、胎子の“size regulation”は、移植してから妊娠7日目12時（交配後6日と5時間）までに行われたと考えられる。妊娠6日目12時および妊娠7日目0時における胎子の体積比が、1.9～2.1であったことから、“size regulation”の開始時刻は、妊娠7日目0時（交配後5日と17時間）以降と考えられる。しかし、8細胞期胚4個からなる集合胚由来胎子では、着床前に

“size regulation” は始まっているという報告 (Rands, 1986) もあり、開始時期については、なお詳しい検討が必要と思われる。

文 獣

- 1) Bowman, P. & McLaren, A. (1970) Viability and growth of mouse embryos after in vitro culture and fusion. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 23, 693-704.
- 2) Brinster, R. L. (1963) A method for in vitro cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst. *Exp., Cell Res.*, 32, 205-208.
- 3) Buehr, M. & McLaren, A. (1974) Size regulation in chimaeric mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 31, 229-234.
- 4) Ducibella, T. (1977) Surface change of the developing trophoblast cell. In : *Development in Mammals*. Vol. 1, Ed. Johnson, M. H., Amsterdam, North-Holland.
- 5) Gardner, R. L. (1972) An investigation of inner cell mass and trophoblast tissues following their isolation from the mouse blastocyst. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 28, 279-312.
- 6) Hillman, N., Sherman, M.I. & Graham, C. (1972) The effect of spatial arrangement on cell determination during mouse development. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 28, 263-278.
- 7) Johnson, M. H. (1979) Intrinsic and extrinsic factors in preimplantation development. *J. Reprod. Fertil.*, 55, 255-265.
- 8) Johnson, M. H., Handyside, A. H. & Braude, P.R. (1977) Control mechanisms in early mammalian development. In : *Development in Mammals*. Vol. 1, Ed. Johnson, M. H., Amsterdam, North-Holland.
- 9) Lewis, N. E. & Rossant, J. (1982) Mechanism of size regulation in mouse embryo aggregates. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 72, 169-181.
- 10) McLaren, A. (1976) *Mammalian chimaeras*, Cambridge, Cambridge Univ. Press.
- 11) Mintz, B. (1962) Experimental study of the developing mammalian eggs: Removal of the zona pellucida. *Science*, 138, 594-595.
- 12) Mintz, B. (1969) Developmental mechanisms found in allophenic mice with sex chromosomal and pigmentary mosaicism. In: *First conference on the clinical delineation on birth defects*. Original article series 5, Eds. Bergsma, D. & McKusick, V., Newyork, Natinal Foundation.
- 13) Mintz, B. (1971) Genetic mosaicism in vitro : development and disease in allophenic mice. *Fed. Proc.*, 30, 935-943.

- 14) Mintz, B., Gearhart, J. D. & Guymout, A. O. (1973) Phytohemagglutinin-mediated blastomere aggregation and development allophenic mice. *Develop. Biol.*, 31, 195-199.
- 15) Nakagawa, A., Takahashi, Y. & Kanagawa, H. (1985) Viability of aggregated mouse embryos *in vitro* and *in vivo*. *Hokkaido cattle ET research*, 3, 28-34. (in Japanese)
- 16) Nicholas, J. S. & Hall, B. V. (1942) Experiments on developing rats. II. The development of isolated blastomeres and fused eggs. *J. Exp. Zool.*, 90, 441-459.
- 17) Rands, G. F. (1986) Size regulation in the mouse embryo. I. The development of quadruple aggregates. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 94, 139-148.
- 18) Tarkowski, A. K. (1961) Mouse chimeras developed from fused eggs. *Nature (Lond.)*, 3, 857-860.
- 19) Tarkowski, A. K. (1963) Studies on mouse chimeras developed from eggs fused *in vitro*. *Natl. Cancer Inst. Monograph*, 11, 51-71.
- 20) Tarkowski, A. K. & Wroblewska, J. (1967) Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 18, 155-180.
- 21) Whittingham, D. G. (1971) Culture of mouse ova. *J. Reprod. Fertil.*, Suppl. 14, 7-21.

過排卵処理した各種系統マウスの交尾率と 正常胚の回収数について

The copulation rate and the embryo recovery rate following
induced superovulation in various strains of mice.

横山峯介・日置恭司

Minesuke YOKOYAMA and Kyoji HIOKI

財団法人・実験動物中央研究所

Central Institute for Experimental Animals

Kawasaki 216, Japan

Abstract

The copulation rate and the average number of normal embryos were examined after superovulatory treatment with 5iu PMSG and 5iu hCG given 48h apart in the adult females of 23 inbred and 3 mutant strains. Significant strain differences were observed in the copulation rate (15.8-84.2%) as well as in the rate of normal embryos among those recovered (10.1-79.7%). Average number of normal embryos at the 8-16 cell stage, recovered on Day 2 of pregnancy, varied from 3.5 to 31.3 among the strains.

緒 言

近年、体外に取り出した哺乳動物の卵および初期胚に、種々の操作を施す発生工学的研究が著しい進歩を遂げた。とくに、マウスでは、トランスジェニックやキメラ、核移植等の技術が開発され(1,2,3,4)、活発に研究が行なわれている。これらの研究を実施するにあたっては、まず材料としての卵や初期胚が必要となる。また、現在は研究目的が多岐にわたり、特定のマウス系統を使用しなければならないこと多くなってきた。このようなことから、各種系統マウスの繁殖生理学的な特性を明らかにし、有効利用を計る検討の重要性も増加してきた。本実験では、前報(5)に引き続き、各種系統マウスの繁殖生理学的な特性を知ることを目的に、いくつかの近交系

とミュータント系を用いて過排卵処理後の交尾率を調べるとともに、交尾成立メスからの胚回収を行ない、その正常性を調べた。

材料および方法

マウス：当研究所で維持・生産された23系統の近交系と3系統のミュータント系を使用した。メスは未経産のものを10-18週齢で、オスは10週齢以上のものを交配用として実験に用いた。

飼育条件：動物室は温度 $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度50-60%、排気回数10-15回/時間、照明14時間(6:00点灯・20:00消灯)に調整した。飼育はプラスチック製ケージで、床敷はチップを用いた。これらは高圧蒸気滅菌(121°C ・20分・-600mmHg)して使用した。飼料は放射線滅菌した固体飼料(CA-1:日本クレア)を自由摂取させ、飲料水は水道水を与えた。

過排卵の誘起と交配：各系統のメスに妊娠血清性性腺刺激ホルモン(PMSG、セロトロビン:帝国臓器)を5iu腹腔内注射し、その48時間後にヒト総毛性性腺刺激ホルモン(hCG、ゴナトロビン:帝国臓器)を5iu同様に注射して過排卵を誘起した。処理は夕刻17:00-18:00に行なった。hCG注射後メスは直ちに同系のオスのケージ内に移し、一晩同居させた。なお、交配は1匹飼いのオスのケージ内にメスを1匹入れることを原則としたが、少數ではあるが2匹のメスを入れた場合も例数として含めた。交尾の確認は翌朝の9:00-10:00にメスの膣栓形成の有無を観察することによって行なった。

胚の回収と検査：交尾を確認したメスは、オスと分離して飼育し、膣栓を観察した日から2日後の11:00-14:00(hCG注射後67-70時間)に殺処分して胚を回収した。方法として頸椎脱臼法で殺処分したメスから子宮・卵管・卵巣をまとめて摘出し、ろ紙上でそれぞれを分離した。つぎに卵管はプラスチックシャーレ内の流動パラフィンで被われたメディウム中に移し、実体顕微鏡下($\times 25-40$)で30ゲージ注射針を用いて卵管采から子宮方向に少量のメディウムで静かに灌流した。また、子宮についても灌流を行なって胚を回収した。回収胚は各個体ごとにその数を計測し、さらに倒立顕微鏡下($\times 100-200$)で形態的な検査を行なった。なお、8-16細胞期にあるものを正常胚として、また2-7細胞期胚を発生遅延胚、さらに異常分割ならびに変性退行過程のものを異常卵として分類した。

結果および考察

1. ホルモン処理マウスの交尾率

PMSGとhCGを処理した各種系統マウスの交尾成績をTable 1.に示した。交尾率は、系統の違い

により大きな差が認められた。高いものは、MRL/MpJ-1pr, DBA/1N, C3H/HeN, BALB/cAで70%以上(71.6-84.2%)の値であった。逆に低いものは、LT/SvJ, AKR/N, SJL/Nで30%以下(15.8-26.1%)の値であった。使用した系統あたりでみると、50%以上の値を示したものが14系統(53.8%)、50%以下のものが12系統(46.2%)であった。ホルモン(PMSG-hCG)処理によって排卵および発情を誘起し、交配した場合の交尾率には、系統により差のあることが知られている(6)。本実験では、メスマウスの性周期を考慮せずにホルモン処理を行なったが、投与時期を性周期と合せることにより、さらに成績を向上させ得ることも考えられる。なお、交尾が不成立に終った個体でも、排卵は誘起されており、人工授精ならびに体外受精の技術を応用することによって、受精卵を作成することも可能である(7)。

2. 回収胚数とその正常性

各系統の交尾が確認された個体からの胚の回収成績をTable 1に示した。胚の回収数の多いものは、MRL/MpJ:55.1, IDT:48.7, NOD:47.7, P/J:47.3等で、自然排卵数に対する4-5倍の値であった。少ないものは、SJL/N: 9.0, NZW: 9.6, A/HeN:11.5, NZB:11.8等で、自然排卵数とほぼ同様の値であった。マウスでは、ホルモン(PMSG-hCG)処理による排卵誘起効果には系統差のあることが知られており(5,8)、本実験においてもこのことが明瞭に示された。

また、PMSGの単一処理でも自然排卵数に近い排卵が起ることが報告されている(9)。本実験でも、前処理のPMSG投与によって排卵したものが卵管および子宮に留っていて、hCG投与により排卵されたものと一緒に回収されたことが考えられる。これらPMSG投与で排卵した卵は、変性退行した異常卵として回収されたと推察されるが、hCG投与により排卵した卵で異常なものとの判別が不能なために、とくに区別せずに回収胚総数としてまとめた。

正常卵の回収数も系統によって大きな差が認められた。回収数の多いものは、SWV:31.3, NOD: 27.6, P/J:26.8, IDT:26.6で、自然排卵数の2倍以上の値であった。これらの系統はともに、回収胚総数に対する正常胚の割合が高い傾向があった。逆に低いものは、NZB: 3.5, AKR/N: 4.3, NZW: 4.4, MRL/MpJ-1pr:4.6, SJL/N:5.1, MRL/MpJ:5.6等で自然排卵数や生産の場における初回産仔数(日置ら、未発表)よりも少ない値であった。これらの系統は、回収胚総数に対する正常胚の割合も非常に低いものであった。

また、AKR/N, CBA/N, MRL/MpJ, MRL/MpJ-1pr等では、発生遅延胚とした2-7細胞期胚が、正常胚とした8-16細胞期胚よりも高い値で回収された。これらの胚の発生能については、十分な検討はしなかったが、マウスの胚発生速度には系統差のあることが報告されており(10)、これらの胚

Table 1. The number of embryos recovered after superovulation treatment with PMSG and hCG in adult females of various inbred and mutant strains.

Strain	No. of ¹⁾ females used	No. (%) of ¹⁾ females with copulation (A)	No. of ²⁾ embryos recovered	No. (%) of ²⁾ normal embryos (C)	Average no. of normal embryos	
		plug (B)		(C)	(C/B)	(C/A)
A/HeN	8	4 (50.0)	46	27 (58.7)	6.8	3.4
AKR/N	64	12 (18.8)	256	51 (19.9)	4.3	0.8
BALB/cA	141	101 (71.6)	1544	911 (59.0)	9.0	6.5
CBA/N	22	10 (45.5)	214	77 (36.0)	7.7	3.5
C3H/HeN	72	56 (77.8)	1096	873 (79.7)	15.6	12.1
C57BL/6N	104	45 (43.3)	921	569 (61.8)	12.6	5.5
C57BL/6-A ^W	14	5 (35.7)	108	55 (50.9)	11.0	3.9
C57BL/6-hg	15	10 (66.7)	268	130 (48.5)	13.0	8.7
C57BL/10ScN	29	16 (55.2)	367	223 (60.8)	13.9	7.7
CL/Fr	15	7 (46.7)	159	98 (61.6)	14.0	6.5
DBA/1N	14	11 (78.6)	247	124 (50.2)	11.3	8.9
DBA/2N	113	44 (38.9)	692	382 (55.2)	8.7	3.4
IDT	12	7 (58.3)	341	186 (54.5)	26.6	15.5
KK	72	41 (56.9)	858	589 (68.6)	14.4	8.2
LT/SvJ	19	3 (15.8)	91	55 (60.4)	18.3	2.9
MRL/MpJ	26	17 (65.4)	937	95 (10.1)	5.6	3.7
MRL/MpJ-1pr	19	16 (84.2)	516	74 (14.3)	4.6	3.9
NC	8	5 (62.5)	103	30 (29.1)	6.0	3.8
NFS/N	26	13 (50.0)	203	129 (63.5)	9.9	5.0
NÖD	18	7 (38.9)	334	193 (57.8)	27.6	10.7
NZB	30	16 (53.3)	188	56 (29.8)	3.5	1.9
NZW	44	23 (52.3)	220	101 (45.9)	4.4	2.3
P/J	11	4 (36.4)	189	107 (56.6)	26.8	9.7
SJL/N	92	24 (26.1)	215	123 (57.2)	5.1	1.3
SWV	23	9 (39.1)	316	282 (89.2)	31.3	12.3
129/SvJ	16	6 (37.5)	139	41 (29.5)	6.8	2.6

1) Each female was caged with a fertail male of the same strain immediately after hCG injection and was examined for the vaginal plug on the following morning (Day 1 of pregnancy).

2) Embryos were recovered on Day 2 of pregnancy (67-70h after hCG injection) by flushing the oviducts with embryo culture medium. Eight to 16 cell stage embryos were scored normal.

も回収の時刻を遅らせることにより、正常胚として得ることができると推察される。

交尾が不成立に終わった個体をも含めた使用メス総数に対する、正常胚の回収効率はIDT:15.5, SW:12.3, C3H/HeN:12.1, NOD:10.7で高く、逆にAKR/N: 0.8, SJL/N: 1.3, NZB: 1.9, NZW: 2.3, 129/SvJ: 2.6, LT/SvJ: 2.9で低かった。

以上のごとく、PMSGとhCGの処理により排卵と発情を誘起した後の交尾率には、系統により大きなバラツキのあることが再確認された。また、正常 8-16細胞期胚の回収数も系統の違い、および同一系統内でも個体によりバラツキが認められた。交尾率が低く、正常胚の回収率の悪い系統については、ホルモンの投与量や間隔、動物の日齢、性周期を考慮して、それぞれの系統に適合する条件を検討する必要があろう。また系統によっては、本実験で行なった誘起排卵処理ではなく、自然排卵したメスを交配し、胚を回収する方が効率的で確実かもしれない。また、より計画的に必要とする数の胚を得るために、体外受精技術の応用も有効と考えられる。

謝 辞

本研究は、文部省科学研究費一般研究(A)No.01440089の一部として実施された。

文 献

- 1) Gordon,J.W., Scangos,G.A., Plotkin,D.J., Barbosa,J.A., and Ruddle,F.H. : Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. Proc.Natl. Acad.Sci.USA 77:7380-7384, 1980.
- 2) Tarkowski,A.K. : Mouse chimaeras developed from fused eggs. Nature, 190:857-860, 1961.
- 3) Gardner,R.L. : Mouse chimaeras obtained by injection of cell into the blastocyst. Nature, 220:596-597, 1968.
- 4) McGrath,J. & Solter,D. : Nuclear transplantation in the mouse embryo on micro-manipulation and cell fusion. Science, 220:1300-1302, 1983.
- 5) 横山峯介、長谷川孝徳：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。哺乳卵研誌 6:151-155, 1989.
- 6) Yokoyama,M. Wakasugi,N. and Nomura,T. : An attempt to store inbred mouse strains. Frozen storage of Laboratory Animals, p.p 113-117. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart, 1981.

- 7) 横山峯介：系統維持と胚の凍結保存. 猿と化学療法 9:330-336,1982.
- 8) 石島芳郎、穴吹一広、遠藤克、猪 貴義、佐久間勇次：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 23:59-63,1978.
- 9) Kaufman,M.H. and Whittingham D.G. : Viability of mouse oocytes ovulated within 14hours of an injection of pregnant mares' serum gonadotrophin. J.Reprod.Fert.. 28:465-468,1972.
- 10) Whitten,W.K. and Dagg,C.P. : Influence of spermatozoa on the cleavage rate of mouse eggs. J.Exp.Zool.,148:173-183,1961.

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、次によつて行う。

- (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つてこれにあてる。

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

神奈川県藤沢市龜井野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

地球の温暖化が世界的に問題視されておりますが、今夏は、その影響とも思える酷暑となりましたが、会員の皆様におかれましては、益々御活躍のことと存じます。

本誌も哺乳動物卵子研究会誌として発刊する最後の号となりました。次号からは、学会誌として発刊する予定であり、投稿規定の一部改正を検討しております。

なお、今回の学術会議の学術研究登録団体への申請を行ないましたところ、本会および本会誌も無事登録されましたことをお知らせいたします。

現在、8巻1.2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 2 号

Vol.7

NO.2

平成 2 年 9 月 25 日 印刷

平成 2 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 藤沢市龜井野 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)

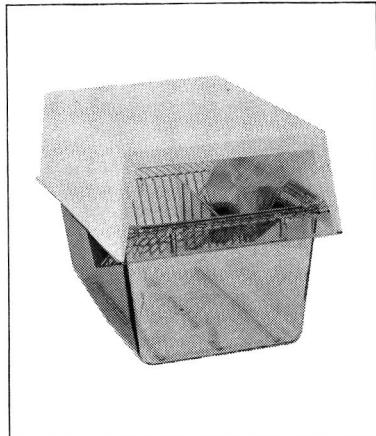
MEMO

MEMO

NEW!

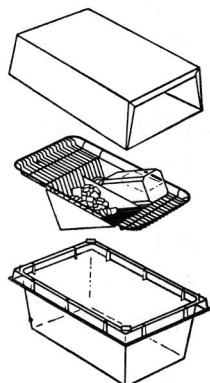
M-7 (Isocage & Isocap)

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プ可能な材質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

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替える。

【包 装】

パーゴナル注 75：10管
パーゴナル注150：10管



帝国臓器製薬株式会社
東京都港区赤坂二丁目5番1号

【使用上の注意】

1. 一般的注意

- 1) 本療法の対象は不妊症患者のうちの、間脳又は下垂体前葉の機能・器質的障害に由来する性腺刺激ホルモン低分泌無月経患者であるので次の点に注意すること。
 - ア. エストロゲン・プロゲステロンテストで初めて反応する第2度無月経又は抗エストロゲン療法（クエン酸クロミフェン、シクロフェニル等）が奏効しない第1度無月経の患者に投与すること。
 - イ. 患者の状態（例えばエストロゲン・性腺刺激ホルモン・ブレグナンジオール分泌、頸管粘液、基礎体温等）を詳細に検査し、子宮性無月経の患者には投与しないこと。
 - ウ. 原発性卵巣不全による尿中性腺刺激ホルモン分泌の高い患者、副腎・甲状腺機能の異常による無月経患者、頭蓋内に病変（下垂体腫瘍等）を有する患者、及び無排卵症以外の不妊患者には投与しないこと。
- 2) 本療法の卵巣過剰刺激による副作用を避けるため、投与前及び治療期間中は毎日内診を行い、特に次の点に留意し、異常が認められた場合には、直ちに投与を中止すること。
 - ア. 患者の自覚症状（特に下腹部痛）の有無
 - イ. 卵巣腫大の有無
 - ウ. 基礎体温の異常上昇の有無（毎日測定されること）。
- 3) 卵管粘液量とその性状
- 4) 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。
- 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 ときに悪心、頻尿、しびれ感、頭痛、浮腫があらわれることがある。また尿量が増加することがある。
5. 相互作用 胎盤性性腺刺激ホルモンとの併用により、卵巣の過剰刺激による卵巣腫大、腹水・胸水を伴ういわゆるMeigs様症候群があらわれることがある。

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

ANTRIN®

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

ビーメックス®

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

東京都品川区広町1-4-4

