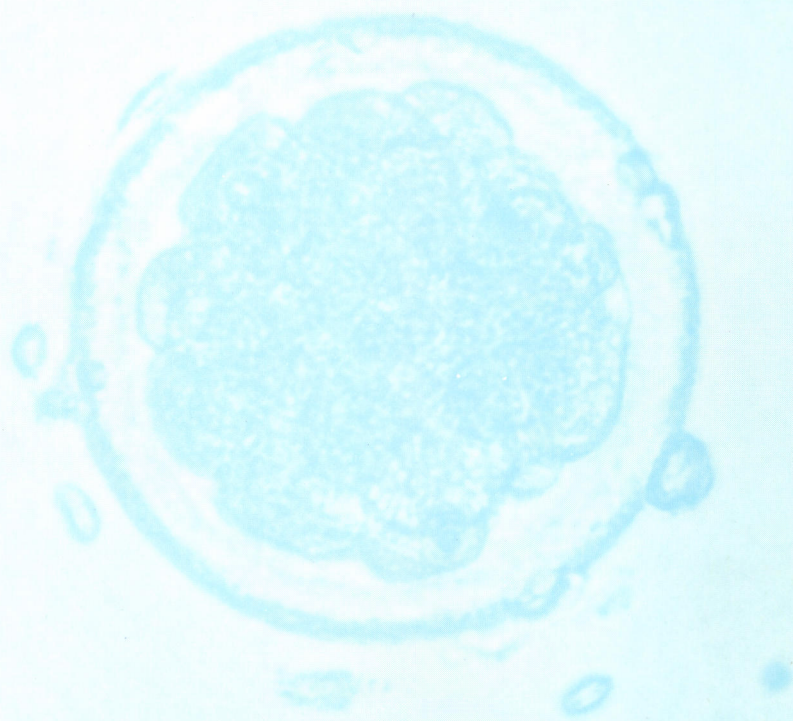


哺乳卵学誌  
J. Mamm. Ova Res.

# 哺乳動物卵子学会誌

Journal of Mammalian Ova Research



哺乳動物卵子学会  
Japanese Society of  
Mammalian Ova Research

Vol. 8 No. 1

April 1991



●牛の繁殖障害の  
分野に新しい可能性  
—可能性—  
!



タケダのすぐれた合成技術が生んだ  
LH放出ホルモン製剤

動物用医薬品

**コンセラル®注射液**

牛の卵胞のう腫、排卵障害、  
卵巢静止の治療、排卵促進に

(要指示)

製造発売元  
武田薬品工業株式会社

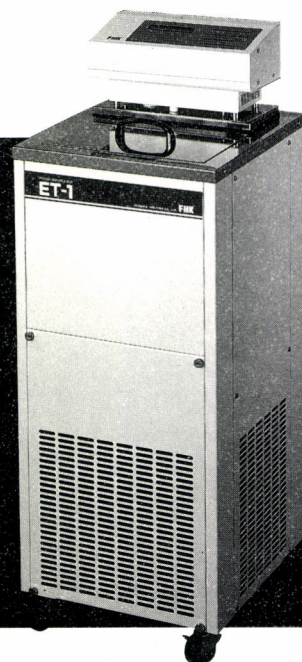
提携  
帝国臓器製薬株式会社

## 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
- 操作はキー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℃~50℃
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)3812-2271 ファクシミリ(03)3812-3663

# 哺乳動物卵子学会誌

第 8 巻 第 1 号

平成 3 年 4 月

## 目 次

原 著

凍結保存または凍結乾燥培養液(M16)によるマウス胚の体外培養ならびに  
培養胚の移植試験

加藤容子、亀喜淳一、角田幸雄----- 1

Glycerol-sucroseで凍結したウシ体外受精由来胚の One step 希釈による  
移植成績

大久範幸、高田直和、沼辺 孝、石川勇志----- 9

チャイニーズハムスター初期胚の培養

亀山祐一、石島芳郎----- 15

ラット卵子の体外培養，一無血清合成培地での 8 細胞期からの培養について－

松本浩道、菅原七郎、正木淳二----- 21

牛体外受精卵子の幹細胞化に関する研究

正木 全、柳 在雄、菅原七郎、正木淳二----- 27

射出精子を用いたウサギ卵子の体外受精に関する検討（英文）

後藤 勤、横田秀夫、佐藤嘉兵----- 34

牛屠場卵巢由来卵母細胞の採取後の時間経過と成熟・発生能との関係  
について

岡本かをり、藤井千春、西片芳恵、月原隆司、山本政生、鈴木達行----- 46

第32回哺乳動物卵子学会講演要旨集

特別講演

哺乳動物生殖系列細胞核の全能性と多能性

角田幸雄----- 53

一般演題

マウス老化期にみる生殖能と卵母細胞数の急減現象について

北嶋朋子、一戸喜兵衛----- 55

ブタ体外成熟・体外受精卵の雄性前核形成に及ぼすグルタチオン

合成阻害剤の影響

吉田光敏、番場公雄、小島義夫----- 57

牛卵子の卵核胞崩壊 (GVBD) に関わる細胞質要因について	建本秀樹、堀内俊孝、山田 學	59
体内および体外発育マウス胚におけるDNA・RNA合成の検討	原田 省、谷川正浩、大野原良昌、見尾保幸	61
マウス分離割球の発生に及ぼす分離及び再集合時期の影響	森 匡、小川英彦、清水 弘	63
細胞骨格系阻害剤を用いたマウス2細胞期胚の細胞周期の同調、 特に濃度の検討	加藤容子、角田幸雄	65
性腺機能低下症 (hypogonadal) マウスの体外受精の試み	橋爪一善、高木優二、辻井弘忠、濱島房則	67
ハタネズミ胚の初期発生	若山照彦、正田陽一、圓山悠子、小泉伸夫、今村憲吉、福田勝洋	69
ハムスター1細胞期胚培養による胚盤胞形成	馬岡 陽、野田洋一、内川喜久、大前ゆかり、成木勝彦、中山貴弘 後藤康夫、森 崇英	71
各種培養条件下でのラット前核期胚発育の検討	岸 淳二、野田洋一、成木勝彦、馬岡 陽、森 崇英	73
Hatching 前後における内細胞塊の形態異常	千田 智、鈴木雅洲、Lisellote Mettler	75
家兎受精卵着床のメカニズム	根上 晃、前田淳一、河原和美、富永敏朗	77
受精阻害抗透明帯モノクローナル抗体(5H4)が認識する ペプチドのアミノ酸配列について	長谷川昭子、井上みゆき、香山浩二、磯島晋三	79
牛体外受精胚細胞の幹細胞化に関する研究	正木 全、柳 在雄、菅原七郎、正木淳二	81
添加した牛初乳乳清と血清の種類が牛体外受精における胚盤胞への 発生率に及ぼす影響	山田 均、吉羽宣明、室賀友子、福島 毅	83
単為発生胚を宿主としたES細胞集合キメラ胚の発生能	徳永智之、岡崎正幸、古沢 軌、林 司、角田幸雄	85
Y染色体特異的配列の検出によるマウス初期胚の性判別	洗 美薇、国枝哲夫、小林栄治、東 貞宏、豊田 裕	87

ハムスターの卵管内精子移動に及ぼす排卵の影響	
伊藤雅夫、T.T.Smith、柳町隆造	89
ヒト体外受精卵の後期胞胚への発達過程について	
雀部 豊、安部裕司、臼井 彰、片山 進、久保春海	91
卵子内精子注入の試み	
淡路英雄、松井素子、小林善宗、本田育子、宗 完子、井上正人、藤井明和	93
凍結マウス精子の卵管内注入による新生仔の作成	
中潟直己	95
クライオバイアルを用いたマウス初期受精卵の超急速凍結保存について	
田谷順子、竹田 省、木下勝之	97
ラット卵巢のガラス化法による凍結保存	
——VS 1 100%液への直接浸漬——	
利部 聰、萬場光一、牧田登之	99
マウス初期胚発育に及ぼす酸化的ストレスの評価	
後藤康夫、野田洋一、成木勝彦、馬岡 陽、森 崇英	101
ホロ型及びアポ型トランスフェリンのマウス初期胚発生に及ぼす影響	
夏山 知、野田洋一、成木勝彦、馬岡 陽、森 崇英	103
ThioredoxinによるMouse 2-cell block解除効果	
夏山 知、野田洋一、成木勝彦、馬岡 陽、森 崇英	105
マウス胚の2-cell blockに及ぼすcalmodurinの影響	
山田 薫、西 慶子、佐藤嘉兵	107
ハムスター卵胞卵子の体外成熟におよぼす二、三の薬物の影響	
佐藤嘉兵、金田秀喜、横田秀夫	109
ウサギ精子の卵子への囲卵腔内注入による受精について	
横田秀夫、赤星 波、佐藤嘉兵	111
豚屠場卵巢卵胞内卵子の無血清培地における成熟について	
—— 2. インスリン添加の影響 ——	
山内伸彦、平田昌弘、菅原七郎、正木淳二	113
牛卵胞液および初期胚の線溶活性について	
堀内俊孝、山田 學、建本秀樹	115
ヒト卵巢におけるSuperoxide dismutaseの発現	
—— 卵および卵胞成熟との関連の観点から ——	
塩谷雅英、野田洋一、成木勝彦、馬岡 陽、森 崇英	117
体外受精—胚移植 (1990)	
小林善宗、本田育子、井上正人、宗 完子、藤井明和	119

# Journal of Mammalian Ova Research

Vol. 8 No. 1

April 1991

## Contents

### Originals

The storage of culture media (M16) by freezing or freeze-drying for the development of mouse embryos.

KATO, Y., J. KAMEKI & Y. TSUNODA ..... 1

Transfer by a one-step dilution method of bovine embryos derived from in vitro frozen in glycerol-sucrose.

OHISA, N., N. TAKADA, T. NUMABE & Y. ISHIKAWA ..... 9

In vitro culture of chinese hamster ova.

KAMEYAMA, Y. & Y. ISHIJIMA ..... 15

In vitro culture of rat eggs, — Development of the 8-cell stage in chemically defined medium —.

MATSUMOTO, H. S. SUGAWARA & J. MASAKI ..... 21

Isolation of the colony derived from bovine embryo in vitro fertilization.

MASAKI, T., Z. Y. RYOO, S. SUGAWARA & J. MASAKI ..... 27

A successful procedure for in vitro fertilization of rabbit eggs using by ejaculated spermatozoa.

GOTO, T., H. YOKOTA & K. SATO ..... 34

Relation of the in vitro maturation and the period of the time after aspiration of the oocytes from slaughtered ovaries in bovine.

OKAMOTO, K., C. FUZII, Y. NISHIKATA, T. TSUKIHARA,  
M. YAMAMOTO & T. SUZUKI ..... 46

Proceeding of the 32 th Annual Meeting Japan Society for Mammalian Ova Research.

Special report

Totipotency and pluripotency of nuclei in mammalian germ line.

TSUNODA, Y. .... 53

General report

The rapid decrease of female fecundability and the oocyte number in aging mice.

KITAJIMA, T. & K. ICHINOE ..... 55

Effect of glutathione synthesis inhibitor on the male pronuclear formation of pig oocytes matured and fertilized in vitro.

YOSHIDA, M., K. BAMBA & Y. KOJIMA ..... 57

Induction of germinal vesicle break down (GVBD) by cytoplasmic factors in bovine oocytes.

TATEMOTO, H., T. HORIUCHI & M. YAMADA ..... 59

DNA and RNA synthesis in mouse embryos developed in vivo and in vitro.	
HARADA, T., M. TANIKAWA, Y. ONOHARA & Y. MIO .....	61
Effect of stage of separation and re-aggregation on the development of mouse blastomeres.	
MORI, T., H. OGAWA & H. SHIMIZU .....	63
Synchronous division of mouse 2-cell embryos with nocodazole, with special reference to the minimal and maximal concentrations.	
KATO, Y. & Y. TSUNODA .....	65
In vitro fertilization in recessive hypogonadal mice.	
HASHIZUME, K., Y. TAKAGI, H. TSUJII & F. HAMASHIMA .....	67
Development of early stage embryos in the Japanese field vole, <i>Microtus montebeli</i> .	
WAKAYAMA, T., Y. SHODA, Y. MARUYAMA, N. KOIZUMI, K. IMAMURA & K. FUKUDA .....	69
Blastocyst formation in vitro of hamster embryos cultured from single cell stage.	
UMAOKA, Y., Y. NODA, K. UCHIKAWA, Y. OHMAE, K. NARIMOTO, T. NAKAYAMA, Y. GOTO & T. MORI .....	71
Rat pronuclear embryo culture under various conditions.	
KISHI, J., Y. NODA, K. NARIMOTO, Y. UMAOKA & T. MORI .....	73
Atypical inner cell mass formation before and after hatching.	
CHIDA, S., M. SUZUKI & L. METTLER .....	75
A mechanism of implantation of rabbit fertilized oocytes in vitro.	
NEGAMI, A., J. MAEDA, K. KAWAHARA & T. TOMINAGA .....	77
Amino acid sequence of a peptide fragment recognized by a fertilization-blocking monoclonal antibody (5H4) to zona pellucida.	
HASEGAWA, A., M. INOUE, K. KOYAMA & S. ISOJIMA .....	79
Isolation of the colony derived from bovine embryo in vitro fertilization.	
MASAKI, T., Z. Y. RYOO, S. SUGAWARA & J. MASAKI .....	81
Effects of the colostrum milk serum and serum in the culture medium on development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro.	
YAMADA, H., N. YOSHIBA, Y. MUROGA & T. FUKUSHIMA .....	83
Developmental potential of chimaeric embryos produced by aggregation between parthenogenetic 8-cell stage embryo and ES cells.	
TOKUNAGA, T., M. OKAZAKI, T. FURUSAWA, T. HAYASHI & Y. TSUNODA .....	85
Sexing of mouse early embryos by detection of Y-specific DNA sequences.	
XIAN, M., T. KUNIEDA, E. KOBAYASHI, S. AZUMA & Y. TOYADA .....	87
Effect of ovulation on sperm transport in the hamster oviduct.	
ITO, M., T. T. SMITH & R. YANAGIMACHI .....	89

Development of the human in-vitro fertilized eggs to late blastocyst.	
SASABE, Y. , Y.ABE, A. USUI, S.KATAYAMA, H.KUBO .....	91
Microinjection of human spermatozoa into human oocysts.	
AWAJI, H. , M.MATSUI, Y.KOBAYASHI, I.HONDA, H.SOU,	
M. INOUE & A.FUJII .....	93
Production of normal young following injection of frozen-thawed	
mouse spermatozoa into fallopian tubes of pseudopregnant females.	
NAKAGATA, N .....	95
Ultrarapid freezing of early stage mouse embryos by using cryoial.	
TAYA, J. , S. TAKEDA & K.KINOSITA .....	97
Cryopreservation of rat ovary by direct plunging into 100% of VS1.	
KAGABU, S. , K.MAMBA & T.MAKITA .....	99
The effects of oxidative stress on mouse embryo development.	
GOTO, Y. , Y.NODA, K.NARIMOTO, Y. UMAOKA & T.MORI .....	101
Effects of holo-and apo-transferrin on mouse pronuclear stage embryos.	
NATSUYAMA, S. , Y.NODA, K.NARIMOTO, Y. UMAOKA &	
T.MORI .....	103
Release of mouse 2-cell block by Thioredoxin.	
NATSUYAMA, S. , Y.NODA, K.NARIMOTO, Y. UMAOKA &	
T.MORI .....	105
Effect of calmodurin on 2-cell block of mouse embryos.	
YAMADA, K. , K.NISI & K.SATO .....	107
Effects of some drugs on in vitro maturation of hamster follicular oocytes.	
SATO, K. , H.KANEDA & YOKOTA .....	109
Fertilization of rabbit eggs by sperm injection into the perivitelline space.	
YOKOTA, H. , N.AKABOSI & K.SATO .....	111
In vitro maturation of porcine follicular oocytes cultured in	
serum free medium, — 2. Effect of insulin on oocytes maturation — .	
YAMAUCHI, N. , M.HIRATA, S.SUGAWARA & J.MASAKI .....	113
Fibrinolytic activity of bovine follicular fluid and the early	
bovine embryo.	
HORIUCHI, T. , M.YAMADA & H.TATEMOTO .....	115
Immunohistochemical expression of superoxide dismutase in human	
ovarian function.	
SHIOTANI, M. , Y.NODA, K.NARIMOTO, Y. UMAOKA &	
T.MORI .....	117
Results of IVF—ET(1990)	
KOBAYASHI, Y. , I.HONDA, M.INOUE, H.SOU & A.FUJII .....	119

凍結保存または凍結乾燥培養液(M16) による  
マウス胚の体外培養ならびに培養胚の移植試験

The storage of culture media(M16) by freezing or freeze-drying  
for the development of mouse embryos

加藤容子・亀喜淳一・角田幸雄

Yoko KATO, Junichi KAMEKI and Yukio TSUNODA

近畿大学農学部畜産学教室

Laboratory of Animal Reproduction,

College of Agriculture, Kinki University

Abstract: The present study was undertaken to examine the effects of culture media(M16) stored by freezing( $-20^{\circ}\text{C}$ ) or freeze-drying on the development of mouse zygotes or 2-cell embryos in vitro and in vivo.

Zygotes and 2-cell embryos were obtained from the superovulated CD-1 female mice mated with CD-1 males on 19~23 or 43~46 hrs after hCG injection, respectively. Zygotes with two pronuclei were cultured for 4 days with fresh and frozen media supplemented with  $100\mu\text{M}$  EDTA. Two-cell embryos were cultured for 3 days with fresh, frozen and freeze-drying media. Some blastocysts developed from zygotes or 2-cell embryos cultured with each media were transferred into the oviducts on day 0.5 or into the uteri on day 2.5 or 3.5 of pseudopregnant mice. They were killed on day 16.5 or 17.5 to examine the number of live fetuses. Cell numbers in both trophectoderm and inner cell mass of blastocysts on freeze-drying media were also examined.

High proportions of zygotes and 2-cell embryos cultured with frozen and freeze-drying media developed to blastocysts in vitro(59% and 86% for frozen medium, 89% for freeze-drying medium), and were not significantly different

compared with those obtained in fresh medium(59% and 86%).

The proportion of live fetuses after transfer of blastocysts developed from zygotes or 2-cell embryos with frozen medium(34% and 31%) were not significantly different from those obtained with fresh medium(35% and 39%, respectively). However, only 8% of embryos cultured with freeze-drying medium developed to fetuses. But, the cell numbers in trophectoderm and inner cell mass of blastocysts were not significantly different from those obtained with fresh medium.

The present study demonstrated that M16 medium could be preserved at least for 10 months at  $-20^{\circ}\text{C}$  without the decrease of its potency for the development of mouse embryos in vitro and in vivo. However, although the reason was not clear, freeze-drying of medium resulted in a drastical decrease in the percentage of embryos developing to live fetuses after transfer to recipients.

## 緒 言

現在、マウスでは前核期から胚盤胞期まで体外で高率に発生させることのできる化学合成培地がいくつか開発され、培養胚をレシピエントへ移植後正常な産子が得られている<sup>1-4)</sup>ことから、マウス胚の体外での操作に関する技術は一応確立していると思われる。胚を体外で扱う時の操作液や培養液の調整や条件は、体外培養時の胚の発生やその後の生存性に大きく関わってくる要因の1つである。そのため研究室ごとに様々な修正が加えられ、培養液は調整後1~2週間以内に使用する必要がある<sup>1, 5, 6)</sup>という考えが一般的である。

一方、培養液作製に要する労力を軽減するため、培養液を低温下に保存する試みがいくつかなされている。すなわち、Wales and Whittingham<sup>7)</sup>は1か月間、Shioda and Tsunoda<sup>8)</sup>は150日間、内田ら<sup>9)</sup>は10~30日間、マウス胚の体外での発生率を低下させることなく培養液を低温下に保存できることを報告している。使用する培養液、供試したマウスの系統や胚のステージなどによって低温保存できる期間は異なっているが、いずれの場合もさらに長期間保存するには凍結保存が好ましいと考えられている。しかしながら、培養液の凍結保存に関する検討は少なく、わずかに内田ら<sup>9)</sup>が $-30^{\circ}\text{C}$ に60日間保存した報

告があるにすぎない。

そこで本実験では、長期間凍結保存した培養液および凍結乾燥培養液を用いてマウス胚の体外培養を行い、さらに培養胚をレシピエントに移植後胎子への発生率を調べ、培養液の凍結ならびに凍結乾燥が胚発生に及ぼす影響について検討した。

### 材料および方法

#### 培養液(M16)の調整および保存

各試薬は、原法<sup>1)</sup>に従って保存液を作製し、炭酸水素ナトリウム、ピルビン酸ナトリウムおよびフェノールレッドは1週間ごとにその他は1か月ごとに作製したものを用いた。各保存液は、規定量を混合後、5%炭酸ガス95%空気の混合ガスを10分間通気し、ウシ血清アルブミン(BSA, No. A-4378, シグマ社製)を添加した。ついで、フィルター滅菌(0.45  $\mu$ , ミリポア社製)後、凍結用培養液はプラスチック製ディスポーザブルの小試験管に分注後-20℃のフリーザー内に10か月間保存した。また、培養液の凍結乾燥は、滅菌済ガラス製小ビンに1mlずつ分注しておこない、凍結乾燥後は密栓しパラフィルムで栓を覆ったのち-20℃のフリーザー内に保存した。

凍結培養液は、体外培養の前々日に冷蔵庫内(4℃)に静置して融解し、凍結乾燥培養液は1mlの再蒸留水を添加して調整後、それぞれ前日に流動パラフィンで覆ったプラスチックディッシュに小滴を作り、ガス平衡をおこなった。なお、対照区としては調整後1か月以内の新鮮M16液を用いた。培養は、流動パラフィン下のそれぞれの培養液の小滴内で行った。

#### 採卵、体外培養および移植

供試マウスはCD-1系成熟雌にPMSGおよびhCGをそれぞれ5IUずつ48時間間隔で注射することによって過剰排卵を誘起し、同系統の成熟雄と交配後、翌朝膣栓の確認できたものを用いた。前核期卵は、hCG注射後19~23時間目に卵管膨大部を裂き、ヒアルロニダーゼ(300IU/ml, BSA 欠 M2<sup>10)</sup>)で卵丘細胞を除去したのち、前核が2個確認できたものを実験に供した。2細胞期胚は、hCG後43~46時間目にM2で卵管を灌流することによって回収した。

採取した前核期卵は、対照の新鮮培養液と凍結後10か月目に融解した培養液とを用いて4日間体外培養し、胚盤胞への発生率を調べた。なお、培養にはそれぞれの培養液に100

$\mu\text{M}$  となるようにEDTAを添加してin vitro 2-cell block<sup>11)</sup>の解除をおこなった。また、2細胞期胚は対照、凍結および凍結乾燥の培養液を用いてそれぞれ3日間体外培養し、胚盤胞への発生率を調べた。

前核期卵、2細胞期胚のどちらを用いた場合も、胚盤胞へ発生したものについては、一部移植試験を行い胎子への発生能を調べた。レシピエントには、精管結紮雄と交配した偽妊娠マウス(CD-1)を用い、0.5日目の卵管あるいは2.5または3.5日目の子宮へそれぞれ3~10個ずつ移植した。いずれのレシピエントも妊娠16.5~17.5日目にと殺して生存胎子数を調べた。

また、凍結乾燥培養液を用いて培養した一部の胚については、胚盤胞期において細胞数を計測しコントロール区と比較した。方法は、Papaioannou and Ebert(1988)<sup>12)</sup>、Iwasaki et al(1990)<sup>13)</sup>に従って二重蛍光染色法によって実施し、栄養外胚葉と内細胞塊の細胞数をそれぞれ別個に計測した。

## 結 果

Table 1に、凍結培養液および凍結乾燥培養液を用いて体外培養をおこなった場合の前核期卵および2細胞期胚の胚盤胞への発生率と、レシピエントへ移植後の胎子への発生率を示した。前核期卵を用いた場合、凍結培養液では58%(101/175)が胚盤胞へ発生し、また67個の胚盤胞を9匹のレシピエントに移植した結果7匹(78%)が妊娠し、23匹(34%)の生存胎子を得た。これらは、新鮮培養液を用いて得られた胚盤胞への発生率(59%, 102/174)、レシピエントに移植後の妊娠率(75%, 6/8)および生存胎子生産率(35%, 22/62)と比べていずれも有意な差ではなかった。

Table 1 The effect of frozen or freeze-drying culture media on the development of mouse zygotes or 2-cell embryos in vitro and in vivo.

The stage of embryos	Media	No. of embryos cultured	No. of embryos developed to blastocysts(%)	No. of blastocysts transferred	No. pregnant/ No. of recipients (%)	No. of live fetuses (%)
Zygotes	Fresh	174	102(59)	62	6/8 (75)	22(35)
	Frozen	175	101(58)	67	7/9 (78)	23(34)
2-cell	Fresh	465	398(86)	228	31/37 (80)	90(39)
	Frozen	168	159(95)	123	12/15 (80)	38(31)
	Freeze-drying	288	255(89)	106	8/22 (36)	9(8)

また、2細胞期胚を用いた場合、新鮮培養液では86%(398/465)が胚盤胞へ発生し、228

個の胚を37匹のレシピエントに移植した結果31匹(80%)が妊娠し、合計90匹(39%)の生存胎子が得られた。また、凍結培養液を用いた場合も95%(159/168)が胚盤胞へ発生し、123個を15匹に移植したところ12匹(80%)が妊娠して、38匹(31%)の生存胎子が得られ、これらは前核期卵の場合と同様に新鮮培養液を用いて得られた成績に比べて大差はみられなかった。これに対して、凍結乾燥培養液を用いた場合は高率に(89%, 255/288)胚盤胞へ発生したが、レシピエントに移植後の胎子生産率は8%と極めて低かった。

Table 2 に凍結乾燥培養液を用いて得られた胚盤胞の細胞数を示した。表に示すように、内細胞塊および栄養外胚葉に含まれる細胞数(平均20および66個)は、いずれも新鮮培養液を用いて得られた胚盤胞の細胞数(21 および64個)と比べて大差がみられなかった。

Table 2 The effect of freeze-drying culture medium on the cell numbers of blastocysts.

Media	Cell number in *	
	Trophoectoderm	Inner cell mass
Fresh	66 $\pm$ 14	20 $\pm$ 7
Freeze-drying	64 $\pm$ 8	21 $\pm$ 3

\* Mean $\pm$ S. D.

## 考 察

Shioda and Tsunoda(1988)<sup>8)</sup>は、マウス胚の体外培養に広く用いられている化学合成培地であるM16 液は、体外における胚盤胞への発生率およびレシピエントに移植後の産子生産率を低下させることなく3.6℃の冷蔵庫内に少なくとも150日間保存できるが、150日を越えると発生率が低下することを報告している。また、内田ら(1989)<sup>9)</sup>は、-30℃に60日間凍結保存した培地を用いても、2細胞期胚は高率に胚盤胞へ発生することを明らかにしている。本実験ではM16 液がさらに長期間凍結保存可能か否か、また凍結乾燥をおこなった場合、それらの培養液が胚の生存性に影響を及ぼすか否かを検討するため、10ヵ月間凍

結保存あるいは凍結乾燥した培養液を用いて、前核期卵と2細胞期胚の体外培養ならびに培養胚の移植試験をおこなった。

その結果、Table 1に示すようにどちらの发育ステージの胚を用いた場合でも、凍結保存培養液を用いた場合は胚盤胞への発生率およびレシピエントに移植後の胎子生産率は新鮮M16液を用いて得られた成績と大差がみられなかった。このことから、M16液は $-20^{\circ}\text{C}$ の凍結状態で少なくとも10カ月間保存できると考えられた。なお、凍結培養液を融解後培養液中に沈澱物がみとめられたため、 $0.45\mu$ のフィルターで濾過をおこなったのち使用したが、前核期卵と2細胞期胚のどちらの発生にも影響はみられなかった。

これに対して、培養液を凍結乾燥すると新鮮培地を用いた場合と大差がなく高率に胚盤胞へ発生したが、レシピエントへ移植後の胎子生産率は極めて低かった。マウス初期胚が体外で发育するにもかかわらず、レシピエントに移植後産子へ発生しえない主な原因として、一般的に1). 胚の細胞数の減少、2). 染色体異常の2つの理由が考えられる。本実験では、胚の発生過程を新鮮培地を用いた場合と比較して検討したが、4細胞および8細胞への分割時期、compactionおよび胚盤胞形成時期などに明らかな差は認められなかった。また、得られた胚盤胞の細胞数を内細胞塊と栄養外胚葉とに分けて測定したが、いずれも新鮮培養液を用いて得られた胚盤胞の場合と大差がみられなかった。このことから、凍結乾燥培地を用いて得られた胚盤胞の産子への発生率が低い原因は少なくとも細胞数の問題ではないと考えられた。また、一部のレシピエントで着床痕率を調べたところ53%ときわめて高く、このことからおそらく得られた胚盤胞の染色体には数的あるいは構造異常が生じたため妊娠途中で死滅したものと考えられるが、本実験ではこれらを明確にすることはできなかった。

## 謝 辞

本研究は、科学技術庁振興調整費「発生工学技術の開発等に関する研究」、文部省科研費(01102028)、ヒューマンサイエンス財団基礎研究事業費、バイオ科学研究所(山形市)特別助成金、稲盛財団助成金ならびに近畿大学学内助成金により実施された。

## 文 献

- 1) Whittingham, D. G. (1971). Culture of mouse ova. J. Reprod. Fert., Suppl. 14, 7~21.

- 2) Whitten, W. K. and Biggers, J. D. (1968). Complete development in vitro of the preimplantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium. *J. Reprod. Fert.*, 17, 339~401.
- 3) Kasai, K., Minato, Y. and Toyoda, Y. (1978). Fertilization and development in vitro of mouse eggs from inbred and F<sub>1</sub> hybrids. *Japan. J. Anim. Reprod.*, 24, 19~22.
- 4) Mehta, T. S. and Kiessling, A. A. (1990). Development potential of mouse embryos conceived in vitro and cultured in ethylenediaminetetraacetic acid with or without amino acids or serum. *Biol. Reprod.*, 43, 600 ~606.
- 5) Kaufman, M. H. (1983). Methodology: in vitro and in vivo activation techniques. In *Early Mammalian Development: Parthenogenetic studies*, Edited by Kaufman, M. H., Cambridge. Cambridge University Press, P. 20.
- 6) 館鄰 (1984). マウスキメラ, "哺乳類の発生工学" 大沢仲昭、江藤一洋、館鄰、御子柴克彦編、ソフトサイエンス社、p. 140.
- 7) Wales, R. G. and Whittingham, D. G. (1970). Decomposition of sodium pyruvate in culture media stored at 5°C and its effects on the development of the preimplantation mouse embryo. *J. Reprod. Fert.*, 24, 126. (abstr.)
- 8) Shioda, Y. and Tsunoda, Y. (1988). Storage of culture medium (M16) for the development of mouse zygotes in vitro and in vivo. *Japan. J. Fertil. Steril.*, 33(4), 803~806.
- 9) 内田昭弘、高橋健太郎、吉野和男、草刈万寿夫、山崎裕行、北尾学 (1989). マウス 2 cell胚を用いた培養液の検討、日本不妊学会誌、34(2), 331 ~335.
- 10) Fulton, B. P. and Whittingham, D. G. (1978). Activation of mammalian oocytes by intracellular injection of calcium. *Nature*, 273, 149~151.
- 11) Whitten, W. K. and Biggers, J. D. (1968). Complete development in vitro of the preimplantation stage of the mouse in a simple chemically defined medium. *J. Reprod. Fert.*, 17, 399~401
- 12) Papaioannou, V. E. and Ebert, K. M. (1988). The preimplantation pig embryo: cell number and allocation to trophectoderm and inner cell mass of the blastocysts

in vivo and in vitro. Development, 102, 793 ~ 803.

- 13) 岩崎説雄、吉田豊、渡辺誠喜、中原達夫(1990). 二重螢光染色法による体外受精由来牛胚盤胞の栄養外胚葉と内細胞塊の分別染色と細胞数の計測、家畜繁殖誌、36, 60 ~ 65.

# Glycerol-sucroseで凍結したウシ体外受精由来胚の One step 希釈による移植成績

Transfer by a one-step dilution method of bovine embryos  
derived from in vitro frozen in glycerol-sucrose.

大久範幸・高田直和・沼辺 孝・石川勇志

Noriyuki OHISA, Naokazu TAKADA, Takashi NUMABE  
and Yushi ISHIKAWA

宮城県畜産試験場 玉造郡岩出山町樋渡1

Miyagi Prefectural Animal Industry Experiment Station, Hiwatashi 1 Iwadeyama-machi

Abstract: Embryos for freezing were obtained by the way of in vitro fertilization of bovine oocytes matured in vitro and subsequently cultured in vitro for seven days. Embryos (stage ranging from blastocyst to expanded blastocyst) were directly placed into PBS containing cryoprotectant such as 1.4M glycerol or combining 1.4M glycerol and 0.2M sucrose. Embryos were equilibrated for 15~20 minutes at room temperature, and a single embryo was loaded into the middle part of straw in a small volume of freezing medium separated by two air bubbles from 0.3M sucrose filling the rest of the straw, next then it was deeply frozen with program freezer and then stored at  $-196^{\circ}\text{C}$ . The frozen embryos were thawed by plunging straws directly into warm water at  $37^{\circ}\text{C}$ . After frozen embryos have thawed they were mixed by rapidly shaking, and then transferred singly or in pair into recipient cows non-surgically. Pregnancy rates of embryos frozen in glycerol and glycerol-sucrose were 40%(4/10), 53%(21/40) respectively, and the rate of embryos frozen in glycerol-sucrose were developed to normal fetus higher than those frozen in glycerol only. It is suggest that sucrose can be used in combination with glycerol as a cryoprotectant and that a high rate of pregnancy can be achieved after a one-step dilution of the cryoprotectants.

## 緒 言

Whittinghamら<sup>1)</sup>やWilmutら<sup>2)</sup>によってマウス胚の凍結保存技術が開発されて以来、各種動物胚の凍結保存方法の研究開発が行われてきた。凍結ウシ胚についてもストロー内で耐凍剤を除去する方

法が開発され<sup>3, 4)</sup>、現在は、この方法が実用化されつつある。

一方、凍結保存したウシ体外受精由来胚の移植試験では、受胎率が凍結体内受精由来胚のそれと比べ著しく低いのが現状である<sup>5, 6)</sup>。

最近、耐凍剤としてglycerolとsucroseの混合液を用い体内受精由来牛胚を凍結し、耐凍剤を除去することなく移植し、glycerolのみで凍結した場合に比べ高い生存率と受胎率が得られている<sup>7, 8)</sup>。

そこで、本研究ではウシ体外受精由来胚の凍結保存方法について耐凍剤と保存後の発生について以下の実験を行った。すなわち、耐凍剤として1.4M glycerolおよび1.4M glycerolと0.2M sucroseを用い、これらの混合液で凍結し、融解後0.3M sucroseで1段階希釈を行い、胚の生存を確認することなく移植し、受胎性を検討した。

## 材料および方法

1. 供試胚：未成熟卵の採取と体外成熟および媒精後の体外発育は、既報<sup>9)</sup>に従って行い、体外受精は山田らの報告<sup>10)</sup>に従って行った。すなわち、凍結精液を融解後、牛血清アルブミン (BSA)を除いた修正タイロッド液(BO:Bracket and Oliphant<sup>11)</sup>)にカフェイン10mM添加液(Caf-B0液)で希釈し、遠沈(400g)操作を2回行い精子を洗浄した。洗浄後、精子濃度をCaf-B0液で $2.0 \times 10^7$ 精子/mlに調整した精子浮遊液をHep-BSA-B0液(20mg/ml BSAと10IU/mlヘパリンを添加した修正タイロッド液)で等倍に希釈した。この精子浮遊液を100ulの小滴にして流動パラフィンで覆い、炭酸ガス培養器で15分間前培養した。これにHep-BSA-B0液で2回洗浄した体外成熟卵を約50個ずつ導入した。

なお、供試胚は凍結保護物質に浸漬したのち、収縮を起こした時点で、胚の輪郭が明瞭で変性部分がみられないものをAランク、胚の10%に変性が認められるものをBランク、それ以上のものをCランクとし、今回はAランクの胚のみを用いた。

2. 凍結方法：凍結保護物質は1.4M glycerol加phosphate buffered saline(PBS) (以下、G)と1.4M glycerolを添加した0.2M sucrose加PBS (以下、G-S)を用いた。

まず胚を2種類の凍結保護物質にそれぞれ15～20分間平衡し、Fig1に示したように、0.25mmのストロー内を凍結保護物質と0.3M sucroseを空気層で分離し、一個ずつ吸引し封入した。次いでストローをプログラムフリーザー (planner R204)により、室温から-7℃まで毎分-6℃で冷却し、-7℃で植氷したのち10分間保持した。G処理区では、-7℃から-30℃まで毎分-0.3℃で、G-S処理区では-23℃まで毎分-0.5℃で降下させ、それぞれ10分間保持したのち、液体窒素に投入した。

3. 移植：凍結した胚は、7～30日間液体窒素に保存したのち、37℃の温湯で融解しストロー内で0.3

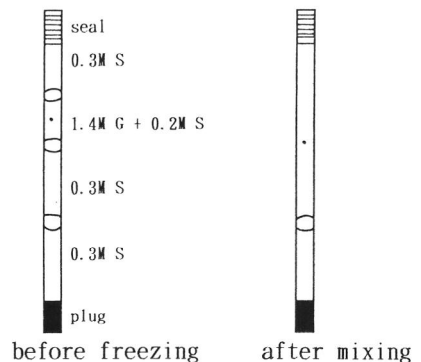


Fig.1. Diagram of one-step dilution carried out within straw. S:0.3M sucrose C:1.4M glycerol or 1.4M glycerol + 0.2M sucrose.

M sucroseと混合し、5分間静置したのち移植した。移植は6人の移植師により両子宮角に1個ずつ、または片側子宮角に1個のみを非外科的に行った。

## 結 果

胚の移植結果をTable 1に示した。G処理区では10頭に2個の胚を移植したところ、4頭が受胎し受胎率は40%であった。

また、G-S処理区では1個の胚を4頭に移植したところ、2頭が受胎し受胎率は50%、2個の胚を40頭に移植したところ21頭が受胎し受胎率は53%であった。

Table 1. Pregnancies after transfer of embryos derived in vitro frozen  
in 1.4M glycerol or 1.4M glycerol-0.2M sucrose in PBS‡

Cryoprotectant	No. of embryos/recipient	No. of recipient	No. of pregnancies(%)
1.4M glycerol in PBS	2	10	4(40)
1.4M glycerol +	1	4	2(50)
0.2M sucrose in PBS	2	40	21(53)

‡PBS Phosphate buffer salin

Embryos transferred after one-step dilution by 0.3M sucrose

## 考 察

ウシ体外受精由来胚を1.4M glycerol (G) および1.4M glycerolと0.2M sucroseの混合液 (G-S)<sup>7, 12)</sup>を凍結保護物質として凍結し、融解後ストロー内で凍結保護物質を除去(ワンステップ希釈法)し、受胎性を検討した。その結果、G-Sで凍結した胚の受胎率は58%であり、Gで凍結した胚の受胎率40%に比較して高かった。

Massipら<sup>7)</sup>はウシ体内受精由来胚をGとG-Sを用いて凍結、融解して移植しそれぞれ42%、52%の受胎率であったと報告しており、本実験の結果と同様の成績であった。しかし、ウシ体外受精由来胚をGで凍結、融解、移植し得られた受胎率は、従来の体内受精由来牛胚の成績<sup>13, 14, 15)</sup>に比べて低かった。この要因として、完全体外培養で作出したウシ胚の細胞数は家兎卵管内で培養し作出したウシ胚に比べ少ない<sup>16)</sup>ことなどから、ウシ体外受精由来胚も生体内由来牛胚に比べて細胞数が少なく凍結、融解時にさらに破壊し、減少した<sup>17)</sup>結果と考えられる。一方、G-Sで凍結した胚で高い受

胎率が得られたのは、耐凍剤にsucroseを添加することで胚に流入する耐凍剤の量が減少し、また融解後、復水量が過度に流入しないためや<sup>12)</sup>、それにsucroseはtrehaloseと同様に細胞膜の保護作用が指摘されており<sup>18)</sup>、このようなsucroseの物理的特性が凍結による細胞数の減少を最小限に抑え、胚の生存性を高めたものと思われる。

しかし、胚をG-Sで凍結、融解したのち耐凍剤を除去せず移植した場合、胚にはGが残存し、その後の生存性に悪影響を及ぼす可能性がある。Massipら<sup>7, 12)</sup>は、ストロー内にG-Sの混合液のみで、鈴木ら<sup>8)</sup>は、G-Sの混合液層の他に0.2~0.35MのS層を配置し、-23~-25℃で液体窒素に投入しストロー内で希釈することなく直接移植し、それぞれ52, 57%の受胎率を得ている。これらの成績は単純に比較できないが、胚の存在するGの量により差ができたものと推察される。つまり後者は、ストロー内にGを含まない0.2M~0.3MのS層を設けることで、子宮内での一段階希釈によるGの除去を期待したものと思われる。本実験も融解後、ストロー内で0.3M SによってGを除去したことが受胎率を高める要因になったと考えられる。

また、従来凍結に用いられる胚の品質評価はLindner<sup>19)</sup>の方法により培養液内で判定されているが、この方法では、特にウシ体外受精由来胚の胚盤胞~拡張胚盤胞では変性細胞の存在が明確に判定できないことがある。一方、本実験では、胚を耐凍剤に浸漬して形態評価を行ったところ、変性細胞においては耐凍剤の細胞浸透が悪いもしくは遅延するため変性部分の割合が明瞭に確認できた。本実験も耐凍剤の中で胚を評価し凍結したため、良好な結果が得られたと考えられる。

今回の移植結果は、凍結した体内受精由来牛胚の2個移植の成績<sup>20)</sup>に比べて遜色のないものであった。しかし、凍結可能なAランクの胚が発生した胚の40~50%程度であり、今後品質が低下した胚の凍結方法も検討する必要がある。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、本論文の御校閲を賜った東北大学農学部菅原七郎助教授に深謝致します。

## 文 献

- 1) Whittingham, D. G., Leibo, S. P. and Mazur, P. (1972). Survival of mouse embryos frozen to -196 and -296°C. Science, 178, 411-414.
- 2) Wilmut, I. (1972). The effect of cooling rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. Life Science 11, 1071-1079.
- 3) Liebo, S. P., West, A. W. III. and Perry, B. (1982). A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. I. Basic studies. Cryobiology, 19, 673(abstr).
- 4) Renard, J. P., Heyman, Y. and Ozil, J. P. (1982). Congelation de l'embryon bovin: une nouvelle

methode de decongelation pour le transfert cervical dembryons conditionnes une sevre  
fois en paillettes. Ann. Med. Vet., 126, 25-32.

- 5) Kometani, N., Kobayashi, S., Shimonaka, Y., Saito, S., Koshiba, Y., Hishiyama, K., and Shiroya, K. (1989). Direct transfer of frozen bovine embryos derived from in vitro fertilization. Jps. J. Zootech. Sci., 82, 115(abstr.)(in Japanese).
- 6) Nishikata, Y., Okamoto, K., Tukahara, T., Ooe, M., Yamamoto, M. and Suzuki, T. (1990). Pregnancy rate of fresh and frozen embryo derived from in vitro fertilization. Jpn. J. Anim. Reprod., 78, 55(abstr.)(in Japanese).
- 7) Massip, A., Van. Der. Zwalmen. P. and Ectors, F. (1987). Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. Theriogenology, 27, 69-79.
- 8) Suzuki, T., Ishida, T., Sakai, Y. (1989). Cryopreservation of bovine embryos in the medium with glycerol(1.4M)and sucrose. Jpn. J. Anim. Reprod., 35(3), 125-129(in Japanese).
- 9) Takada, N., Ohisa, N., Numabe, T. and Ishikawa, Y. (1990). Conception rate after transfer of japanese black cattle embryos producer in vitro. Vet. Rec., 126, 581-582.
- 10) Yamada, H., Sato, T., Kitamura, S., Shioya, Y. and Hanada, A. (1988). Developmental rates to the blastocyst stage of bovine oocytes fertilized in vitro using epididimal and ejaculated spermatozoa. Jpn. J. Anim. Reprod., 32, 67(abstr.)(in Japanese).
- 11) Brackett, B. G. and Oliphant, G. (1975). Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. Biol. Reprod., 12, 260-274.
- 12) Massip, A. and Van. Der. Zwalmen. P. (1984). Direct trasfer of frozen cow embryos in glycerol-sucrose. Vet. Rec., 115, 327-328.
- 13) Renard, J. P., Heyman, Y., Leymonie, P. and plat, J. C. (1983). Sucrose dilution: A technique for field trnsfer of bovine embryos frozen in the straw. Theriogenology, 19, 145(abstr. ).
- 14) Heyman, Y. and Chesne, P. (1984). Freezing bovine embryos: Survival after cervical transfer of one half, one or two blastocysts frozen in straw. Theriogenology, 21, 240(abstr. ).
- 15) Nieman, H. (1985). Freezing of bovine embryos: Effects of a one-step addition of 1.4M glycerol. Theriogenology 23, 369-379.
- 16) Iwasaki S. and Nakahara, T. (1990). Cell number and incidence of chromosomal in bovine blastocysts fertilized in vitro followed by culture in vitro or in vivo in rabbit oviduct. Theriogenology, 33, 669-675.
- 17) Niemann, H., Sacher, B., Schilling, E., Smidt, D. (1982). Improvement of survival rates of bovin blastocysts with sucrose for glycerol dilution after a fast freezing and thawing method. Theriogenology, 17, 102(abstr. ).
- 18) Crow, L. M., Mouradian, R., Crow, J. H., Jackso, S. A. and Womersley, C. (1984). Effects of carbo-hydrates on on membrane stability at low water activities. Biochim. Biophys. Acta., 769,

141-150.

- 19) Lindner, G. M. and Wright, R. W. (1983). Bovin embryo morphology and evaluation. *Teriogenology*, 20, 407-416.
- 20) Suzuki, T., Sakai, Y., Ishida, I., Matsuda, S., Miura, H. and Itoh, K. (1989). Induction of twinning in crossbret heifers by ipsilateral frozen embryo transfer. *Theriogenology*, 31, 917-926.

## チャイニーズハムスター初期胚の培養

### In Vitro Culture of Chinese Hamster Ova.

亀山 祐一・石島 芳郎

Yuichi KAMEYAMA and Yoshiro ISHIJIMA

東京農業大学生物産業学部動物資源学研究室

Laboratory of Animal Resources, Faculty of Bioindustry,  
Tokyo University of Agriculture.

Abstract: Late 2-, late 4- and 8-cell chinese hamster ova were cultured in M16, M16+ EDTA and TCM199. At 72hr of culture, the rate of 2-cell ova developed to blastocyst was higher in M16+EDTA (57.1%) than in M16 (20.9%,  $P<0.05$ ) and in TCM199 (18.2%,  $P<0.05$ ). Addition of EDTA did not improve the rate of 4- and 8-cell ova developed to blastocyst. 40~65% of 4- and 8-cell ova developed to blastocyst.

### 緒言

胚培養は哺乳動物胚の発生工学的実験を行う上で不可欠な技術であるが、現在1細胞期卵から胚盤胞までのほぼ完全な体外培養系が確立している実験動物はマウスおよびウサギが挙げられるにすぎない<sup>1,5)</sup>。こうした特定動物種においてのみ胚培養が先行する状況は、発生工学研究を展開していく上で望ましい形とは言えず、今後はより広い動物種の胚培養法の確立が望まれる。

そこで本実験では、胚培養の知見が乏しいチャイニーズハムスター初期胚の体外培養法について検討した。

### 材料および方法

本実験には当研究室で自家繁殖したチャイニーズハムスターの成熟未経産雌(2~4カ月齢)を用いた。交配には同種の成熟雄を使用した。

過排卵処理は、Roldanら<sup>12)</sup> および池田ら<sup>6)</sup>の報告を参考に、性周期を考慮することなく午前10時にPMS(PMSゼンヤク、日本全薬)20IUを皮下注射し、次いで78時間後にhCG(HCGモチダ、持田製薬)10IUを皮下注射する方法を用いた。hCG投与後、雌チャイニーズハムスターは直ちに雄と一晩同居させ、翌朝膣栓もしくはスメア中に精子の確認できたものを実験に供試した。初期胚の回収は、池田ら<sup>6)</sup>、山崎<sup>18)</sup>を参考に、2細胞期胚をhCG投与(直後雄と同居)後72時間、4細胞と8細胞期胚を同96時間に、チャイニーズハムスターを屠殺して摘出した卵管をM16<sup>16)</sup>で灌流することにより行った。なお、回収胚のうち、hCG投与後72時間の2細胞期胚および同96時間の4細胞期胚は、それぞれ後期(late 2-cell および late 4-cell)にあたるものと推定された<sup>18)</sup>。

培養液は、M16、M16+EDTA(100  $\mu$ M)、TCM 199(ニッスイ)の3種を使用した。TCM 199は、25.07 mMの炭酸水素ナトリウムで緩衝し、ブドウ糖(5.55mM)、ビルビン酸ナトリウム(0.33mM)およびBSA(Fraction V, Sigma, 4 mg/ml)を添加した。培地のpHは7.2~7.4とした。

培養は、微小滴培養法<sup>1)</sup>を用い、2細胞期胚は96時間、4および8細胞期胚は72時間まで行った。培養条件は、温度37°C、炭酸ガス5%、空気95%、湿度100%とした。

## 結 果

hCG投与後72時間に回収した2細胞期胚と、同96時間に回収した4および8細胞期胚をM16、M16+EDTA、TCM 199の3種の培地で培養したところ、表1に示す結果が得られた。

2細胞期胚の培養72および96時間における胚盤胞への発育率は、M16が20.9および27.9%、M16+EDTAが57.1および34.3%、TCM 199が18.2および3.0%であった。4細胞期胚は、培養48および72時間の時点でM16において47.2および63.9%、M16+EDTAにおいて34.8および43.5%、TCM 199において41.7および33.3%の胚が胚盤胞に発育した。一方、8細胞期胚は、培養48および72時間の時点でM16において64.7および52.9%、M16+EDTAにおいて45.8および29.2%、TCM 199において41.7および29.2%の胚が胚盤胞に発育した。

各培地内における培養時間による胚盤胞への発育率の差は、2細胞期胚をTCM 199で培養した場合においてのみ有意であったが( $P < 0.05$ )、TCM 199で2および4細胞期胚を培養した場合には、培養時間を96あるいは72時間まで延長するとovercultureになる傾向を示した。8細胞期胚は、すべての培地において培養72時間でovercultureになる傾向を示した。いずれの培地においても、培養終

Table 1. *In vitro* culture of chinese hamster ova.

Stage of ova	Media	No. of ova cultured	Duration of culture	No. of ova developed to				Degenerated Blastocyst
				Early Blstocyst	Blastocyst	Expanded Blastocyst	Total (%)	
2-cell	M16	43	72hr	0	7	2	9 (20.9)	0
			96	0	8	4	12 (27.9)	0
	M16+EDTA	35	72	2	11	7	20 (57.1)	0
			96	0	6	6	12 (34.3)	8
	TCM199	33	72	1	5	0	6 (18.2)	0
			96	0	1	0	1 ( 3.0)	5
4-cell	M16	36	48hr	2	10	5	17 (47.2)	0
			72	1	8	14	23 (63.9)	0
	M16+EDTA	23	48	0	5	3	8 (34.8)	0
			72	0	3	7	10 (43.5)	0
	TCM199	24	48	0	5	5	10 (41.7)	0
			72	0	3	5	8 (33.3)	2
8-cell	M16	17	48hr	0	5	6	11 (64.7)	0
			72	0	2	7	9 (52.9)	2
	M16+EDTA	24	48	0	3	8	11 (45.8)	0
			72	0	0	7	7 (29.2)	4
	TCM199	24	48	0	5	5	10 (41.7)	0
			72	0	5	2	7 (29.2)	3

了までに透明帯からの胚の脱出(hatching)は観察されなかった。

胚盤胞への発育率を培地間で比較すると、2細胞期胚を72時間培養した場合ではM16+EDTAが他の2種の培地にくらべて有意に高い発育率が得られ ( $P < 0.05$ )、EDTA添加による発育率の改善が認められた。培養時間を96時間に延長するとEDTA添加による発育率の改善効果は消失し、TCM199のみが他の培地よりも発育率が劣る結果が得られた ( $P < 0.05$ )。4細胞期胚においては、培地による発育率の差は72時間まで培養した場合のM16とTCM199の間においてのみ認められ ( $P < 0.05$ )、8細胞期胚においては培地間の差は存在しなかった。

培養開始時点の胚の発育段階による胚盤胞への発育率の差は、M16では4細胞期以降、M16+EDTA

およびTCM 199では2細胞期以降認められなかった。

## 考 察

今回の実験の結果、HCG投与後72時間に回収した後期2細胞期胚は、培養72時間の時点でM16およびTCM 199において20%程度、M16+EDTAにおいて60%程度、胚盤胞に発育した。EDTAは培地中のCa<sup>++</sup>およびMg<sup>++</sup>以外の重金属イオンをキレートすることによりマウスの2-cell blockを解除することが知られており<sup>5, 8, 9)</sup>、ラット4細胞期胚<sup>10)</sup>およびゴールデンハムスター8細胞期胚<sup>7)</sup>の発育にも有効であることが報告されている。本実験においてもEDTAは、チャイニーズハムスター初期胚の発育を改善したが、その効果は2細胞期に限定して発揮された。また、TCM 199に含まれる多種のアミノ酸などの微量要素はチャイニーズハムスター2細胞期胚の発育には必須でなく、窒素源としては血清アルブミンのみで十分であった。4および8細胞期胚はいずれの培地においても40~65%の胚が胚盤胞に発育した。M16およびTCM 199の胚盤胞への発育率は2細胞期胚にくらべて有意に向上しており、2~4細胞期にかけて発育に影響を及ぼす代謝系、特に糖代謝系の変化<sup>13)</sup>があるものと推測された。また、胚盤胞への発育に要した時間は、培地間の差が若干あるものの2細胞期胚が72時間、4細胞期胚が48~72時間、8細胞期胚が48時間であり、体内での発育速度<sup>18)</sup>にくらべて約1日のずれが生じた。

チャイニーズハムスターはキヌゲネズミ科に属しており、同じ科のゴールデンハムスターと同様にわずか16個の細胞で胚盤胞を形成する特徴を有している<sup>18)</sup>。しかしながら、ゴールデンハムスター初期胚<sup>1)</sup>はチャイニーズハムスター初期胚と細胞分裂周期がかなり異なり、後期8細胞期以降は体外で高率に発育するものの、4細胞期胚以前の培養が困難かつ、その発育が低浸透圧によって改善されるなど、どちらかといえばラット初期胚に近い性状を有している<sup>4)</sup>。本実験においてはチャイニーズハムスター2および4細胞期胚は300 mOsm前後のほぼ等張液で60%程度発育したことから、同種初期胚の種特異的発育環境は、ゴールデンハムスターおよびラットとはかなり異なるものと推測された。

今回の実験では、いずれの培地においても発育した胚盤胞は拡張こそするものの、着床前の重要なステップであるhatchingは観察されなかった。これは培地の組成、アミノ酸、BSA、胚の密度および免疫グロブリン<sup>3, 11, 14, 17)</sup>などが抑制的に作用した可能性が考えられる。

いずれにせよ、チャイニーズハムスター後期2細胞期胚はM16+EDTAで培養することにより60%程度が胚盤胞に発育し、後期4細胞期以降はEDTA無添加でも同等の成績が得られたことから、チャイニーズハムスターはゴールデンハムスターやラットよりは培養が容易な動物種であるとみられた。

文 献

- 1) Austin, C. R. (1955). Ovulation, fertilization, and early cleavage in the hamster (Mesocricetus auratus). J. R. Micros. Soc., 75, 141~157.
- 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) Canseco, R. S., Gwazdauskas, F. C., Rajamahendran, R. and Vinson, W. E. (1988). Culture of bovine morulae in media supplemented with immunogloblins. J. Dairy Sci., 71, 2767~2771.
- 4) 榎本 晃 (1983). 哺乳動物卵子の体外培養における種特異性に関する研究. 日大医誌, 42, 173~182.
- 5) 星 雅樹, 豊田 裕 (1985). 体外受精に由来するマウス胚の発生におよぼす EDTA の効果. 日畜会報, 56, 931~937.
- 6) 池田春男, 山内寿子, 石島芳郎 (1988). チャイニーズハムスターの過排卵誘起. 日本大学鶴ヶ丘高等学校紀要, 15, 1~6.
- 7) 石島芳郎, 小野寺政一, 加賀谷朋子 (1985). ゴールデンハムスター 8 細胞期胚の体外発育に及ぼす EDTA の影響. 哺乳卵研誌, 2, 129~132.
- 8) 金 純, 高橋徳太郎 (1989). マウス初期胚の体外発育に及ぼす EDTA および BSA の影響. 日不妊会誌, 34, 345~348.
- 9) 木村資亜利, 小島博子, 横山峯介, 勝木元也 (1985). マウス受精卵の体外培養法の検討. 哺乳卵研誌, 2, 43~44.
- 10) 奥野博茂 (1988). ラット初期胚の体外発育に及ぼす諸要因の影響. 日大医誌, 42, 869~878.
- 11) 小野寺政一, 及川胤昭 (1989). 体外培養系におけるマウス胚の hatching ならびに trophoblastic outgrowth について. 第82回日畜学会講演要旨, 21.
- 12) Roldan, E. R. S., Horiuchi, S. and Yanagimachi, R. (1987). Superovulation in immature and mature Chinese hamster. Gamete Res., 16, 281~290.
- 13) Spielmann, H. (1975). Different patterns of energy metabolism in the rat and mouse zygote. J. Reprod. Fert., 42, 391~394.
- 14) Spindle, A. I. and Pedersen, R. A. (1973). Hatching, attachment, and outgrowth of mouse blastocyst in vitro: Fixed nitrogen requirements. J. Exp. Zool., 186, 305~318.

- 15) 菅原七郎 (1989). 卵子の培養法, “図説哺乳動物の発生工学実験法” 菅原七郎編, 学会出版センター, P. 121.
- 16) Whittingham, D. G. (1971). Culture of mouse ova. J. Reprod. Fert., 14 (Suppl.), 7~21.
- 17) Wright, W. R., Jr., Watson, J. G. and Chaykin, S. (1978). Factors influencing the in vitro hatching of mouse blastocyst. Anim. Reprod. Sci., 1, 181-188.
- 18) 山崎君江 (1989). チャイニーズハムスター (Cricetulus griseus) の生物学的特性-初期発生-. 第36回日本実験動物学会講演要旨, 106.

## ラ ッ ト 卵 子 の 体 外 培 養

—— 無血清合成培地での8細胞期からの培養について ——

### In Vitro Culture of Rat Eggs

—— Development of the 8-Cell Stage in Chemically Defined Medium ——

松本 浩道 ・ 菅原七郎 ・ 正木淳二

Hiromichi MATSUMOTO, Shichiro SUGAWARA and Junji MASAKI

東北大学農学部家畜繁殖学教室

Faculty of Agriculture, Tohoku University

Abstract: In vitro development of rat 8-cell stage embryos was examined using three chemically defined media such as mBMOC-III, mTYH and mM-II, without any protein. 72.4, 48.0 and 26.9% of the embryos cultured in those media developed to the blastocyst stage, respectively. In the mBMOC-III, supplemented with either non-essential amino acids (NE) or essential amino acids (E), 70.0 or 63.3% of the embryos developed to the blastocyst stage, respectively, which was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than that of the medium without amino acids (40.0%) or with both (NE) and (E) amino acids (36.7%).

These results show that the mBMOC-III is useful for in vitro culture of the rat 8-cell stage embryo, when either (NE) or (E) amino acids are supplemented.

### 緒言

哺乳動物卵子の体外培養に関する研究は広く行われており、数多くの成果が得られている<sup>1)</sup>。しかし、ラットは実験動物として広く活用されているにもかかわらず、培養方法は確立されているとはいえない。すなわち、ラット受精卵子を体外で培養すると2-4細胞期ブロックが起こるため、1細胞期から胚盤胞期までの発生に成功した例はない<sup>2, 3, 4)</sup>。そのためラット卵子の胚盤胞期までの発生能は種々の条件で8細胞期からの培養が行われているが、発生率やハッチング率、その後の発生能などの点で多くの課題が残されている<sup>5, 6, 7)</sup>。とくに、哺乳動物卵子の体外培養法を利用し生命現象の機構を解明する上で、完全に組成の明らかな培地での発生ブロック解除や完全な発生をさせる培養条件の吟味が基本課題になっている。

そこで本実験では、ラット受精卵子の培養法を確立するための基礎研究として、まず無血清合成培地における8細胞期からの培養法の検討を行った。

### 材料と方法

供試動物は本研究室において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に雄と同居させ、翌朝の腔栓確認をもって妊娠第1日とした。

8細胞期の卵子は、妊娠第4日の11:00-13:00hに卵管灌流を行い採取した。卵管灌流はPBS (+)で行った。

0.35mlの培養液滴にミネラルオイルをかぶせた培地を培養開始の前日に作製し、インキュベーター中で一晚CO<sub>2</sub>平衡を行い、pHはフェノールレッドを指示薬として7.2-7.4に調整した。

採取した卵子は発生培地で3-5回洗浄後、上記の発生用培地に移した。

培養は5%CO<sub>2</sub>、95%空気、38.5°Cの条件を保ったインキュベーター中で行い、培養開始後24時間ごとに実体顕微鏡下で発生状況を観察した。

培養液は、マウス卵子培養に用いられるTYH<sup>8)</sup>、BMOC-III<sup>9)</sup>、および本研究室においてブタ卵子培養用に開発したM-IIで検討した。これらの培養液はすべて蛋白質を0.5mg/mlのpolyvinyl alcoholに置きかえた。各基本培養液の組成は表1に示した。それら各培養液に成長因子として、1μg/ml Insulin、10μg/ml Transferrin、0.29ng/ml Selenious acid<sup>10,11)</sup>を、またアミノ酸としては、Eagle's minimal essential mediaのアミノ酸をそれぞれ添加した。Transferrinは鉄解離型ヒトトランスフェリンを使用した。

#### 実験1：各培養液における発生能の比較

8細胞期卵子の発生能の比較、検討を各成長因子とMEMの非必須アミノ酸を添加したmTYH、mBMOC-III、mM-IIの3種類の培養液で行った。

Table 1. Chemical composition of each medium

Component	mTYH	mBMOC-III	mM-II
NaCl	119.37mM	94.59mM	97.82mM
KCl	4.78	4.78	14.71
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.71	1.70	2.34
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.19	1.19	1.19
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.19	1.19	1.19
NaHCO <sub>3</sub>	25.07	25.07	25.07
D-glucose	5.56	5.56	6.62
Na-pyruvate	1.00	0.50	0.50
Ca-lactate	—	—	1.43
Na-lactate	—	2.04	0.57
Penicillin	10,000 IU	10,000 IU	10,000 IU
Streptomycin	5 mg	5 mg	5 mg
0.2%Phenol red	0.2 ml	0.2 ml	0.4 ml
PVA	0.5mg/ml	0.5mg/ml	0.5mg/ml

## 実験2: 各種物質添加mBMOC-IIIにおける発生能

実験1でよい傾向を示したmBMOC-IIIを基礎培養液とし、それに各種アミノ酸を添加し、発生能に対する影響を比較、検討した。培養区としてはBSAのみ添加した区、各成長因子を含む、BSA添加区、アミノ酸無添加区、MEM non essential amino acids 添加区、MEM amino acids solution without L-glutamin 添加区、両方のアミノ酸添加区、の計6区を設けた。

なお各基礎培養液の組成はTable 1 に示した。

また、発生率は、 $\chi^2$  検定により有意差を求めた。

## 結果

## 実験1:

mTYH、mBMOC-III、mM-II での8細胞期からの培養成績はTable 2 に示した。

胚盤胞期までの発生では mTYH 48.0%、mM-II 26.9%、mBMOC-III 72.4% とmBMOC-III区で最も高い成績が得られた。

なおmBMOC-IIIでは56.0%が拡張胚盤胞に発生し、ハッチングもみられたが、他の培養区では全く認められなかった。

培養時間と発生の関係では、mBMOC-IIIの区において培養開始後24時間で17個(58.6%)が胚盤胞期に発生したのに対し、mTYHでは2個(8.0%)、mM-IIでも3個(11.5%)とmBMOC-IIIの方が有意に高い成績を示した( $P<0.01$ )。

Table 2. Development of rat embryo from 8-cell stage in each medium

Culture medium	Protein	Growth factor	Amino acid	n	No. and % of eggs developed to :	
					$\geq$ morula	$\geq$ blastocyst
mTYH	—	I, T, S	NE	25	17(68.0%)	12(48.0%) <sup>a b</sup>
mMII	—	I, T, S	NE	26	12(46.2%)	7(26.9%) <sup>a</sup>
mBMOCIII	—	I, T, S	NE	29	22(81.5%)	21(72.4%) <sup>b</sup>

I : Insulin, T : Transferrin, S : Selenious acid.

NE: MEM non essential amino acid.

<sup>a b</sup> Values with different superscripts differ significantly ( $P<0.01$ ).

## 実験2:

mBMOC-IIIに各種アミノ酸を加えた場合の培養成績はTable 3 に示した。すなわち、アミノ酸を加えた区の胚盤胞期、拡張胚盤胞期までの発生率は、加えない区に比べてよい傾向

を示した。非必須アミノ酸、および必須アミノ酸を単独で加えた区の発生率はそれぞれ 70.0%、および 63.3% であったのに対し、非必須アミノ酸と必須アミノ酸の両方を加えた区では 36.7%と有意に低い発生率を示した( $P<0.05$ )。

Table 3. Effects of growth factor and amino acid on development of rat embryo from 8-cell stage

Culture medium	Protein	Growth factor	Amino acid	n	No. and % of eggs developed to :		
					≥ blastocyst	≥ ExB	≥ HB
BMOC III	BSA	—	—	35	14 (40.0%) <sup>b c</sup>	8 (22.9%) <sup>a</sup>	0 (0.0%) <sup>a</sup>
BMOC III	BSA	I, T, S	—	30	14 (46.7%) <sup>a b c</sup>	11 (36.7%) <sup>a b</sup>	3 (10.0%) <sup>a b</sup>
mBMOC III	—	I, T, S	—	30	12 (40.0%) <sup>b c</sup>	5 (16.7%) <sup>a</sup>	1 (3.3%) <sup>a b</sup>
mBMOC III	—	I, T, S	NE	30	21 (70.0%) <sup>a</sup>	14 (46.7%) <sup>b</sup>	1 (3.3%) <sup>a b</sup>
mBMOC III	—	I, T, S	E	30	19 (63.3%) <sup>a c</sup>	10 (33.3%) <sup>a b</sup>	4 (13.3%) <sup>b</sup>
mBMOC III	—	I, T, S	NE, E	30	11 (36.7%) <sup>b</sup>	7 (23.3%) <sup>a b</sup>	4 (13.3%) <sup>b</sup>

E : MEM amino acids solution without L-glutamin.

ExB : Expanded blastocyst.

HB : Hatching blastocyst.

<sup>a b c</sup> Values with different superscripts differ significantly ( $P<0.05$ ).

### 考察

3種類の培養液で8細胞期卵子の胚盤胞までの発生能を比較した結果、mBMOC-IIIが最も良好な成績を示した。Wadaら<sup>4)</sup>、Horiuchiら<sup>5)</sup>は、ラット初期胚の発生に乳酸が重要であると報告しているが、本実験では低濃度の乳酸でも良い成績が得られた。また mTYHでの成績から、ラット8細胞期卵子の発生に至適なピルビン酸濃度はmBMOC-IIIの濃度より高いことが考えられる。mM-IIは乳酸が添加されているにもかかわらず、mTYHより発生率が低かった。mBMOC-IIIの成績から考えて、ピルビン酸が至適濃度より低かったためとは考えにくい。このことからラット初期胚の発生において、mM-IIの特徴である高カルシウム濃度はとくに有効ではないものと思われた。この点については、グルコース濃度や他の組成との関連で再検討される必要がある<sup>1,2)</sup>。

8細胞期からの培養では、アミノ酸の添加は発生に有効なことが示唆された。特に非必須アミノ酸を添加した場合の胚盤胞期への発生率は70.0%と、非必須アミノ酸、必須アミノ酸の両方を添加した区の36.7%に比べて有意に高かった( $p<0.05$ )。

Zhang and Armstrongは、MEM amino acids solution とインスリンを添加した培地で8細胞期胚を培養すると胚盤胞期まで高率に発生すること、また、得られた胚盤胞を移植し高い妊娠率を得た、と報告している<sup>6,7)</sup>。着床前胚の発生に有効なアミノ酸が着床後の発

生に影響しているということは大変興味深く、今後、各種アミノ酸との関係を明確にする必要があると考えられる。

辻井らは、8細胞期から初期胚盤胞への発生において個々のアミノ酸を添加した場合、グリシン、グルタミン、グルタミン酸、アラニン、アルギニン、セリン、バリン、アスパラギン酸、およびスレオニンが効果的であるのに対し、イソロイシン、フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンのそれぞれの添加区では発生しないことを報告している<sup>13)</sup>。またWinkleらは、マウス受精卵で、グリシンが卵管中無機イオンの有害効果を抑制する、と報告している<sup>14)</sup>。

胚盤胞形成に効果的な9種類のアミノ酸は、ラット子宮液中の遊離アミノ酸のうち比較的多く存在するものである。一方、イソロイシン、フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンの4種類のアミノ酸は、ラット子宮液中の遊離アミノ酸のうち比較的少ないものである<sup>15)</sup>。

これら4種類のアミノ酸は、本実験で用いた必須アミノ酸にのみ含まれている。これらのアミノ酸は子宮中の場合と違い、他のアミノ酸と同程度含まれている。しかし、必須アミノ酸添加区では63.3%が胚盤胞期まで発生していることから、これら4種のアミノ酸が胚の発生に対し阻害的に働いているとは考えにくい。

一方、非必須アミノ酸区では胚の発生に効果的である9種のうち5種が含まれ、重量比で67.4%を占めた。その結果、胚盤胞までの発生率は70.0%で、本実験の中で最も高い値を示した。

また、非必須アミノ酸、必須アミノ酸の両者を添加した区では、非必須アミノ酸添加区に比べ発生率が有意に低かったが、この原因については今後の検討にまたなければならない。

必須アミノ酸添加区の結果から、イソロイシン、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシンの4種のアミノ酸が阻害的に働いているとは考えられないが、非必須アミノ酸、必須アミノ酸のどれかが拮抗的に働いている可能性についても、検討する必要があると思われる。

本実験で使用したトランスフェリンは鉄解離型であった。これは、鉄飽和型に比べて成長促進活性は低いとされている。しかし、培養成績は良好であったことから、トランスフェリンを含まない単純な組成の培地での発生能の検討が可能になると思われる。

#### 文献

- 1) Bavister, B.D., Ed. (1987). The Mammalian Preimplantation Embryo. Plenum Press, New York.
- 2) Folstad, L., Bennet, J.P. and Dorfman, R.I. (1969). The in vitro culture of rat ova. J. Reprod. Fert., 18, 145-146.
- 3) Mayer, J.F. Jr and Fritz, H.I. (1974). The culture of preimplantation rat embryos and the production of allophenic rats. J. Reprod. Fert., 39, 1-9.
- 4) Wada, K., Horiuchi, T., Sugawara, S. and Masaki, J. (1981). Culture of rat eggs in vitro. Tohoku J. Agr. Res., 32, 101-109.
- 5) Horiuchi, T., Ohta, M., Kojima, M., Takahashi, J., Sugawara, S. and Masaki, J. (1983).

- In vitro culture of rat eggs from eight-cell to blastocyst in a modified Dulbecco's medium. Jpn. J. Fertil. Steril., 28, 319-322.
- 6) Zang, X., Rutledge, J. and Armstrong, D.T. (1989). In vitro development of preimplantation rat embryos in chemically defined media. Biol. Reprod. 40, Suppl. (1), 160.
  - 7) Zhang, X. and Armstrong, D.T. (1990). Presence of amino acids and insulin in a chemically defined medium improves development of 8-cell rat embryo in vitro and subsequent implantation in vivo. Biol. Reprod., 42, 662-668.
  - 8) 豊田裕, 横山峯介, 星冬四郎 (1971). マウス卵子の体外培養に関する研究, 家畜繁殖誌, 16, 147-152.
  - 9) Brinster, R.L. (1971). In vitro culture of the embryo. In Pathway to Conception. Charles G. Thomas Publishing Company, Springfield, Illinois.
  - 10) Yamane, I., Kan, M., Hoshi, H. and Minamoto, Y. (1981). Primary culture of human diploid cells and its long-term transfer in a serum-free medium. Exp. Cell Res., 134, 470-474.
  - 11) Satoh, T., Kan, M., Katoh, M. and Yamane, I. (1986). Purification and characterization of an endothelial cell growth factor from serum-free culture medium of human diploid fibroblast cells. Biochim. et Biophys. Acta, 887, 86-93.
  - 12) Bavister, B.D. (1988). Role of oviductal secretions in embryonic growth in vivo and in vitro, Theriogenology, 29, 143-154.
  - 13) 辻井弘忠, 竹内三郎 (1973). アミノ酸のラット卵子の培養に及ぼす影響について, 日畜会報, 44, 506-511.
  - 14) Winkle, L.J.V., Haghighat, N. and Campione, A.L. (1990). Glycine protects preimplantation mouse conceptuses from a detrimental effect on development of the inorganic ions in oviductal fluid. J. Exp. Zool., 253, 215-219.
  - 15) 辻井弘忠, 菅原七郎, 竹内三郎 (1971). ラット子宮液中の遊離アミノ酸について, 家畜繁殖誌, 16, 140-146.

[ 本研究は文部省科学研究費補助金 (No. 02404018) の一部で実施した。 ]

## 牛体外受精卵子の幹細胞化 に関する研究

Isolation of the colony derived from bovine embryo in vitro fertilization.

正木 全、柳 在雄、菅原七郎、正木淳二

Tamotsu MASAKI, Zae Young RYOO, Shichiro SUGAWARA, Junji MASAKI

東北大学農学部畜産学科家畜繁殖学教室

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

Abstract: To isolate and establish embryonic stem (ES) cells from bovine embryos, an embryos from 2 cell to blastocysts stage were cultured on mouse embryonic fibroblasts feeder layer. When a blastomeres from embryos at 2, 4, and 8 cell stage were cultured, a blastomere in each stage had divided to two or three times, and then some of them attached to feeder layer, but none of them did grow and colonize. When the embryos culture were started from morulae, the embryos developed to blastocysts, and their trophoblast attached to feeder layer. Following the attachment, trophoblastic outgrowth were observed as that occurred in the culture of blastocysts on feeder layer. The innercell mass(ICM) were disrupted and passaged onto feeder layer. The colony derived from ICM were isolated.

### 緒言

マウスのES細胞(embryonic stem cell:胚性幹細胞)が、EvansとKaufman(1981)により初めて樹立されて以来、成功例が数多く報告された。ES細胞は多分化能を持った培養細胞株であり、遺伝子導入等の操作が容易である。このため、ジーンターゲティング法により特定の遺伝子に相同的組み換えを起こさせた後、胚盤胞へ顕微注入すればキメラ個体を作製することができる。また、生殖細胞系列でキメラができれば、その子孫から特定の遺伝子が改変された個体の生産が可能となる。この技術が家畜に応用されれば、改良増殖の有効な手段となり、高い経済的効果が期待される。しかし、マウス以外の動物におけるES細胞の樹立は困難であり、現在までにハムスター、豚、羊で報告されているに過ぎない。特に、畜産において経済的価値の高い牛における研究は、ほとんどなされていない。牛のES細胞樹立に関する研究が進まない理由の1つとして、材料となる受精卵の入手が実験動物と比べ非常に困難であることがあげられる。一方、屠場卵巣由来卵母細胞を用いた牛の体外受精法が低率ながらも安定した胚盤胞の供給を可能とする技術として発展し普及され始めた。

本研究では、牛ES細胞の樹立を目的として、2細胞期から胚盤胞期の牛体外受精卵子とマウス胎児線維芽細胞との接着条件について検討した。また、ICM(inner cell mass:内部

細胞塊)に由来するコロニーを分離したので報告する。

## 材料及び方法

< feeder layerの準備 > feeder layerとして用いたマウス胎児線維芽細胞は、妊娠15日齢のICR系マウスの胎児から分離培養した。摘出した胎児は、リン酸緩衝液(PBS)で洗浄後、肝臓、腸を除きPBS中で細切した。次いで、これに0.25%トリプシン(DIFCO)/0.04%EDTA液を1胎児当り5ml加えスターラーで1時間攪拌した。トリプシン/EDTA液と同量のDMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium; 4.5gグルコース/l, Gibco)+10%FCS(foetal calf serum)を加え、ナイロンメッシュを通して細胞塊を除いた後、遠心(1200rpm×5分)して細胞を集めた。細胞はDMEM+10%FCSに浮遊させ、胎児1つ当り75cm<sup>2</sup>の培養フラスコ(住友)1コに播種した。その24時間後、培地をDMEM+5%FCSに交換して、接着していない死細胞や血球を取り除いた。培養は37.5°C、5%CO<sub>2</sub>、95%空気の炭酸ガスインキュベーターで行い5-7日毎に継代した。細胞はコンフルエントに達した時点で、マイトマイシンC(10ug/ml)で2.5-3時間処理した。培地を除きPBS(-)で細胞表面を3回洗浄し、トリプシンで細胞を分散させた後遠心した。細胞は3×10<sup>5</sup>cells/mlの濃度に調整し、24穴のウェルと35mmプラスチックシャーレにそれぞれ0.5ml、2ml分注し培養した。シャーレの表面は予め37.5°Cで1時間、0.1%ゼラチン(Swine, type II: Sigma)処理したもので、作製から1週間以内に使用した。

< 牛体外受精卵子の準備 > 仙台市食肉屠場より得た黒毛和種の卵巣を32-35°Cに保温して持ち帰り、卵管片や周辺組織を除去し、滅菌生理食塩水で数回洗浄し、卵胞卵子の採取に供した。卵胞卵子は、直径が1-5mmの卵胞から吸引法により採取した。卵子の体外成熟用として、TCM199(日水製薬)+10%FCSを用い、39.0°C、5%CO<sub>2</sub>、95%空気の条件下で21-22時間培養した。体外成熟卵子の受精には、黒毛和種の凍結精液(ナンバタケ)を用いた。凍結精液は、31-32°Cの温湯中で融解し、B0(Brackett, B.G. & Oliphant, G.; 1975)液+10mMカフェインに浮遊させ遠心(2400rpm×5分)した。上清を除去しB0液+10mMカフェイン+1ul/mlヘパリン(ノボ・ヘパリン1000u/ml)に再浮遊させ、精子濃度が106/mlになるように調整した。この精子浮遊液50ulは、B0液+10mMカフェイン+0.01g/mlBSAのドロップで等倍希釈し、6時間媒精した。2、4細胞期胚は、媒精24時間後に卵丘細胞を0.05%ヒアルロニダーゼで除去して用いた。これ以降の発生段階ステージの分割期卵子は、卵丘細胞を除去せずそのまま共培養を続けて得た。8細胞期胚、16細胞期胚、桑実胚はそれぞれ媒精後2日、3日、5日目の培養でそれらの発生段階に達していたものを用いた。透明帯はいずれの胚でも、0.5%プロナーゼ処理で除去し培養に供した。胚盤胞は、媒精7-9日目に出現したものを用いた。ハッチングしていない胚盤胞の透明帯は、同様に0.5%プロナーゼで除去して用いた。

< 2-16細胞期胚の培養 > 2-16細胞期胚は、35mmシャーレに作製したfeeder layer上で培養した。培地はDMEMあるいはTCM199にES細胞用添加物[20%FCS、0.1mM2-メルカプトエタノール(Sigma)、非必須アミノ酸溶液(Gibco)、ヌクレオシド溶液(アデノシン、グアノシン、シチジン、ウリジン、をそれぞれ0.03mM、チミジン0.01mM)]を加えて用い、毎日交換した。培養は37.5°Cあるいは39.0°C、CO<sub>2</sub>5%、95%空気のインキュベーター内で行った。以下の実験も、同様の条件下で培養した。

<2-16細胞期の分散割球の培養>透明帯を除去した2-16細胞期の胚は、0.3%EDTA/PBSで3分間処理し割球を分散した。割球は1つずつ、24穴のウェルに作製したfeeder layer上で培養した。培地はDMEMにES細胞用添加物を加え、2日毎に交換し、それらの接着、分割状態及びコロニー化について観察した。

<桑実胚及び胚盤胞の培養>桑実胚及び胚盤胞は、35mmシャーレに作製したfeeder layer上で培養した。培地はDMEMあるいはTCM199にES細胞用添加物を加えて用い、毎日交換した。

<ICMの培養>露出したICMは、口径100 $\mu$ m程のマイクロピペットで吸い上げた。ICMはPBS(-)で洗浄後ミネラルオイルで被覆した50 $\mu$ lの0.5%トリプシン溶液ドロップ中で3-5分間処理した。次いで、ドロップに少量の培地を加え、マイクロピペットで数回出し入れして20コ程度の塊にした。この細胞塊は35mmシャーレのfeeder layer上で培養した。培地は毎日交換した。

## 結果

<2-16細胞期胚の培養>2細胞期及び4細胞期から培養した胚は、いずれの実験区でも、培養24時間目までに割球が分離分散して、72時間目までには全ての実験区で割球は変性し、feeder layerと割球との接着はみられなかった。2細胞期胚ではDMEM-37.5℃の区で、24-48時間までに割球の増加が認められたが、他の実験区では24時間目以降の増加は認められなかった。4細胞期から培養した胚は、TCM199-37.5℃区で24時間目までに割球数が若干増した以外、48時間目までにその他の実験区では、全く変化がみられなかった。

8細胞期から培養した胚は、24時間目までに一部の胚で割球が分散し、96時間目までに大部分が分散した。いずれの実験区でも、割球が120時間までに分裂増殖することはなかった。また、割球とfeeder layerとの接着が観察されたが、割球は球形を保ったまま増殖することはなかった。

16細胞期から培養した胚は、24時間後から割球が分散し始め、120時間までに合計16コの胚のうち10コが分散した。分散した割球は、DMEM-39.0℃区とTCM199-39.0℃区で72時間目に、DMEM-37.5℃区では96時間目にfeeder layerとの接着が観察された。しかし、8細胞期から培養したときと同様に割球は分裂増殖することはなかった。割球が分散しなかった6コの16細胞期胚は、feeder layerと接着することなくまた発生もしなかった。

<2-16細胞期の分散割球の培養>2細胞期の割球は、24時間目までにほとんどが2-3回分裂した。24-48時間にかけて分裂したものは3/8わずかであった。

4細胞期の割球は、24時間までに10/16が2-3回分裂した。24-48時間にかけて分裂を繰り返したものは7/16であった。

8細胞期の割球は、37.5℃区で24時間までに1-2回分裂した。39.0℃区では6/8が2-3回分裂し、37.5℃区よりも分裂した割球数、分裂回数とも多かった。24-48時間までに37.5℃区の割球は若干分裂増加したが、39.0℃区では全く変化しなかった。

16細胞期の割球は37.5℃区、39.0℃区とも48時間までに分裂は観察されなかった。

2-16細胞期胚の分散割球は、全ての実験区で培養72時間目までにほとんどが変性した。また、全ての実験区でfeeder layerと接着する割球がみられたが、分裂増殖するものは認

められなかった。

<桑実胚及び胚盤胞の培養> 桑実胚期から培養したものは、168時間までにDMEM-37.5℃区で1/18、199-37.5℃区で4/11、199-39.0℃区で1/12がfeeder layerと接着し、細胞の増殖伸展がみられたが、いずれの場合も桑実胚から直接feeder細胞と接着して増殖したものではなく、胚盤胞期への発生を経て栄養外胚葉（栄養膜細胞）とfeeder細胞が接着して増殖したものであった。

胚盤胞から培養したものは、DMEM-37.5℃区と199-37.5℃区では、48時間目から栄養外胚葉の一部とfeeder細胞との接着が観察された。両実験区の接着した胚盤胞は、72時間までに栄養外胚葉が伸展しICMが露出した。DMEM-39.0℃区と199-39.0℃区では、DMEM-37.5℃区と199-37.5℃区よりおよそ24時間ずつ遅れて同様の現象が観察された。DMEM+5%FCS区、199+5%FCS区ではさらに24時間遅れ、120時間目で栄養外胚葉の接着伸展、ICMの露出が観察された(Table)。

<ICMの培養> 解離したICM6コからコロニーが1つ得られた。コロニーはICM解離後4日目に出現し、中央部がやや盛り上がる形態をしていた。

Table. Effect of medium and temperature on the attachment and outgrowth of bovin blastocysts in feeder layer of mouse embryonic fibroblasts

medium	temp. (°C)	number of blasto.	culture time(hr)											
			24		48		72		96		120		144	
			A	G	A	G	A	G	A	G	A	G	A	G
DMEM	37.5	10			2		1	2	3	2	1	4		4
DMEM	39.0	10					2		1	1		2		2
DMEM*	39.0	11									2			2
TCM199	37.5	10			1			2	1	2		3		3
TCM199	39.0	9					1		1	1		2		2
TCM199*	39.0	12								1		1		1

A: Number of blastocysts that trophoblasts attached to feeder layer.

G: Number of blastocysts that trophoblasts attached and grown to feeder layer.

\*: Supplemented with 5% FCS only.

## 考 察

牛体外受精卵子とマウス胎児線維芽細胞との培養では、2、4、8細胞期胚を培養したときには、胚の割球は分散し2-3回分裂を行うものもあった。このことから、割球の分散による割球同士の相互作用の消失が、その分裂増殖に影響することが示唆された。この事実

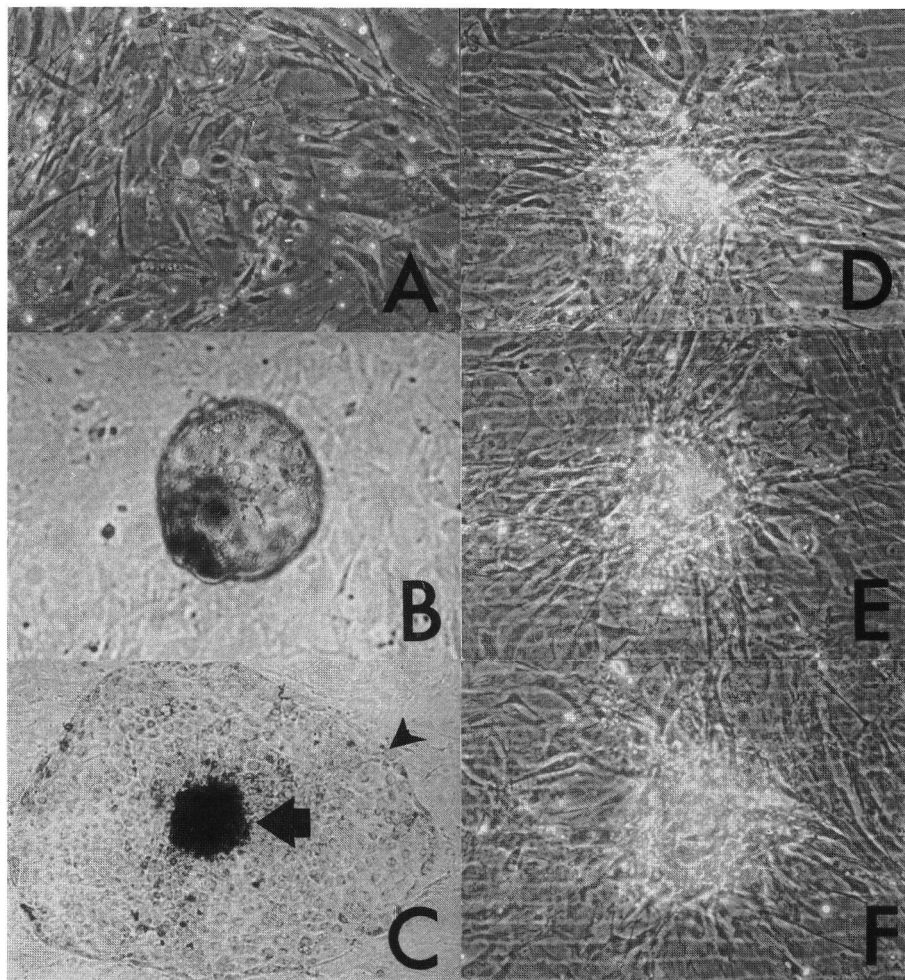


Figure A: Disaggregated 16 cell stage blastomere attached to feeder layer. B: Bovine blastocyst attached to the feeder layer after 48hr of culture. C: Bovine blastocyst with ICM (arrow) and trophoblasts (arrowhead) attached and outgrown to the feeder layer after 120hr of culture. D: The colony derived from bovine ICM at day 4 after subsulture following ICM disaggregation. E: The colony derived from bovine ICM at day 6 after subsulture following ICM disaggregation. F: The colony derived from bovine ICM at day 9 after subsulture following ICM disaggregation.

は、割球間の接触がこれらの間の情報伝達を可能とし、この情報に基づいて分裂増殖、発生が支配されていることを示唆している。8、16細胞期の割球の一部はfeeder layerと接着はしたが、この時、胚の割球は分散し、1コの割球または2-3コの割球が一緒に接着した。また8、16細胞期の分散割球を培養した場合も、上記と同様の状態で割球がfeeder layerと接着した。これらのいずれの場合においても、接着した割球は増殖することなく、コロニーは形成されなかった。この結果は、牛の8及び16細胞期の割球は他の割球との相互作用なしに増殖する能力は低く、マウス胎児線維芽細胞との相互作用では8、16細胞期の割球の増加を誘起することができないか、あるいは細胞間で相互に作用することがないということが示唆される。Eistetter(1989)は、マウスの16-20細胞の桑実胚を分散させ、この割球から高率にES細胞が樹立できたと報告している。この現象は、マウスの桑実胚で特異的に起こる現象であることが考えられ、牛では桑実期ではない16細胞期の割球がコロニー化しなかったのかもしれない。あるいはまた、異種動物細胞であるマウス胎児線維芽細胞との親和性が問題である可能性も考えられる。

桑実胚を培養したときには、このステージの胚が直接feeder layerと接着してコロニー化することではなく、胚盤胞に発生した胚だけで栄養外胚葉がfeeder layerと接着伸展し、ICMが露出した。このように一端胚盤胞への発生を介してfeeder layerに接着し伸展することは、材料として桑実胚は不適であることを示している。

胚盤胞期胚を培養したとき、栄養外胚葉の伸展は、検討した6実験区の全てで観察された。DMEM-37.5°C区及び199-37.5°C区では培養48時間目に接着が起り、72時間目から栄養外胚葉の伸展及びICMの露出がみられた。DMEM-39.0°C区と199-39.0°C区では72時間目に接着、96時間目にICMが露出した。一方、ES細胞樹立用に添加する物質を全く加えず、DMEMあるいは199に5%のFCSのみを添加した区では、接着、伸展がさらに遅れる傾向を示した。これらの結果から、胚盤胞の接着及びICMの露出にいたる過程には、マウス胎児線維芽細胞の培養、あるいは牛受精卵子の体外発生に通常用いている培地でも良いことを示しているが、ES細胞樹立用の添加物と20%のFCSを加える方が、より適しているといえる。また、胚盤胞の接着伸展の過程は、培養液よりもむしろ培養温度に影響を受けることが示唆された。なお、DMEMと199培地間の比較から、これらの間に明確な差は認められなかったが、最終的に接着伸展した胚はDMEMを用いた方が多く、培地としてDMEMがより至適なことが明らかになった。Piedrahitaら(1990b)は、豚胚盤胞をSTO細胞のfeeder layer上で培養したところ、24-48時間後に接着し、また羊胚盤胞をSTO細胞または羊胎児線維芽細胞のfeeder細胞上で培養すると、48-72時間後に接着が観察されたと報告している。このように、feeder layerと胚盤胞の接着するまでの時間が、動物種によりまた、培養条件によっても異なることが明かとなった。マウス胎児線維芽細胞の培養条件を検討した予備実験の結果、最も良い増殖を示したのは培養液がDMEM、培養温度が37.5°Cの時であり、この条件で接着した胚盤胞数が最も多かったことと一致してきわめて興味深い。

DMEM-39.0°C区、DMEM-37.5°C区および199-39.0°C区の接着伸展した胚盤胞のICMを解離し、新しいfeeder layer上で培養したところ、199-39.0°C区のICMからコロニーを得ることに成功した。マウスのES細胞は、細胞質に対し大きな核を持つ比較的小形の細胞で、コロニーは細胞の境界が不鮮明でやや盛り上がる特徴を持っている。Piedrahitaら(1990a)、Notarianniら(1990)は、胚に由来する豚の多能性細胞株は、マウスと同様の形態的特徴を持つ

と報告している。しかし、今回得られたコロニーはこのような特徴は持っていなかった。また、得られたコロニーは1つであり、コロニー分離の条件についてはさらに検討を要する。

## 文 献

- 1) Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 78, 7634-7638.
- 2) Evans, M.J. & Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292, 154-156
- 3) Smith, A.G. & Hooper, M.L. (1987). Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells. *Dev. Biol.*, 121, 1-9
- 4) 末盛博文、中辻憲夫 (1989). マウス胚幹細胞 (ES細胞) 株の樹立と維持実験医学, 7, 293-298
- 5) Eistetter, H.R. (1989). Pluripotent embryonal stem cell lines can be established from disaggregated mouse morulae. *Develop. Growth & Differ.*, 31, 275-282
- 6) 徳永智之、角田幸雄 (1989). マウス胚性幹細胞の樹立について、日本家畜繁殖学雑誌, 35, 173-178
- 7) Evans, M.J., Notarianni, E., Laurie, S., & Moor, R.M. (1990). Derivation and preliminary characterization of pluripotent cell lines from porcine and bovine blastocysts. *Theriogenology*, 33, 125-128
- 8) Strojek, R.M., Reed, M.A., Hoover, J.L., & Wagner, T.E. (1990). A method for cultivating morphologically undifferentiated embryonic stem cells from porcine blastocysts. *Theriogenology*, 33, 901-913
- 9) Handyside, A., Hooper, L., Kaufman, M.H. & Wilmut, I. (1987). Towards the isolation of embryonal stem cell lines from the sheep. *Roux's Arch. Dev. Biol.*, 196, 185-190
- 10) Piedrahita, J.A., Anderson, G.B. & BonDurant, R.H. (1990a). Influence of feeder layer type on the efficiency of isolation of porcine embryo-derived cell lines. *Theriogenology*, 34, 865-877
- 11) Piedrahita, J.A., Anderson, G.B. & BonDurant, R.H. (1990b). On the isolation of embryonic stem cell: comparative behavior of murine, porcine and ovine embryos. *Theriogenology*, 34, 879-901
- 12) Doetschman, T., Williams, P. & Maeda, N. (1988). Establishment of hamster blastocyst-derived embryonic stem (ES) cells. *Dev. Biol.*, 127, 224-227
- 13) Notarianni, E., Laurie, S., Moor, R.M. & Evans, M.J. (1990). Maintenance and differentiation in culture of pluripotential embryonic cell lines from pig blastocysts. *J. Reprod. Fert., Suppl.*, 41, 51-56.

〔本研究は文部省科学研究費補助金 (No. 02404018) の一部で実施した。〕

# A Successful Procedure for In Vitro Fertilization of Rabbit Eggs Using by Ejaculated Spermatozoa

Tutomu GOTO, Hideo YOKOTA and Kahei SATO

Department of Cell Biology, College of Veterinary  
Medicine, Nihon University, Kameino 1866,  
Fujisawa 252

**Abstract:** In this paper, complete details are described for the procedures used in the Author's laboratory for in vitro fertilization (IVF) of rabbit eggs. Using ejaculated spermatozoa preincubated in a modified mTALP solution (a modified Tyrode's solution) for 4-5hr, an average of 92-100% of inseminated eggs fertilized and 78.3-87.1% of the fertilized eggs developed to the various embryonic stages (2-cell - blastocyst stages). The ease and reproducibility of the rabbit IVF procedures make them very suitable for studies on analysis of the sperm fertilizing ability and on developmental ability of eggs fertilized in vitro. We also developed a method for inducing capacitation of ejaculated rabbit spermatozoa. In other experiments, the ejaculated spermatozoa were preincubated for 1 hr and then, were exposed to 50 ug/ml of lysophosphatidylcholine (LPC) for 15 min. After exposure to LPC, the spermatozoa were reincubated in the fresh medium for 30 min and this sperm suspension was used for in vitro fertilization. Obtained results indicated LPC-treated spermatozoa had high fertilizing ability under in vitro conditions. In addition, the

developmental ability of rabbit eggs fertilized by IVF, by spermatozoa preincubated in modified mTALP solution or treated with LPC has been examined using embryo transfer into oviducts and/or uteri of pseudopregnant does mated with infertile males. We succeeded to produce Japanese White offspring from recipients after egg transfer. The procedures described in this paper may be useful to other investigators wishing to conduct research using IVF. Essentially, the same IVF procedures can be used with domestic animal and human gametes.

### Introduction

During past 30 years, numerous investigators have used in vitro fertilization(IVF) procedures to study sperm capacitation, the acrosome reaction, sperm/egg attachment, penetration of eggs, and fertilization in a variety of mammals(see for review, Yanagimachi, 1981; Rogers, 1978). In the rabbit, using a chemically defined medium, the successful of IVF has reported first by Brackett and Oliphant(1976). Early IVF procedure usually incorporated biological materials, such as blood serum, cumulus oopharous or follicular fluid, in the culture medium in order to induce capacitation and the acrosome reaction, and/or maintain sperm viability. Since the successful of IVF by Brackett and Oliphant(1976) several investigators have reported the successful of IVF in the rabbit(Akuruk et al., 1979; Hosoi et al., 1980; Sato, 1984) using the medium of Brakett and Oliphant(BO medium). However, in these reports, effectiveness of BO medium for rabbit sperm capacitation not evaluated. From 1984 we have

developed chemically defined media for inducing capacitation of rabbit spermatozoa ejaculated (Sato,1984; Sato and Suzuki,1985; Sato et al.,1986; Sato,1987). We established the method for inducing capacitation of ejaculated rabbit spermatozoa under in vitro conditions apacitated spermatozoa, in vitro fertilization (IVF) of rabbit eggs. In this paper, we report procedures for a consistently successul in vitro fertilization of rabbit eggs in details.

## **Materials and Methods**

### **Media**

The regular medium used for incubation of gametes is a modified Tyrode's solution originally designated TALP for inducing capacitation of hamster spermatozoa (Bavister and Yanagimachi,1977). We have modified variously the TALP for inducing rabbit perm capacitation (Sato and Suzuki,1985; Sato,1987). The composition of the basic salt solution is shown elsewhere (Sato and Suzuki,1985; Sato et al 1986). All salts and other organic chemicals are "analytical grade". Ham F12 added with 10%(V/V) bovine calf serum were used for culture of fertilized eggs.

### **Egg collection and preparation**

For IVF of rabbit eggs, adult females of Japanese White rabbit were superovulated by an intravenou injection of 80 IU pregnant mare serum gonadotropin (PMSG, Teikoku Zoki Co., Japan) followed by 80 IU human chorionic gonadotropin (hCG, Tekoku Zoki Co.,). At 13.5-14.0hr after hCG injection females were anesthized with sodium pentobarbital (Abott Co., U.S.A.) and oviducts were

removed to collect ovulated eggs. Oviducts were flushed with media containing bovine serum albumin(BSA). By this treatment an average number of  $28.0 \pm 1.8$  eggs was obtained. Collected eggs were rinsed with fresh media and then applied for in vitro fertilization.

#### Collection and preparation of spermatozoa

Semen was collected from fertile males using an artificial vagina(Sato,1984). Ejaculates were suspended in 2 ml of fresh media and held at  $37^{\circ}\text{C}$ . Spermatozoa were examined by a phase-microscope and only 75-80% or more progressive motile spermatozoa were used for experiments. After spermatozoa were suspended in media the samples were centrifuged at 1000 r.p.m. for 8 min to excess seminal plasma components. This procedure was repeated 2 times. For collecting active motile spermatozoa, washed samples were resuspended in fresh media and the sperm suspensions were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  under 5% $\text{CO}_2$  in air for 20 min. swim-up spermatozoa were recovered from upper layer of the sperm suspension and then recovered spermatozoa were transferred into fresh media. For in vitro capacitation the specimens were incubated for 3-5 hr at  $37^{\circ}\text{C}$  under 5% $\text{CO}_2$  in air. In some experiments, to induce capacitation/acrosome reaction rabbit spermatozoa were exposed to lyophosphatidyl choline(LPC, 50 ug/ml medium) for 15 min after an 1 hr-preincubation in the regular medium(Goto and Sato,1989). After exposure of spermatozoa to LPC, the spermatozoa were transferred into the fresh regular medium and then incubated for 30 min. At the end of the incubation, the spermatozoa were examined for their motility and acrosome

reaction, using the phase-contrast microscope.

### **In Vitro Fertilization(IVF)**

IVF was performed as followed. several small drops of media containing 7-10 eggs under mineral oil were made in Falcon plastic petri dishes(#1007,60x15 mm). Insemination was carried out to introduce a small volume( 30-50 ul) of sperm suspension into drops of media containing eggs. The final concentration of spermatozoa was adjusted to  $5 \times 10^5$ /ml. The small aliquots are taken from a part of the sperm suspension and percentages of highly motile spermatozoa were examined using a phase-contrast microscope. The duration of coincubation of spermatozoa and eggs depend upon the experimental objectives. Alternatively, eggs may be transferred to embryo culture medium at various intervals after coincubation with spermatozoa.

### **Examination of Gametes**

When coincubation of gametes was complete, the eggs were removed and either examined immediately or fixed for later analysis. In the later case, 10 ul of fixative(2% glutaraldehyde-2% formaldehyde in phosphate buffer, pH 7.2) was added to each IVF drop. Eggs were then transferred to 50 ul drops of calcium-free medium under mineral oil and an equal volume of fixative was added. After 20 min, most of the fluid was withdrawn from each drop and 50 ul of fresh fixative mixture is added. at this point, the eggs can be stored at 4°C for few days.

For examination, eggs were placed in a small drop of the medium which were deposited in the center of a clean microscope slide glass and immediately covered with a coverglass supported on

vaseline-paraffin wax (8:2) spots. The coverglass were rapidly pressed gently down to contact the drop otherwise evaporation will damage the eggs, especially if they were unfixed. Eggs were examined by a phase-contrast and/or differential interference contrast microscope for evidence of fertilization. Criteria for fertilization and examples of the morphological appearance of fertilized eggs have been described elsewhere (Sato, 1984; Sato and Suzuki, 1985). Each eggs were scored for numbers of polar bodies, pronuclei, swollen sperm heads and numbers of spermatozoa in the perivitelline space(PVS).

#### **Cleavage of IVF Eggs and Embryo Culture**

Eggs inseminated are transferred to fresh culture medium for cleavage to the 2-cell or more embryonic stage. about 3-6 hr after insemination, eggs are transferred to drop of embryo culture media, which are incubated for further 72 hr under 5% CO<sub>2</sub> in air at 37° C to permit development of embryos to the blastocyst stage. Media used for embryo culture are changed at a 24 hr-interval.

#### **Cultured Embryo Transfer into the Oviduct and Uteri of Pseudopregnant Does**

Cultured embryos were transferred surgically into oviducts of or uteri of does(Dutch Belted does) mated with vasoligated males to induce pseudopregnant. At the stage of 4-cell to blastocyst of embryos the transfer was performed. Laparotomy was performed on each recipient does 2 week after the transfer, and the ability of transferred embryos to develop further in vivo was assessed at that time. Implantations, site of resorption, and complete failures to implant were examined. Recipients with normal

developing were retained for final assessment of fetal development at term.

### Results and Discussion

Spermatozoa could attached to the zona pellucida immediately after insemination and then cumulus cells in cumulus-intact eggs were dispersed by spermatozoa within 20-30 min. The zona penetration of spermatozoa were observed 1 hr after insemination and the sperm penetration into the egg cytoplasm was seen 1-1.5 hr postinsemination. About 45% of the eggs penetrated showed the the enlargement of sperm heads within 2-3 hr postinsemination and swollen sperm heads in 70% or more of fertilized eggs was observed 3.5-4.0 hr after insemination.

Table 1. In vitro fertilization of rabbit eggs by ejaculated spermatozoa preincubated in mTALP medium

Sperm preincu- bation time	No. of eggs inseminated	No. of eggs fertilized(%)	No. of eggs developed(%)
3( hr )	29	22(68.9)	11(55.0)
4( hr )	25	23(92.0)	18(78.3)
5( hr )	31	31(100.0)	27(87.1)

All observations for evidences of fertilization were performed by 5 hr after insemination.

In order to assess the developmental ability of eggs fertilized by IVF, egg transfer was performed. When fertilized eggs developed

to the 4-cell and early blastocyst stage, the fertilized eggs were transferred into the oviducts or uteri of 4 recipients (Dutch Belted does). Thirty-eight fertilized eggs were transferred surgically and 2 of 4 recipients became pregnant. Seven normal Japanese White bunnies resulted from two normal pregnancies.

Table 2. In Vitro Fertilization of Rabbit Eggs using LPC-treated spermatozoa

Sperm Treatment	No. of Eggs inseminated	No. of Eggs fertilized(%)	No. of Eggs developed(%)
Control sperm (5hr preincubated)	35	30(85.7)	25(83.3)
LPC-treated sperm 50 ug / ml)	48	48(100)	42(87.5)
LPC-treated sperm 100 ug / ml)	49	48(97.9)	44(91.7)

LPC; Lysophosphatidyl choline  
All observations for evidences of fertilization  
were performed by 5 hr after insemination.

As shown in Table 1, the fertilization rate was consistently high in IVF using spermatozoa preincubated in a modified mTALP medium. When these fertilized eggs were cultured in Ham F10 or Ham F 10 containing 10-15%(V/V) fetal calf serum, 85% of them developed to the 8-cell or more embryonic stages. 71.3% of developed embryos were early blastocysts 78 hr after IVF. In most cases the expanding blastocyst stage was reached the following day. Some blastocysts continued to develop and then hatched from the zona pellucida 5 days after IVF. The present result reconfirmed our observations previously reported (Sato et

al.,1982; Sato, 1985;Sato et al.,1987; Sato and Goto; 1990). In the results using B0 medium, obtained fertilization rates are in 60-83% range(Akuruku et al.,1980; Hosoi et al;1982; Sato,1985), however,using the use of our system for IVF, it is indicated that the higher rate of fertilization, comparedf to these results, was obtained consistently under in vitro conditions .

Similarly, in IVF using LPC-treated spermatozoa, very higher rate of fertilization was obtained, as shown in Table 2. In 2 of the eggs fertilized by spermatozoa treated with 50 ug/ml LPC , 2 spermatozoa were presented in the vitellus, each showing swelling of the sperm nucleus, the first stage of nuclear decondensation.The fertilized eggs, also, could develop to the morula or blastocyst stages(Table 3). This system for the induction of capacitation of spermatozoa by LPC-treatment was very short time, compared to the regular method as mentioned above, that needs the 5 hr- preincubation time.

Table 3. Deveolpment of Rabbit Eggs Fertilized In Vitro by spermatozoa treated with LPC

No. of Exp.	No. of eggs cultured	The final stage of eggs developed(%)				
		2-cell	4-cell	8-cell	Morula	Blastocyst
02	23	3	3	1	7	7
05	25	5	2	8	5	5
06	25	2	4	4	6	9
Total	73	10(13.7)	9(12.3)	13(17.8)	20(27.4)	21(28.8)

LPC; Lysophosphatidyl choline

The percentage of eggs fertilized by LPC-treated spermatozoa to develop to the morula and blastocyst stage was in ranging of 27.4 - 28.8% , as shown in Table 3. When developed to the 4-cell to blastocyst stage( Fig -1a,b),the embryos were transferred surgically into the oviducts or uteri of recipient does(Dutch Belted does). There were 13 implantations and 20 normal young born from 10 recipients transferred with 62 embryos(Fig 2).

Our experiment, as like other experiments, have shown that rabbit eggs obtained from in vitro fertilization can develop to normal fetuses. The protocols decribed here have been rigorously tested and, if carefully followed, will produce satisfactory results given a minimum of investigor skill.

It is often indicated to be difficult to compare data from IVF studies by different laboratories and/or using different species. In part, this is due to the wide variety of culture media and procedures used for IVF. Use of the same medium and essentially the same procedures for several diverse species can help to provide more meaningful comparative data. Our IVF procedure described here could be applied to wide mammalian species.

#### references

- 1)Akruk, S.R. humphreys, W.J. and Williams, W.(1979): in vitro capacitation of ejaculated rabbit spermatozoa. Differentation, 13, 125 - 129.
- 2)Brackett, B.G. and Oliphant, G.,(1975): Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. Biol. Reprod., 12, 260 - 274.
- 3)Hosoi, Y.,Niwa,K. and Iritani,A.(1981):In vitro capacitation of rabbit epididymal spermatozoa and in vitro fertilization of

eggs by the spermatozoa, Jpn. J. Zootech. Sci., Suppl. 72, 145

- 4) Rogers, B.J. (1978) Mammalian sperm capacitation and fertilization in vitro : A critique of methodology. Gamete Res., 1, 165-223.
- 5) Sato, K. (1984) In vitro capacitation of ejaculated rabbit sperm cells. Jpn. J. Fertil. Steril., 29, 179 - 185.
- 6) Sato, K. and Suzuki, Y. (1985) In vitro fertilization of rabbit eggs by ejaculated spermatozoa capacitated in a modified Tyrode's solution. J. Mamm. Ova res., 2, 121 - 124.
- 7) Sato, K., Suzuki, Y. and Wakata, S. (1986) Scanning electron microscopic study of in vitro fertilization in the rabbit. J. Mamm. Ova Res., 3, 56 - 72.
- 8) Sato, K., Suzuki, Y. and Endo, M. (1987) Effects of retinol and taurine on capacitation and the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. Jpn. J. Fertil. Steril., 32, 118 - 122.
- 9) Sato, K. and Goto, T. (1990) In vitro capacitation and fertilizing ability of rabbit spermatozoa treated with lysophosphatidyl choline. Jpn. J. Fertil. Steril., 35, 209 - 212.
- 10) Yanagimachi, R. (1981): Mechanisms of fertilization in mammals. In Mastroianni, L. and Biggers, J.D. (eds): fertilization and Embryonic development in vitro. New York, pp 255-295.
- 11) Yanagimachi, R. (1988): Mammalian fertilization. In Knobil, E. and Neill, J. (eds): The physiology of Reproduction. Raven Press, New York, pp 135-185.

射出精子を用いたウサギ卵子の体外受精に関する検討

後藤 勤、 横田 秀夫、 佐藤嘉兵

日本大学農獣医学部動物細胞学教室

ウサギの射出精子を用いた体外受精法はいくつかの実験が試みられているが、今だに十分な受精率が得られる安定した方法は確立されているとは言い難い。我々はウサギ射出精子による安定した受精が得られる方法について検討した。得られた結果は以下のとおりであった。射出精子を洗浄した後にアルブミンを添加した修正タイロード液中で4-5時間のincubationを行ってcapacitationを誘起した。この精子を用いて排卵卵子を体外受精(IVF)を行うと平均して92%以上の受精が得られた。また、その受精卵子の78.3%以上がin vitroの条件下で発生した。これらの結果はすでに類似の条件下で行った我々の教室からの報告と類似した結果であった。また短時間でcapacitationを誘起する目的で上述の培養液中で射出精子を1時間incubationを行い、その後50  $\mu$ g/mlのlysophosphatidyl choline(LPC)を添加した培養液中で15分間感作させた。感作後、新鮮な培養液に精子を移して30分間incubationを行ってIVFに用いた。その結果、非常に高い安定した受精率が得られた。これらの方法によって得られた受精卵子の体内での発生能について調べるために偽妊娠を誘起した雌ウサギの卵管あるいは子宮内に受精卵子を移植した結果、何れの方法で得られた受精卵子も正常な発生を示して新生仔が得られた。以上の結果から、本実験で使用したIVFにより安定してウサギの受精卵子得られること考えられた。

# 牛屠場卵巣由来卵母細胞の時間経過と 成熟・発生能との関係について

Relation of the in vitro maturation and the period of the time after  
aspiration of the oocytes from slaughtered ovaries in bovine.

岡本かをり\* 藤井千春\*\* 西片芳恵\*  
月原隆司\* 山本政生\*\*\* 鈴木達行\*\*\*

Kawori OKAMOTO\* Chiharu FUJII\*\*  
Yoshie NISIKATA\* Takashi TSUKIHARA\*  
Masao TOMAMOTO\*\*\* Tatsuyuki SUZUKI\*\*\*

\* 山口大学農学部獣医学科  
\*\* 広島県経済連  
\*\*\* 山口大学大学院連合獣医学研究科

\* Veterinary Sciences, Department of Agriculture, Yamaguchi University.  
\*\* Economical Cooperation of Hiroshima Prefecture.  
\*\*\* United Graduate School of Veterinary Sciences, Yamaguchi University.  
Yamaguchi 753, Japan

Abstract: Oocytes were aspirated and collected into modified PBS from follicles in bovine ovaries obtained from slaughter house. These oocytes were washed twice with PBS and kept in mPBS for 1, 2, 3, 4 and 5 hours at 37 °C respectively until they began to culture for maturation. After keeping at each hour, the oocytes were transferred into culture medium (25mM Hepes Buffered TCM-199 supplemented with 5% FCS), and then culture in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> in air at 38.5°C during 20~22hours. For in vitro fertilization, each 10~20 matured oocytes were suspended in 100  $\mu$ l of B0 solution which was adjusted sperm concentration to  $4 \times 10^6$ /ml and added with caffeine(5mM/ml) and heparin(10  $\mu$ g/ml). After a sperm-oocyte mixing was co-incubated for 6 hours, and then these fertilized ova were transferred into the TCM-199(earl's salt) supplemented with 1% FCS and continued to culture for development. The maturation rates to Metaphase-II of 1(78%) or 2 hours(70%) were significantly higher( $P < 0.05$ ) than those of 3(49%) or 4 hours(31%), respectively, and the cleavage rates of 4(28%) or 5 hours(32%) were significantly lower( $P < 0.05$ ) than that of 1(78%), 2(72%) or 3 hours (62%), respectively. The rates of blastocyst developed in 1hours(13.3%) was significantly higher( $P < 0.05$ ) than that of 2(7.1%) or 3 hours(5.6%), respectively. There were no development of blastocyst in the case of 4 and 5 hours. these results indicate that oocytes kept on shorter times are increasing in their development to blastocyst stages than those of longer times for transfer into maturation media after collection of oocytes.

## 緒 言

屠畜場由来ウシ卵子を用いた体外受精は、Lambert et al.<sup>8)</sup> (1986), Sirard et al.<sup>13)</sup> (1985), 花田ら (1986), Crister et

a l.<sup>3)</sup> (1986) によりウサギやメ羊の卵管で発生させた胚を移植し受胎成功例並びに分娩が報告された。その後、E y e s t o n & F i r s t<sup>4)</sup> (1988) および G o t o e t a l.<sup>6)</sup> (1988) はそれぞれ卵管上皮細胞、卵丘細胞との供培養により移植可能胚の作出に成功し、実用化への道が開けてきた。しかし、これらの手法により安定的に移植可能胚を作出していくためには、未だ多くの課題が残されている。体外へ取り出された卵巣からより多くの正常卵子を得るためには、それに関与すると考えられる様々な要因を解析し明確にしておく必要がある。一つには屠場から研究室までの輸送温度と正常発生卵子数との関係が明らかにされている。すなわち、ヒトの体外受精では卵子の輸送温度を30-32℃に保持した場合に良好な結果が得られている (Q u i n m e t a l.<sup>11)</sup>, 1984)。C h e n g e t a l.<sup>2)</sup> (1986) は豚と羊で採取された卵巣の保存温度が卵子の成熟、発生に関与すると述べ、とくに豚では適温が30-37℃の広範囲であるとしている。また、Y a n g e t a l.<sup>16)</sup> (1990) は牛で20℃の保存温度で8時間保持した卵巣から採取した卵子を体外成熟させ受精した場合、満足のいく結果が得られたと述べている。このように卵巣の輸送温度が胚の成熟、発生に影響するならば一旦卵巣から体外へ採り出された卵子は、もっとその保存温度や保存時間に影響を受ける可能性が大きい。実際に顆粒膜細胞から剥がされた卵子は大きな環境変化が生じ卵核胞の崩壊が開始されることが判っている (Y a n g e t a l.<sup>16)</sup>, 1990)。そこで筆者らは屠畜場由来ウシ卵巣から採取した卵母細胞を決まった温度でそれぞれ一定時間保持し、採取後の時間経過とその後の成熟および発生能との関係を明らかにするために以下の実験を行なった。すなわち、吸引採取した卵母細胞を温度37℃、湿度100 %の条件下で1, 2, 3, 4, 5時間保持し、それぞれの時間保持した卵母細胞を培養液5 %CS加TCM-199内に移して成熟させ、体外受精を行なった。各保持時間ごとの卵の成熟率並びに胚の分割率について比較検討し、興味ある知見を得たので報告する。

## 材料および方法

### 1. 卵子の採取と成熟培養

広島市食肉市場で得られたホルスタイン由来卵巣で、合計182個を37℃に保温したリンゲル氏液を含む保温瓶に収め、約2時間の輸送を経て研究室に運んだ。卵巣は37℃に保温した恒温槽内の滅菌ビーカー内に移し、21Gの針付きシリンジで直径2-5mm大の卵胞から卵子を吸引後0.3 %ウシ血清アルブミン (B o v i n e S e r u m A l b u m i n, 以下BSA) 添加リン酸緩衝液 (P h o s p h a t e B u f f e r e d S a l i n e, 以下PBS) に集め、回収シャーレ (鈴木ら<sup>14)</sup>, 1987) 内で洗浄後顕微鏡下で選別したの

ち、前記PBSに移し、37℃で1, 2, 3, 4, 5時間保持した。それぞれの保持時間で190, 574, 208, 90, 138個の卵子を成熟用培地 (5%ウシ胎仔血清 [Fetal Calf Serum, 以下FCS] 添加 25 mM Hepes buffer TCM-199 [Earle's salt]) の100  $\mu$ l 内に20個ずつ入れ、38.5℃, 5%CO<sub>2</sub>, 90%O<sub>2</sub> 気相条件下で20-22時間培養した。

## 2. 卵子の成熟率

20-22時間の成熟培養後、採取後1, 2, 3, 4, 5時間の各保持時間についてそれぞれ41, 43, 47, 45, 46個の卵子を、酢酸+メタノール (1:3) の液で12時間固定した後2%アセトアルセイン液で1-2分間染色し、検鏡により成熟状態を確認した。

## 3. 媒精および発生培養

卵子の成熟培養の20-22時間後に、最終濃度が5mM caffeineと5  $\mu$ g/ml heparinとなるように調整したBrackett & Oliphant<sup>1)</sup> (1975) 液 (以下BO) 内で $4 \times 10^6$  個に調整した100  $\mu$ l のドロップ内に20個前後の卵子を入れて38.5℃, 5%CO<sub>2</sub>, 90%O<sub>2</sub> 気相条件下で6時間媒精した。次いで媒精終了後5%FCS添加TCM-199培地に戻して38.5℃, 5%CO<sub>2</sub>, 90%O<sub>2</sub> 気相条件下で7-8日間培養した。なお培養液の交換は48時間経過ごとに行なった。

## 4. 分割率と移植可能胚率の判定

媒精後48時間ごとの培養液の交換時に卵子の分割状態を観察し記録した。なお、媒精後7日目または8日目までの培養で胚盤胞期にまで発生したものを移植可能胚とした。

## 結 果

1, 2, 3, 4, 5時間の各保持時間におけるMetaphase-IIでの成熟率は、それぞれ78% (32/41), 70% (30/43), 49% (23/41), 31% (14/45), 13% (6/46)、1, 2, 3, 4, 5時間の各保持時間での分割率は、それぞれ78% (148/190), 72% (413/574), 62% (129/208), 28% (25/90), 32% (44/138) となり、1と2時間区では有意差は認められなかったが4と5時間で著しい低下がみられ、それぞれ1, 2時間区とのあいだに有意差が認められた (1, 2時間区と4時間区:  $P < 0.05$ , 1, 2時間区と5時間区:  $P < 0.01$ )。また前記各保持時間での胚盤胞胚への発生率は、それぞれ13.2% (25/190), 7.1% (41/574), 5.8%

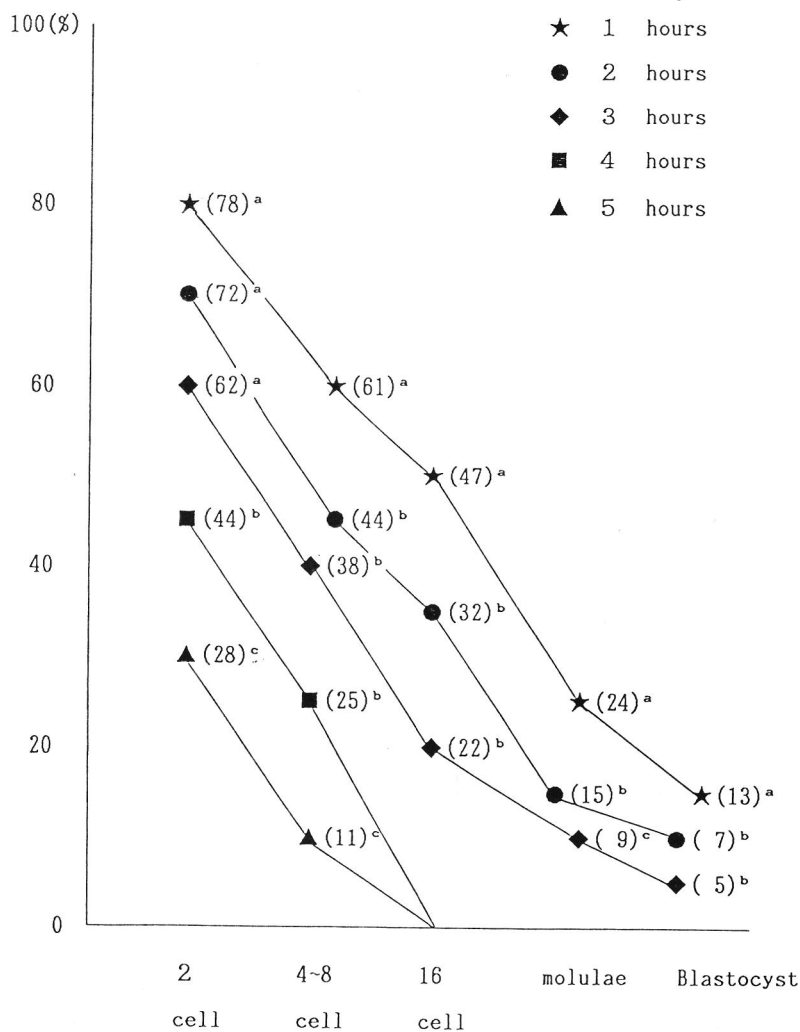


Fig.1 In vitro cleavage and development of bovine embryos on day 8 after fertilization.

The developmental rates of the groups with different superscripts differ statistically significant :  
ab, bc(P<0.05), ac(P<0.01).

と、卵子採取後、成熟培養開始までの時間が短い程有効と考えられる。E y e s t o n e ら<sup>4)</sup> (1988) は卵管上皮細胞との供培養により25%のウシ卵子が桑実胚から胚盤胞胚へ発育したと述べている。また、G o t t o ら<sup>6)</sup> (1988) は卵子を卵丘細胞との供培養により15%の高率に胚盤胞胚へ発育させた。U t s u m i ら<sup>15)</sup> (1988) もこれに準じた方法で得た胚盤胞胚の移植で産子を得ている。このように卵子をとりまく卵丘細胞や特殊な蛋白は、発

Table 1 In vitro maturation of oocytes upon the  
suspended times into maturation media

Suspended times	% Metaphase II
1 hrs	78 (32 /41) a
2 hrs	70 (30 /43) a
3 hrs	49 (23 /47) b
4 hrs	31 (14 /45) b
5 hrs	13 (6 /46) c

The maturation rates of the grienps with different  
superscripts differ statistically significant :  
ab, bc( $P<0.05$ ) ; ac( $P<0.01$ ).

(12/208) , 0% (0/90) , 0% (0/138) となり、1時間区では、2, 3時間区に比べて有意 ( $P<0.05$ ) に高く、4と5時間区では発生例がみられなかった。

## 考 察

本実験で示したように体外に取り出された卵子は時間を追うごとに成熟率並びに分割率が低下し、胚盤胞胚への発生率は1時間区で最も高く、2, 3時間区で急激に低下し、4, 5時間区では全く発生しなかった。これは、現在の操作条件下では一旦体外に取り出された卵子は短時間のうちに生存性と発生能を消失することを示す。それ故、卵子の保存液や保存温度の適正域を探し出しておく必要がある。Yangら<sup>16)</sup> (1990) は、卵巣の輸送温度が4℃あるいは25℃の低温に置かれた場合に胚の発生率が高まると述べ、その理由として卵巣の活性を低下させることによる酵素消費量の減少であるとしている。本実験では採取後の卵子が体温に近い37℃に置かれたため、採取液中での代謝がかなり活発に促進されたものと考えられる。このように成熟培地内に移される前の100%空気条件下では卵子の代謝や発生能にとって至適環境でなかったことを示すと考えられる。また保存液が修正PBSであり、卵子の代謝に必要な有機物の組成やそれらの比率が至適でなく保持時間中の生存性を消失させたものと考えられる。ウシの体外受精における卵子の成熟は20~24時間の比較的短時間で誘起される(花田ら<sup>7)</sup>, 1986, Luら<sup>9)10)</sup>, 1987) ことから考える

生のために重要なファクター (Shioyaら<sup>12)</sup>1988, Gandolfi & Moor<sup>5)</sup>1988) であり、これらが体外において保存容器, 保存液や保存温度などに関連して不適正下に置かれると共存する卵子と共に変性過程を辿る危険性がある。このことから考えると、採取後の卵子は、Yangら<sup>16)</sup> (1990) の示したような20℃の比較的低温に置いて代謝を抑えるか、または代謝を促進させても安全なTCM-199培地, Ham' s F-10やタイロード液などの組織培養液内に保存したり、更には安全性の高い容器内で5% CO<sub>2</sub> 気相条件下で保存するなどの細かい処置が必要と考えられる。

#### References

- 1) Brackett B and Oliphant G (1975) : Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. Biol. Reprod. 12:260-274.
- 2) Cheng WTK, Moor RM and Polge C (1986) : In vitro fertilization of pig and sheep oocytes matured in vivo and in vitro. Theriogenology 25:146 (abstr.).
- 3) Critser ES, Leibfried-Rutledge ML, Eyestone WH, Northey DL and First NL (1986) : Acquisition of developmental competence during maturation in vitro. Theriogenology 25:150 (abstr.).
- 4) Eyestone WH and First ML (1988) : Co-culture of bovine embryos with oviductal tissue. In: Brief Communications: 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. pp. 471-473.
- 5) Gandolfi F and Moor RM (1988) : Interactions between somatic and germinal cells during early development. 11th Int. Congr. Animal Reprod. & AI, 5:170 (abstr.).
- 6) Goto K, Kajihara Y, Kosaka S, Koba M, Nakanishi Y and Ogawa K (1988) : Pregnancies after in vitro fertilization of cow follicular oocytes, their incubation in vitro and their transfer to the cow uterus. Theriogenology 29:251 (abstr.).

- 7) Hanada A, Suzuki T and Shioya Y (1986) : Birth of calves from non-surgical transfer of blastocyst originated from in vitro fertilization oocytes matured in vivo. Proc. 78th. Ann. Meet. Jpn. Soci. Zootech. Sci. P18 (abstr.).
- 8) Lambert RD, Sirard MA, Bernard C, Be'land R, Rioux JE, Leclerc DP and Bedoya M (1986) : In vitro fertilization of bovine oocytes matured in vivo collected at laparoscopy. Theriogenology 25:117-133.
- 9) Lu KH, Buland MP, Croshy TF and Gordon I (1987) : In vitro fertilization of cattle oocytes matured in vitro. Theriogenology 27:251 (abstr.).
- 10) Lu KH, Gordon I, Gallagher M and McGover H (1987) : Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilization of oocytes matured in vitro. Vet. Record. 121:259- 260.
- 11) Quinn P, Warnes GM, Kerin JF and Kindy C (1984) : Culture factors in relation to the success of human in vitro fertilization and embryo transfer. Fertil-stenil. 41: 202-209.
- 12) Shioya Y, Kuwayama M, Iwasaki S and Hanada A (1988) : In vitro fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured in vitro. Theriogenology 30:489-496.
- 13) Sirard MA and Lambert RD (1985) : In vitro fertilization of bovine follicular oocytes obtained by laparoscopy. Biol. Reprod. 33:487-494.
- 14) Suzuki T, Matsuda S, Sakai Y and Ishida I (1987) : Recovery of bovine embryos by invented cervical mucus remover and ova. Jpn. Anim. Reprod. 33:160-162.
- 15) Utsumi K, Katoh H and Iritani A (1988) : Developmental ability of bovine follicular oocytes matured in culture and fertilized in vitro. Theriogenology 29:320(abstr.).
- 16) Yang NS, Lu KH and Gordon I (1990) : In vitro fertilization(IVF) of bovine oocytes from stored ovaries. Theriogenology 33:352(abstr.).

第 32 回  
哺乳動物卵子学会

講演要旨集

会 期	平成 3 年 4 月 27 日
会 場	日本大学会館



# 第32回哺乳動物卵子学会

## 講演要旨集

Proceeding of the 32 th Annual Meeting Japan Society for  
Mammalian Ova Research.

哺乳動物卵子学会

# 哺乳動物生殖系列細胞核の全能性と多能性

## Totipotency and pluripotency of nuclei in mammalian germ line

角田幸雄

Yukio Tsunoda

近畿大学農学部畜産学教室

Laboratory of Animal Reproduction, College of Agriculture,

Kinki University

哺乳動物の初期発生は、精子と卵子が受精することによって開始され、図1に示すように、有糸分裂をくり返して細胞数を増加させながら1個の個体を形成するために整合性を保ちつつ分化していく。すなわち、受精卵は定まった周期で2細胞、4細胞へと分裂し、胚盤胞期に達して将来胎子となる内細胞塊と胎子胎盤を形成する栄養外胚葉へと初めて分化する。内細胞塊は、さらに原始外胚葉と原始内胚葉とに分化し、前者から胎子本体が、後者からは主として胎膜が形成される。着床後、前者は内胚葉、外胚葉、中胚葉へと分化し、それぞれの胚葉から種々の器官が形成され、個体として分娩された後成熟、老化し死に至る。同時に生殖細胞が出現するが、これは減数分裂（卵子形成あるいは精子形成）をへて半数体の精子や卵子を形成し次代へ遺伝形質を伝えていく唯一の「不死」の細胞群であり、このつながりが生殖系列（germ line）と称されている。

受精した直後の卵子は、1個の個体を形成する能力をもつ全能性細胞であるが、上述のように分裂をくり返し分化していく過程で細胞の核はどの時期まで全能性を維持しているのであろうか。また、個体を形成することができないまでも、種々の組織へ分化できる能力（キメラ形成能、多能性と称する）を保持しているのであろうか。哺乳動物の発生は生体内で進んでいくため、これらの問題を明らかにするための手法は確立されておらずほとんど解明されていないが、本講演ではこれまで明らかにされている点について紹介したい。

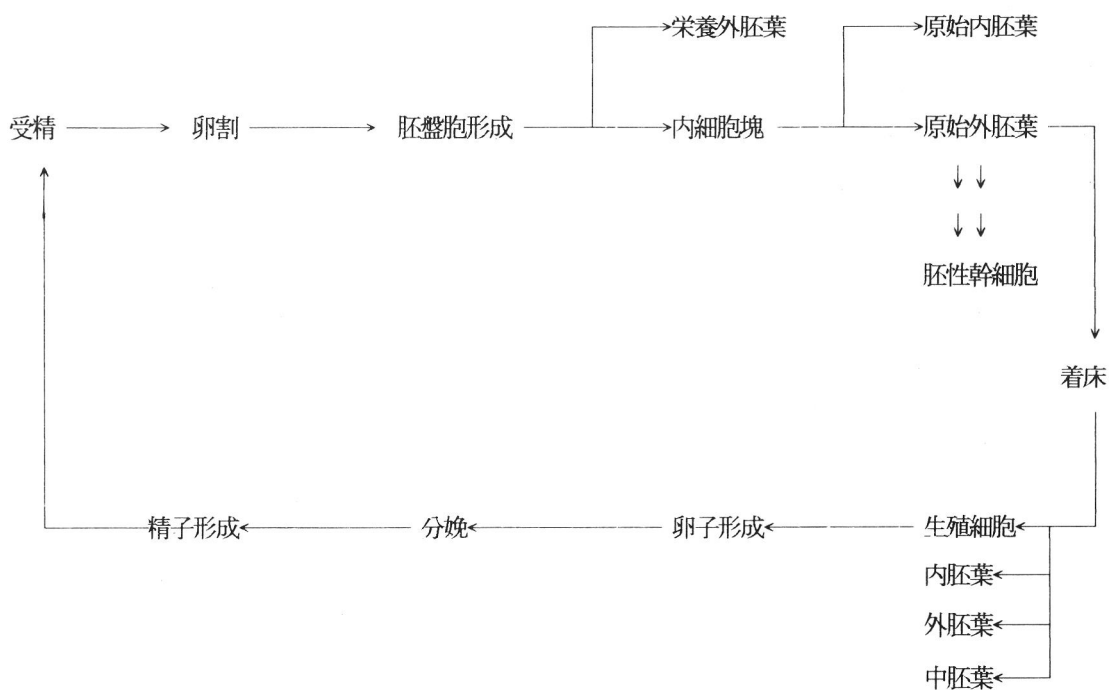
これまで、8細胞期までの胚の割球操作によって正常な個体が得られていることから、哺乳動物では少なくともこのステージまでの大部分の割球の核は全能性を維持していることは明らかである。また、第2減数分裂中期の染色体を除去した未受精卵の細胞質と8～32細胞期胚の割球を融合させて作出した再構築胚（核移植胚）の移植によってウサギ、ヒツジやウシで産子が得られている。さらに、ヒツジでは胚盤胞内細胞塊細胞の核移植によって産子が得られており、これらの細胞核の全能性が証明されている。また、発生の進んだ原始外胚葉や胚性幹細胞由来のキメラが作出できていることから、これらの細胞核は多能性を保持することが明らかで

ある。また、妊娠11.5日齢以降のマウス胎子期生殖細胞の多能性も検討されているが、これまでの所positiveな結果は得られていない。

このような研究は、哺乳動物における発生・分化の機構解明に貢献するのみでなく、応用的にもクローンやコピー動物の作出に必要な基礎知識を与えるものと思われる。

本講演における演者らの成績は、加藤容子氏(近大農)はじめ多くの共同研究者と、科学技術庁振興調整費「発生工学」、文部省科研費(01102028)、ヒューマンサイエンス財団基礎研究費、バイオ科学研究所特別助成金などを受けて実施されたものである。

図1. 哺乳動物の初期発生過程(マウスを例として)



# マウス老化期にみる生殖能と卵母細胞数の 急減現象について

## The rapid decrease of female fecundability and the oocyte number in aging mice

北 嶋 朋 子・一 戸 喜兵衛

Tomoko KITAJIMA, Kihyoe ICHINOE

手稲一溪仁会病院 ティネ生殖研究室

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

**目的：** 婦人の生殖能にみられる老化・衰退は特定年齢に忽然とおこり、かつきわめて急速に進行すること、またこの時期に一致して卵巣における卵母細胞の急激な消退のみられることを明らかにしてきた<sup>1,2)</sup>。

今回はマウス (C57BL/6J) において、ヒトと同様に生殖能の老化がやはり特定齢で急速に進行すること、およびこれと軌を一にして卵巣に卵母細胞数の激しい減少がおこるのを観察したので報告する。

**方法：** マウス (C57BL/6J) の加齢上にみる生殖能の変化について、生後55～99日, 100～199日, 200～299日, 300～399日, 400～499日, 500日以上と加齢上で6区にわけ、またとくに400日齢代では400～449日と, 450～499日の2区間に細分し、これらの区間における出産可能率の推移を比較検討した。なおここでの区間出産可能率は各区間での出産回数の頻度ではなく、出産しえた母体の頻度 (%) で表したもので、全区間観察対象数は延べ757頭であった。

一方また卵巣146個における卵母細胞数の加齢的変動の観察は、生後100日齢以後50日ごとに600日齢までの10区間にわけて行い、夫々の区間の卵巣での比較算定値の平均を比較検討した。

卵母細胞数の測定は、厚さ2  $\mu$  の卵巣組織切片の H.E.染色標本で、黄体や発育および成熟卵胞を除いた間質単位面積 (1mm<sup>2</sup>) あたりに分布する卵母細胞 (原始卵胞) 数を Nikon Cosmozone 1S で算定し、夫々の区間卵巣での比較値として用いた。この比較値は卵巣の卵母細胞の絶対数とは異なり、卵巣における卵母細胞の分布密度をみたもので、加齢区間での変動推移の比較基準となるよう卵巣の部位を異にした5枚内外の組織切片で卵母細胞の密度を算定、平均したものである。

**成績：** マウス (C57BL/6J) の加齢上における (1) 出産可能率の推移は、Table-1 に示すように、100日齢代, 200日齢代の出産可能率は最も高く、300日齢代での出産可能率は配偶の雄を適宜若齢に変えても、緩やかな減衰傾向を示した ( $P < 0.0001$ )。しかしこれに続く母齢400～450日では僅か50日の短期間に、配偶は若齢雄にもかかわらず300日齢代の出産可能率に比べて突如 1/4 へと更なる激減がみられた ( $P < 0.0001$ )。

また500日齢以後では127頭中での出産は皆無であった。

(2) また卵巣における一定面積 (1mm<sup>2</sup>) 中の卵母細胞数 (密度) の推移は, 100日齢から300日間にほぼ一定勾配で減少し, その75%が消失すると推定された。しかし続く400~450日齢の生殖能上の特定齢に一致して, 卵母細胞数の急激な消失がみられた (Table-2)。この50日という短期間に350~399日値に比して, 1/4 という僅かな卵母細胞数を残すまでに急減した。500日齢以後の残留卵母細胞はきわめて稀で, 600日齢以後は完全に消失する。

**考察:** ヒト40代前半期の特定齢で始動する婦人生殖能の急激な衰退の背景として, 卵子の老化が考えられている。その一面を徴表するかのように, 40代初頭の短期間に, 予備卵子にあたる卵母細胞数に激しい消失がおこる。今回この老化現象のモデル動物としてマウス (C57BL/6J) を用い, 生殖能の老化のありようと, その推移にかかわるとおもわれる卵巣での卵母細胞数の変動について観察した。雌マウスが400日齢を過ぎて僅か50日の期間に生殖能の急落がおこるが, その軌跡をなぞるかのように, 卵母細胞数の激しい消失をみた。この時期の卵母細胞は, 予備細胞としての数量に止まらず質的にも変化が大きく, 変性傾向のつよまること<sup>3)</sup>が窺われている。

**結論:** 雌マウス (C57BL/6J) の老化による生殖能の低下は特定齢で急におこり, かつ急速に進行して短期間に生殖が止む。またこの衰退の軌跡と平行して同期間の卵巣の卵母細胞数は激減することをたしかめえた。

これらの加齢上よりみた生殖能の老化の推移は, 婦人での pattern とよく一致した。

**文献:** 1) 一戸喜兵衛 (1989)。加齢と性機能, 日医師会誌, 102, 473~477。

2) 一戸喜兵衛, 他 (1990)。更年期の卵巣背景, 産婦の世界, 42, 797~806。

3) 山口辰美 (1987)。高齢マウスにおける無核卵の多発性に関する研究, 北海道医誌, 62, 537~543。

Table-1 Age-related fertility rates in C57BL/6J mice

Age in days	Animals observed	Fertility rates(%)
55~ 99	88	64.8
100~199	95	96.8
200~299	93	92.5
300~399	109	67.9
400~449	123	17.1
450~499	122	8.2
500~	127	0

\* highly significant ( $p < 0.0001$ )

Table-2 No. of oocytes in ovary(per mm<sup>2</sup>) with advancing age in C57BL/6J mice

Age in days	Examined cases	No. of oocytes per mm <sup>2</sup> ( $m \pm SE$ )
100~149	14	46.4 $\pm$ 4.5
150~199	25	33.2 $\pm$ 2.5
200~249	18	29.1 $\pm$ 2.9
250~299	22	16.9 $\pm$ 1.7
300~349	13	15.6 $\pm$ 1.9
350~399	13	10.6 $\pm$ 1.8
400~449	13	2.4 $\pm$ 0.6
450~499	11	1.3 $\pm$ 0.6
500~599	6	0.9 $\pm$ 0.6
600~	11	0

\* highly significant ( $p < 0.001$ )

# ブタ体外成熟・体外受精卵の雄性前核形成に及ぼす グルタチオン合成阻害剤の影響

Effect of Glutathione synthesis inhibitor on the  
male pronuclear formation of pig oocytes matured  
and fertilized in vitro

吉田光敏・番場公雄・小島義夫

Mitsutoshi YOSHIDA, Kimio BAMBA and Yoshio KOJIMA

静岡大学農学部応用生物化学科

Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University

【目的】グルタチオン(GSH)は生体内に最も多く存在する非タンパク系チオール(SH化合物)である。GSHはタンパク質やDNAの合成、アミノ酸移送および細胞の酸化防止などに際して役割を果たすとされる<sup>1)</sup>。一方、マウス<sup>2)</sup>やハムスター卵<sup>3, 4)</sup>ではGSHは成熟に伴って合成され、受精後の精子の雄性前核への発達に必要な因子であると報告されている。しかし、ブタ卵の成熟・受精におけるGSHの意義については明らかでない。本研究ではGSH合成阻害剤であるButhionine sulfoximine(BSO)の成熟培地への添加がブタ卵の体外成熟・体外受精に及ぼす影響を調べ、ブタ卵の成熟・受精におけるGSHの役割と動態を明らかにすることを目的とした。

【方法】ブタ卵の体外成熟と体外受精法は基本的に既報<sup>5)</sup>に準じた。すなわち、卵は食肉衛生検査所で採取したブタ卵巣から回収し、成熟培地内で36時間(0hr)培養した。卵は卵丘細胞層の状態を観察後、受精培地(mTCM-199)へ移した。成熟培地にはWaymouth MB 752/1液にホルモン(PMSG, hCG, E<sub>2</sub>), 10%FCSおよび10%PFを添加したものを用いた。体外受精は種雄ブタから採取した射出精子を洗浄後、2.5-5.0万/mlの精子濃度で卵へ媒精して行った。卵は媒精16~18hr後に固定・染色し、成熟・受精状況を調べた。実験Iでは成熟培養開始直後(0hr区)、12hr後および24hr後にBSO(1mM)をそれぞれの成熟培地へ添加し、無添加区と成熟・受精状況を比べた。実験IIでは成熟培養15hr後、18hr後、21hr後および24hr後にBSO(1mM)をそれぞれの成熟培地へ添加し、体外受精後の成熟・受精状況を調べた。なお、推計学的分析は $\chi^2$ 検定で行った。

【結果】実験Iの結果は表1に示した。BSO添加区における卵丘膨潤化率、核成熟率、および受精率は無添加区と比べて差は見られなかった。一方、侵入精子頭部の発達は成熟培養早期からBSOを添加した区で抑制された。すなわち、雄性前核形成率は無添加区と比べて、BSO添加0hrおよび12hr区で有意に減少した( $P<0.01$ )。

しかし、BSO 添加24hr区における雄性前核形成率は無添加区と比べて差は見られなかった。侵入精子頭部の発達は実験IIにおいても実験Iと同様に、培養開始後のBSO 添加時期が早い区ほど抑制された。すなわち、雄性前核形成率はBSO 添加24hr区(82.0%) と比べ、BSO 添加15hr(11.4%)、18hr(10.9%)、および21hr区(38.6%)で有意に減少し( $P<0.01$ )、さらに、BSO 添加21hr区と比べ、BSO 添加15hrおよび18hr区で有意に減少した( $P<0.05$  or  $P<0.01$ )。

Table 1. Effect of glutathione synthesis inhibitor (Buthionine sulfoximine:BSO) on in-vitro maturation and fertilization of pig oocytes

Time of BSO-treatment after culture	No. (%) of oocytes			
	Cumulus expansion	Maturation	Fertilization	Male pronucleus
Control	94/101(93.1)	84/93 (90.3)	68/84 (81.0)	61/68(89.7) <sup>a</sup>
0 hr	114/125(91.2)	96/113(85.0)	73/96 (76.0)	1/73( 1.4) <sup>b</sup>
12 hr	118/126(93.7)	101/115(87.8)	81/101(80.2)	2/81( 2.5) <sup>b</sup>
24 hr	85/93 (91.4)	76/85 (89.4)	60/76 (78.9)	47/60(78.3) <sup>a</sup>

a vs b:  $P<0.01$

【考察】本研究の結果から、ブタ卵の成熟に伴うGSHの合成が、受精後の雄性前核形成能に大きな影響を及ぼすことが示された。BSOはGSH合成の最初の反応を触媒する酵素である $\gamma$ -グルタミルシステインシンテターゼを特異的に抑制することにより、GSHの合成を阻害する<sup>1)</sup>。そして、BSO(1mM)はハムスター卵<sup>2)</sup>およびラット胚<sup>3)</sup>のGSHの合成を顕著に抑制し、また、卵丘膨潤化や核成熟に対してBSOの影響は見られなかった。従って、BSOによる雄性前核形成の抑制は毒性効果によるものではなく、GSH合成阻害効果によると考えられた。一方、ブタ卵の雄性前核形成能はBSO添加24hr区と無添加区での差は小さく、BSO添加24hr区と21hr区での差は大きかったことから、ブタ卵のGSH合成が成熟培養24hrまでにほぼ完了すると示唆された。そして、卵の核成熟能や精子の受精能が高くと、受精前に卵のGSHが十分に合成されていなければ、受精後の発生能は低下すると考えられた。

【文献】1)Griffith, O.W. and Meister, A. (1979) J. Biol. Chem., 254, 7558-7560.

2)Calvin, H.I., Grosshans, K. and Balke, E.J. (1986) Gameta Res., 14, 265-275.

3)Perreault, S.D., Barbee, R.R. and Slott, V.L. (1988) Dev. Biol., 125, 181-186.

4)Perreault, S.D. (1990) In: Fertilization in mammals, 285-296.

5)Yoshida, M., Ishizaki, Y. and Kawagishi, H. (1990) J. Reprod. Fertil., 88, 1-8.

6)Slott, V.L. and Hales, B.F. (1987) Biochem. Pharmacol., 36, 683-688.

# 牛卵子の卵核胞崩壊（GVBD）に関わる 細胞質要因について

## Induction of Germinal Vesicle Break Down(GVBD) by Cytoplasmic Factors in Bovine Oocytes

建本秀樹・堀内俊孝・山田 學

Hideki TATEMOTO, Toshitaka HORIUCHI, Manabu YAMADA

広島県立大学生物資源学部生物資源開発学科

Department of Bioresources, Hiroshima Prefectural University

【目的】 卵子は減数分裂再開の際に卵核胞崩壊（GVBD）を行う。このGVBDは、動物種によって違いがあるものの蛋白合成阻害剤（cycloheximide等）やcyclic AMP（cAMP）等によって阻害される<sup>1)</sup>。しかし、M期とGV期の卵子との融合卵が、これらのGVBD阻害剤の存在下であってもGVBDを誘起することが、両生類（ツメガエル）<sup>2)</sup>、マウス<sup>3)</sup>、ブタ<sup>4)</sup>等の卵子で報告されている。この融合卵におけるGVBD誘起は、M期卵子の細胞質に由来する蛋白性の要因によるものであり、卵子のGVBDには特異的な蛋白合成が不可欠であることが認められている。したがって、本研究では、成熟培養時に蛋白合成阻害剤（cycloheximide）を添加することで牛卵胞卵のGVBD誘起に関わる細胞質要因を検討した。

【方法】 牛卵胞卵は、屠場で入手した卵巣の小卵胞（直径1～5mm）を吸引採取することで得た。この卵胞卵のうち、本研究には卵丘細胞に密に覆われた卵子だけを供試した。

卵胞卵の成熟培養にはTCM-199に10% CSと1.2IU/ml FSHを添加した成熟培地を用いた。実験1では蛋白合成阻害剤（cycloheximide, 0.1～50μg/ml）を成熟培地に添加することによって蛋白合成阻害が牛卵胞卵のGVBDに及ぼす影響を調べた。実験2では24時間の成熟培養時間に、経時的にcycloheximide 25μg/mlを成熟培地に添加し成熟過程における卵子の蛋白合成を阻害することによって、GVBDに関わる蛋白の合成時期を検討した。また、実験3では採取直後の2つのGV期の卵（GV+GV卵）、およびGV期の卵と24時間の成熟培養を行ったM期の卵（GV+M卵）を電気刺激により融合した。これらの融合卵を25μg/ml cycloheximideを添加した成熟培地（阻害剤添加区）と無添加の成熟培地（阻害剤無添加区）の2区に分け、それぞれを4時間培養した後固定し核相を判定した。

【結果】 牛卵胞卵のGVBDは5μg/ml以上のcycloheximideで完全に阻害された（実験1）。

また、牛卵胞卵のGVBDは、通常の成熟培養では6時間後に誘起され始めたが、成熟培養開始時から経時的にcycloheximideを成熟培地に添加したところ、5時間の成熟培養を行った後に蛋白合成を阻害した卵子で初めてGVBDが認められた（24.1%, 14/58）。しかも、9時間の成熟培

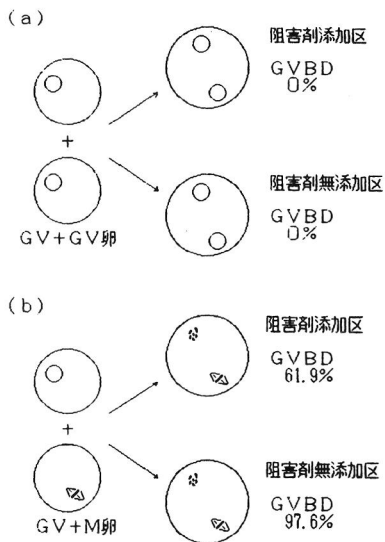


図 1. 融合4時間後の牛卵胞卵のGVの変化  
(a) GV期同士の融合卵では、蛋白合成阻害剤の添加に関係なくGVBDは起きない。  
(b) GV期とM期の卵子の融合卵では、蛋白合成阻害剤無添加区における卵子のGVBD出現率が蛋白合成阻害剤添加区の卵子よりも有意に高い ( $P<0.01$ )。

養を行った後にcycloheximideを添加した卵子では、92.4% (49/53)の率でGVBDが認められ、通常の成熟培養によるGVBD率 (96.7%, 51/52) との間に有意な差はなかった ( $P>0.01$ ) (実験2)。

一方、実験3ではGV期同士 (GV+GV卵) を、融合後、cycloheximideを添加あるいは無添加の培地で4時間の培養を行ったところGVBDを誘起した融合卵はどちらの区にも認められなかった (図1)。しかし、GV期の卵子をM期の卵子と融合した融合卵 (GV+M卵) では、cycloheximideの添加区と無添加区の両区間で有意な差があるもののGVBDが両区で認められた (61.9%, 26/42; 97.6%, 41/42) ( $P<0.01$ )。

【考察】 以上の結果から、蛋白合成阻害剤によって牛卵胞卵のGVBDは阻害されることより、牛卵のGVBD誘起には何等かの蛋白合成が必要であることが明らかとなった。しかも、その蛋白はGVBD約1時間前までには合成されているものと思われた。一方、M期卵の細胞質要因は蛋白合成阻害剤存在下であってもGV期卵の

GVBDを誘起するものの、高率でしかも完全な減数分裂再開を維持するにはGVBDまでの継続的な蛋白合成が必要であった。同様なことはブタ卵でも報告されており<sup>5)</sup>、両生類の卵子の報告とは異なっている。一般に、成熟促進因子 (MPF) によってGVBDは誘起されることが報告されている<sup>2)</sup>。牛卵のGVBD誘起は蛋白合成阻害剤に対して鋭敏であり、しかもM期の細胞質要因によるGV期卵のGVBD誘起にも継続的な蛋白合成を必要とすることから、牛卵胞卵細胞質内のMPFは両生類の卵子等と比較して合成ならびに活性化の点で異なっているものと推察される。

## 【主要文献】

- 1) Motlik, J.: Cytoplasmic aspects of oocyte growth and maturation in mammals. J. Reprod. Fert., Suppl. 38 (1989)
- 2) Gerhart, J., Wu, M. and Kirschner, M.: Cell cycle dynamics of an M-phase-specific cytoplasmic factors in *Xenopus laevis* oocytes and eggs. J. Cell Biol. 98 (1984)
- 3) Balakier, H. and Czolowska R.: Cytoplasmic control of nuclear maturation in mouse oocytes. Exp. Cell Res. 110 (1977)
- 4) Fulka, J. Jr, Motlik, J., Fulka, J. and Jilek, F.: Effect of cycloheximide on nuclear maturation of pig and mouse oocytes. J. Reprod. Fert. 77 (1986)
- 5) Fulka, J. Jr, Flechon, J.-E., Motlik, J. and Fulka, J.: Does autocatalytic amplification of maturation-promoting factor (MPF) exist in mammalian oocytes? Gamete Res. 21 (1988)

# 体内および体外発育マウス胚におけるDNA・RNA合成の検討

DNA and RNA synthesis in mouse embryos developed in vivo and in vitro

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〕 従来、初期胚の発育能の評価には主として形態学的観察が用いられてきたが、これには限界があることも指摘されている。本研究では、マウス初期胚の発育をDNA およびRNA 合成を指標として評価することを目的としin vivo およびin vitro発育胚のDNA およびRNA 合成の比較検討を試みた。

〔方法〕 B6C3 F<sub>1</sub> 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時間 (Day 2), 68 時間 (Day 3) あるいは 92 時間 (Day 4)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%CO<sub>2</sub> in Airにて、24あるいは48時間培養し、桑実胚、胚盤胞へ発育した後、体内発育桑実胚および胚盤胞は採取後直ちにmethyl-[<sup>3</sup>H] thymidine (50  $\mu$ Ci/ml)あるいはmethyl-[<sup>3</sup>H] uridine (50  $\mu$ Ci/ml)を含むBWW 培養液中で 4時間培養した。 [<sup>3</sup>H] thymidine および [<sup>3</sup>H] uridine の取り込み値(incorporation) は前回の報告に準じて 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 [<sup>3</sup>H] ラベルした前駆物質中での培養 0時間値を差し引いて算出した。

〔結果〕 [<sup>3</sup>H] thymidine あるいはuridine の取り込み開始時では、in vitro 発育胚と in vivo発育胚の間に実体顕微鏡下での形態に明らかな差は認められなかった。 thymidine の取り込み値は in vitro、in vivo共に 桑実胚から胚盤胞へ発育するに従い、約 3倍に増加した。 uridine の取り込み値は in vitro で約 50 倍、in vivoで約 43 倍と著明な増加を示した。 in vitro発育胚と in vivo発育胚を比較すると、thymidine、uridine の取り込み値は桑実胚、胚盤胞とも in vivo発育胚で有意に高値を示した (Table 1)。

Table.1 [ $^3\text{H}$ ] thymidine and [ $^3\text{H}$ ] uridine incorporation in mouse embryos developed in vitro and in vivo

		Morula	Blastocyst
Thymidine	in vitro	592.1 $\pm$ 139.2	1876.5 $\pm$ 216.1
incorporation			
(dpm/embryo)	in vivo	781.9 $\pm$ 128.8	2235.2 $\pm$ 318.5
Uridine	in vitro	102.1 $\pm$ 62.5	5955.1 $\pm$ 1362.7
incorporation			
(dpm/embryo)	in vivo	305.1 $\pm$ 108.5	12989.0 $\pm$ 1745.8

Values are mean  $\pm$  SD.

〔考察〕 ヒトあるいは家畜体外受精において、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。理想的には非侵襲的で簡便な方法が移植前胚の評価には必要であるが、侵襲的な方法でも客観的で定量的な方法であれば培養条件の改良のための指標とすることができる。今回、我々は、thymidine および uridineの取り込みからDNA およびRNA 合成を検討することにより、胚発育能を評価することを試みた。桑実胚から胚盤胞に発育するに従い DNA 合成および RNA合成は in vitro および in vivo発育胚とも同様の割合で増加を示した。in vitro とin vivo 発育胚の比較では、いずれの発育段階においても DNAおよび RNA 合成ともに in vivo発育胚で有意に高く、特に RNA合成は in vivo発育胚で約 2倍の高値となり、形態学的には評価し得ない両者の機能的な差を示していることも考えられる。今後、in vitro での培養環境を in vivo に近づけるための新たな指標として本法の有用性が示唆された。

〔主要文献〕

1. 原田 省、谷川正浩、大野原良昌、見尾保幸：マウス初期胚発生段階における DNA合成の検討。哺乳動物卵子研究会誌 7巻 1号：31，1990.
2. Fischer B: Development retardation in cultured preimplantation rabbit embryos, J Reprod Fert, 79, 115, 1987.
3. Daentl DL and Epstein CJ: Developmental interrelationships of uridine uptake, nucleotide formation and incorporation into RNA by early mammalian embryos. Dev Biol, 24, 428, 1971.

# マウス分離割球の発生に及ぼす 分離及び再集合時期の影響

Effect of stage of separation and re-aggregation  
on the development of mouse blastomeres

森 匡・小川 英彦・清水 弘

Tadashi MORI, Hidehiko OGAWA, Hiroshi SHIMIZU

北海道大学農学部畜産学科

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture,  
Hokkaido University

目的: 哺乳類動物胚の発生・分化に関する機序については、細胞分裂が進んで内側細胞が形成される時期に将来内部細胞塊を形成するように分化する細胞と、栄養芽層細胞になるように分化する細胞が決定されるという、いわゆる inside-outside 説が有力である。マウスにおいてこの分化決定が最初に行われる時期は8細胞期から16細胞期とされており、この時、周囲を他の細胞によって囲まれている細胞は栄養芽層細胞に、周囲を完全に囲まれた細胞は内部細胞塊細胞に発生すると考えられている。

4細胞期で分離後、異なる発生時期に再集合させたキメラ胚から発生した個体内での、キメラ胚構成細胞の寄与率を調べることは、この仮説を確かめるための一つの方法である。

本実験ではキメラマウス作出に先立ち、キメラ胚作出に適した条件を確立するために、2系統のマウスより得られた無処理正常胚と分離割球の発生速度の系統間比較を行った。さらに、外側に集合させる分離割球について、分離処理のその後の発生に及ぼす影響を調べ、分離割球の再集合に適した時間を決定した。

方法: 実験には、ICR(アルビノ)とC57BL/6j(黒毛色)の2系統のマウスを用いた。ICRでは体外受精と自然交配により、C57BL/6j(以下CB)では体外受精により受精卵を得た。体外受精においては消灯2時間前にPMSG 5iuとその48時間後のhCG 5iu腹腔内投与により過排卵処理を施し、hCG投与後14時間に卵管より成熟卵を採取し、予め成熟培養した同系統の精子と体外受精した。受精用培養液にはHTFを用いた。自然交配においては過排卵処理後雄マウスと交配し、hCG投与後16時間に顆粒層細胞と精子の付着した卵を採取した。体外受精または自然交配により得られた卵はHTFで6時間、その後はCZB培養液でさらに24時間培養した。この培養により2細胞期卵に発生した卵をBWW培養液に移してその後の発生を継続させ、胚発生速度の系統間比較実験を行った。培養条件は気相 5%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>, 90%N<sub>2</sub>、温度37.4℃、

飽和湿度とし、6時間毎に顕微鏡による形態観察を行った。

分離割球の発生に伴う形態的变化を観察するために、培養により胚が4細胞期に発生した段階で割球分離を行った。CaとMgを欠いたPBI中に約5分間保持して割球間の接着を弱めた後、0.1%プロナーゼ溶液によって透明帯を除去し十分な洗浄の後、BWWドロップ中でピペッティングを繰り返すことによって割球を分離した。分離後2から4個の分離割球を5 $\mu$ lの培養液ドロップに移してその後の培養を行い、細胞数、割球のコンパクションの有無、腔形成の有無について、顕微鏡観察を6時間毎に行った。

分離割球の再集合は、割球接着用培養液としてフィトヘマグルチニンを5 $\mu$ l/mlの濃度で添加したBWWを用い、中心にCBの4細胞期胚由来の単一割球(1/4割球)がくるように、培養により分裂したICR 1/4割球(2/8分離胚および4/16分離胚)を4個、その周囲に接着した。割球接着用培養液中で15から30分間インキュベートした再集合胚を洗浄した後、BWWドロップに一つずつ移して培養し、その後の形態観察を行った。

結果： 体外受精した卵の、前核形成率、2細胞期胚発生率、4細胞期発生率、および無処理胚の胚盤胞発生率はICRでそれぞれ、62%、60%、40%、32%、CBでは68%、59%、44%、53%であった。

無処理胚の発生については、50%が2細胞期胚に発生する時間がICRで媒精後約20時間、CBで17時間と、CB胚がより早く2細胞期に達する傾向が見られた。さらに、媒精後48時間にCB胚の75%が4細胞期胚に発生したのにたいして、ICR胚では66%であった。CB胚のより早い発生の傾向はその後も続き、培養した胚全体に占める8細胞期胚、桑実胚、胚盤胞の割合が最も高まる時間は、CBでそれぞれ媒精後54、72、90時間であったのにたいして、ICRでは媒精後60、84、96時間であった。

ICR胚を4細胞期で分離した割球において、コンパクション及び腔形成が観察される時間はそれぞれ媒精後60時間と66時間であり、無処理の正常胚でこれらの形態変化が観察される時間と同じであった。

CBの1/4割球とICRの2/8から4/16の分離胚を集合させた時、ICR分離胚の発生経過時間が媒精後60時間未満でコンパクションを起こしていない場合には、一つに集合した桑実胚を経過して胚盤胞に発生したが、媒精後72時間以上経過してコンパクションを起こした分離胚を集合させた場合には、CBの1/4割球と集合せず複数の胚盤胞を形成した。

考察： 同じ時間に体外受精した卵の発生速度を比較すると、ICRはC57BL/6jよりも、2細胞期胚に発生するのに約3時間、2細胞期以降には約12時間、発生が遅かった。ICR系マウスは体外培養した時2-cell blockを起こすことが知られているが、この発生の遅れも遺伝的な原因によると考えられる。分離割球と無処理正常胚の発生を比較すると、細胞分裂、コンパクション、腔形成に関して、差異は認められなかった。本実験では、再集合胚においてICR分離胚が栄養芽層細胞に分化する傾向を高めることを目的に、4細胞期で分離した割球を培養により2/8分離胚に発生させた。集合胚が高率に胚盤胞に発生するためには、CB胚が4細胞期にある時期にICR分離胚がコンパクションを起こしていないことが条件の一つであり、そのためには、体外受精を36時間早める必要がある。

細胞骨格系阻害剤を用いた  
マウス 2 細胞期胚の細胞周期の同調  
特に濃度の検討

Synchronous division of mouse 2-cell embryos with nocodazole,  
with special reference to the minimal and maximal concentrations

加藤容子・角田幸雄  
Yoko KATO, 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：近年，核移植においてドナー核とレシピエント卵細胞質との細胞周期の一致が再構築胚の発生に重要であることが示されてきている<sup>1, 2)</sup>。演者らも，マウス胎子期生殖細胞を 2 細胞期胚へ核移植した際，ドナー核とレシピエント細胞質との細胞周期が一致している場合にその後の分裂が高いことを示唆した（第78回家畜繁殖学会）。そのため演者らは，ノコダゾールを用いて F<sub>1</sub> マウス（C57BL×CBA）の 2 細胞期胚を培養すると，その後の体外での発生能及び産子生産率に悪影響なく分裂中期に同調させることができることを報告し（第84回日本畜産学会），ノコダゾールによる細胞周期の同調が核移植に応用できることを示した。本実験では，細胞周期の同調が可能なノコダゾールの最低濃度ならびに阻害作用の現れない最高濃度を知る目的で検討したのでその概要を報告する。

方法：2 細胞期胚の採取，処理法については既報のとおりである（第84回日本畜産学会）。すなわち，過剰排卵処理 F<sub>1</sub>（C57BL×CBA）雌を F<sub>1</sub> 雄と交配し，hCG 後 43～46 時間目に 2 細胞期胚を採取した。ついで，オイル下の M2+BSA ドロップ内で 6～7 時間 4℃で保存したのち，ノコダゾール（0.006～15  $\mu\text{g/ml}$ ）を添加した M16+BSA ドロップ内にそれぞれ移して 5% 炭酸ガス，95% 空気の気相，37℃の条件下で 13～17.5 時間培養した。その後，コントロール胚が 4 細胞期へ発生していることを確認して，それぞれの 2 細胞期胚を M2 液で洗浄して薬剤を除去した。M2 液で洗浄後，培養器内の胚を 1 時間毎に観察し，薬剤除去後同調して正常な分裂が起こるか否かを検討した。さらに，M16+BSA ドロップ内で 3 日間体外培養を継続し，胚盤胞への発生率を検討した。

結果：ノコダゾール添加液内で培養した 2 細胞期胚は，濃度が 0.03  $\mu\text{g/ml}$  以上で全ての胚が分裂を停止し，9  $\mu\text{g/ml}$  添加までは，薬剤除去後の胚盤胞への発生に大差はみられなかった。薬剤添加が 0.015  $\mu\text{g/ml}$  以下では一部（19～77%）の胚においては 2 細胞期での停止がみられ，停止胚の大部分（85～100%）が胚盤胞へ発生した。なお，停止しなかった胚については全ての胚が胚盤胞へ発生し

た。また、処置濃度にかかわらずノコダゾール処理中にフラグメントを起こす胚がいくつかみとめられた。薬剤除去後、12  $\mu$ g/ml以上の濃度では28%の胚が1時間で4細胞期に分裂したが、72%の胚は2時間以上経過後分裂するかあるいはフラグメントを起こした。9  $\mu$ g/ml以下の濃度では、80%の胚以上が洗浄後1時間以内に同調して4細胞期へ分裂した。

以上の結果より、ノコダゾールを用いてF<sub>1</sub>マウスの2細胞期胚の細胞周期をその後の発生能を阻害することなく同調させる有効濃度は0.03~9  $\mu$ g/mlの範囲内であることが明らかとなった。

1)Smith, L. C., Wilmut, I. and Hunter, R. H. (1988) J. Reprod. Fert. 84, 619.

2)Smith, L. C., Wilmut, I. and West, J. D. (1990) J. Reprod. Fert. 88, 655.

Table. Effect of concentrations of nocodazole on development of mouse 2-cell embryos in vitro.

Concentrations of nocodazole ( $\mu$ g/ml)	Two-cell embryos used	No. of embryos stopped at 2-cell stage	No. of embryos developed to	
			4-cell stage *	blastocysts *
			(%)	(%)
0	128	—	126( 98)	121( 95)
0.006	31	0( 0)	—	—
0.0075	34	13( 38)	13(100)	11( 85)
0.01	21	4( 19)	4(100)	4(100)
0.015	22	17( 77)	17(100)	16( 94)
0.03	13	13(100)	13(100)	13(100)
3.0	93	93(100)	84( 90)	60( 65)
9.0	22	22(100)	22(100)	18( 82)
12.0	50	50(100)	24( 48)	13( 26)
15.0	40	40(100)	7( 18)	6( 15)

\* Number of embryos developed from embryos stopped at 2-cell stage.

# 性腺機能低下症 (hypogonadal) マウスの体外受精の試み

## In vitro Fertilization in recessive hypogonadal mice

橋爪 一善・\*高木 優二・\*辻井 弘忠・濱島 房則

Kazuyoshi HASHIZUME, \*Yuji TAKAGI  
\*Hirotsada TSUJII, Fusanori HAMAJIMA

防衛医科大学校 動物実験施設・\*信州大学 農学部

Center for Laboratory Animal Science, National Defense Medical College  
and \*Faculty of Agriculture, Shinshu University

(目的) 性腺機能低下症 (hypogonadal、以下 h p g) マウスは、性腺刺激ホルモン放出ホルモンに関わる遺伝子が先天的に欠損しているため、生殖腺が性成熟の時期に到達しても未発達であり、生殖が不可能である。この形質は劣性遺伝であり、生殖腺の発育とホルモンの関係を検索するモデルとして有用性が期待される動物である。すでに、劣性ホモ動物に正常個体の視床下部の移植、ホモ個体の生殖腺の正常動物への移植および性腺刺激ホルモンの投与により、生殖腺の発育が回復することが知られている<sup>1)</sup>。しかしながら、発育が回復した生殖腺からの精子および卵子が正常か否かはまだ明かではない。それは人為的に生殖腺の発育を回復させた個体の交配が容易でないためである。また、ホルモン処理により精子形成が回復した雄 h p g 個体の交尾能力は明かでない。このような交配が困難な動物の生殖能の検索に体外受精法は極めて有効な手段と言える。

我々は、今回、雄 h p g マウスに妊馬血清性性腺刺激ホルモン (以下 P M S G) 処理を行い精子形成の回復を試み、発育した精子の受精能を体外受精法により検索した。更に、それらの精子により受精した卵子の発育についても観察した。

(材料および方法) 米国ジャクソン研究所由来のヘテロ雌雄マウスから生産した h p g 雄マウスを実験に供した。生後 40 日を越えても精巣の発育が認められない個体を h p g (ホモ) 個体と判定した。生後 8 週令以降 5 I U の P M S G を約 60 日間ほとんど毎日皮下投与した。約 60 日間の投与後、精巣上体を採取、精巣上体尾部を培養液中で破碎、浮遊精子を受精試験に供した。対照群として生後 11 - 20 週令の同系正常雄マウスを用いた。

受精試験は豊田<sup>2)</sup>の方法に準じて行った。受精用の卵子は成熟ICR系雌マウスに48時間間隔で5IUのPMSGおよびhCGを腹腔内投与し、過排卵したものをを用いた。精巢上体精子は、TYH液中で1時間の前培養後、受精試験に供した。受精の判定は、極体の放出およびホールマウント標本により行った。一部の卵子はGPM液(Serono-JAPAN)中で培養を継続し、卵子の発育を観察した。培養は全て、38.5℃、5%CO<sub>2</sub>、90%N<sub>2</sub>の条件下で行った。

(結果) PMSG処理したhpg雄マウスでは、精巢重量、精巢上体精子数および精子活力のいずれの項目とも対照群に比べ低かった(表1、 $p < 0.05$ )。受精率は、対照群の84%に対し、hpg群では精子が採取できなかった個体を除き46%と有意に低かった(表1、 $p < 0.05$ )。また、4細胞および胚盤胞への発生率は、対照群の各々93%、81%に対し、hpg群では46%、29%と有意に低かった(表2、 $p < 0.01$ )。

これらのことより、PMSG投与により精子形成が回復したhpg雄マウスの精巢上体精子は、受精能力を有しており、その精子で受精した卵子は、対照群に比較して少数ではあるが、少なくとも胚盤胞期まで発生することが明かとなった。

1) Mason, A. J., Hayflick, J. S., Zoeller, R. T., Young III, W. S., Phillips, H. S.,

Nikolics, K., and Seeburg, P. H. (1986) Science 234:1366

2) 豊田 裕・横山 峯介・星 冬四郎(1971) 家畜繁殖誌 16:147

Table 1. Fertility of spermatozoa from PMSG-treated hpg male mice

Animals	Wt. of testes (mg)	No. of sperm. (/epididymis)	Motility (%)	No. of oocytes fertilized (%)
Control 1	167	11.0x10 <sup>6</sup>	++40, +30	15/21 (71)
2	109	4.0x10 <sup>6</sup>	++40	16/18 (89)
3	134	9.8x10 <sup>6</sup>	++50	15/16 (94)
Ave. ± SD	137 ± 29	8.3 ± 3.7x10 <sup>6</sup>		(85 ± 12)
hpg 1	65	2.8x10 <sup>6</sup>	++10, +20	10/18 (56)
2	72	3.4x10 <sup>6</sup>	++20, +10	11/16 (69)
3	12	not find	-----	no try
4	19	not count	+10	3/12 (25)
5	33	not count	+10	4/14 (29)
6	25	not count	+20	8/19 (42)
7	50	not count	+20	9/16 (56)
Ave. ± SD	39 ± 23 *	3.1 ± 0.1x10 <sup>6</sup>		(46 ± 17) *

\*, Differences between groups are significant,  $p < 0.05$ .

Table 2. Development of oocytes fertilized with PMSG-treated hpg male mice

Group	No. of embryos examined	No. and (%) of developed to:		
		≥4-cell	≥Morula	≥Blastocyst
Control	27	25 (93)	25 (93)	22 (81)
hpg	24	11 (46) *	7 (29) *	7 (29) *

\*, Differences between groups are significant,  $p < 0.01$ .

# ハタネズミ胚の初期発生

## Development of Early Stage Embryos in the Japanese Field Vole, Microtus montebelli.

若山照彦・正田陽一・圓山悠子\*・小泉伸夫\*・今村憲吉\*・福田勝洋\*

T.Wakayama, Y.Shoda, Y.Maruyama\*, N.Koizumi\*, K.Imamura\* & K.Fukuta\*

茨城大学農学部 \*家畜衛生試験場

Faculty of Agriculture, Ibaraki University,

\*National Institute of Animal Health

目的：ニホンハタネズミ(*Microtus montebelli*)は草食家畜用実験動物として開発されつつあるが、繁殖特性については十分に調べられていない。別種のハタネズミにおいて、卵子の大きさが哺乳動物の中で最小であること<sup>1)</sup>、マウスとの種間キメラが最高12体節期まで進むことなど<sup>2)</sup>興味深い特性が報告されている。今回我々は、ニホンハタネズミの繁殖特性に関する研究の一環として、*in vivo* 及び *in vitro*での胚の発生速度、胚の大きさについて検索した。

方法：家畜衛生試験場で繁殖維持しているニホンハタネズミにPMSGとhCGの投与によって過排卵を誘起し、交尾経験のある雄と1時間だけ同居させ交尾の有無を観察した。交尾を許容した雌は、膈スメアで精子の有無を確認した。採卵は交尾を確認してから時間を追って、M16培養液で卵管と子宮を灌流して行い、回収した胚は、M16で37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で培養した。2細胞期胚の培養では、一部の胚についてはEDTAを100μMになるよう培養液に加えた。培養後、時間を追って胚の発生を調べ、胚盤胞への発生率を求めた。胚の大きさは、回収した1細胞期胚での細胞の直径及び透明帯も含めた外径を測定した。

結果：*in vivo*での胚の発生段階を表1に示す。体内で発生する胚は、交尾後22～24時間の間に最初の卵割を行い、46～50時間の間に次の卵割を行った。そして60時間前後には4細胞から8細胞へ、72時間前後には8細胞から16細胞になり、94時間前後には胚盤胞になった。一方、*in vitro*での培養では、交尾後21～24時間に回収した53個の1～2細胞期胚は、3～4細胞期胚になるものもあるが、EDTAの添加の有無にかかわらず8細胞期胚以上には発達しなかった(0/53, 0%)。交尾後48～53時間に回収した55個の2～4細胞期胚は、47個が胚盤胞にまで発達した(47/55, 85%)。胚の大きさについては、交尾後22時間以内に採卵した3個体から得られた1細胞期胚の細胞の平均直径は68μmで、透明帯も含めた胚の平均直径は87μmであった。

考察：ニホンハタネズミの初期発生では、マウスの初期胚に比べてより早く2細胞期胚になりそのまま24時間2細胞期が続くが、4細胞期以降での発生は一致した。このようなハタネズミの発生速度は、同科別属のヤチネズミの初期胚と類似していた<sup>3)</sup>。体外培養では、交尾後

Table 1: Development of Japanese field vole eggs in vivo

Time after mating(hr)	Total no. of voles	Total no. of eggs	No. of blastomeres							
			1	2	3	4	4-8	8-16	blastocyst	abnormal
21-22	4	35	29	6						
24	2	19	5	13						1
45-46	4	21		16	2					3
48-49	5	55	2	21	5	23				4
53	2	17				6				11
59-61	3	27				4	13			10
72	1	43					10	14		19
94	1	9						5	4	

48時間以降に回収した胚ならば2細胞期胚でもM16で発生が進むことが明かとなったが、それ以前に回収した胚の発生は、EDTAを添加しても進まなかった。こうしたことから、ハタネズミではマウスより強い2cell blockが存在すると考えられる。胚の大きさはマウス胚よりわずかに小さい程度であった。ハタネズミはマウスと同様の過排卵処置により発情と交尾を誘起するが過排卵の効果はほとんどなく<sup>4)</sup>、また交尾排卵型動物であるため<sup>5)</sup>、交尾刺激がなければ排卵しないなどの問題点がある。今後は、排卵時間、過剰排卵のためのホルモンの投与量と投与間隔、1細胞期胚からの体外培養について検討したい。

#### 参考文献

- 1) 菅原七郎(1986). 哺乳動物の卵子, "図説哺乳動物の発生工学実験法"  
菅原七郎編, 学会出版センター, P.10.
- 2) Mystkowska, E.T. (1975). Development of mouse-bank vole interspecific chimaeric embryos. J. Embryol exp Morph., 33, 731-744.
- 3) Mystkowska, E.T. (1975). Preimplantation development in vivo and in vitro in bank voles, *Clethrionomys glareolus*, treated with PMSG and HCG.  
J. Reprod. Fert., 42, 287-292.
- 4) 田中亮一, 吉田達行, 對馬宣道, 引地宏二, 川原尚人(1989). 未経産ハタネズミに対する過剰排卵処置について. 第82回日本畜産学会大会講演要旨集, P.22.
- 5) 後藤信男, 橋詰良一(1978). ハタネズミ(*Microtus montebelli*)の排卵様式.  
哺乳動物学雑誌, 7, 181-186.

# ハムスター 1 細胞期胚培養による胚盤胞形成

## Blastocyst formation in vitro of hamster embryos cultured from single cell stage

馬岡 陽・野田洋一・内川喜久・大前ゆかり・  
成本勝彦・中山貴弘・後藤康夫・森 崇英

Yoh UMAOKA, Yoichi NODA, Kiku UCHIKAWA,  
Yukari OHMAE, Katsuhiko NARIMOTO, Takahiro  
NAKAYAMA, Yasuo GOTO, Takahide MORI

京都大学医学部婦人科学産科学教室

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

**目的：**ハムスター胚の体外培養における発生効率を改善するために、培養液、採卵所要時間および低酸素下培養が及ぼす影響を1細胞期胚を用いて検討した。

**方法：**8週齢雌ゴールデンハムスターにPMSG15単位を腹腔内投与して72時間後に同系雄と同居させ、翌朝膈内に精子が確認されたものを妊娠1日目とした。妊娠1日目の午後4時(12 hr post egg activation)に屠殺し卵管還流法にて1細胞期胚のみを回収し本実験に使用した。培養液はBavisterらの方法に準じmTALP<sup>1)</sup>およびHECM-1<sup>2)</sup>を用いた。培養はミネラルオイル下に作成した100 $\mu$ lの培養スポットに各々約10から15個の胚を移し、インキュベーターで72時間連続培養し、egg activation後84時間に胚の形態を観察した。基本培養は大気中で採卵し、5% CO<sub>2</sub> in air, 37°Cの気相下で72時間の培養を行なった。低酸素下培養は、可及的に酸素濃度を5%の条件下に維持できる閉鎖系をinfant incubator(ATOM社)を改良して作製<sup>5)</sup>し、この装置内で胚の回収を行ない、培養は5%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>, 90%N<sub>2</sub>の気相下で72時間連続して行なった。このような基本的培養条件下で実験を行ない、各種培養環境要因のうち、①培養液(mTALPおよびHECM-1)、②酸素濃度(5%および20%)、③採卵所要時間(5分および10分)の3要因がハムスター1細胞期胚発生に及ぼす影響を検討した。各実験の結果は $\chi^2$ 検定を用い有意差を判定した。

**結果：**培養液mTALPでは、低酸素下培養で採卵所要時間を5分と短縮しても4細胞期胚率は0%(0/108)であり4細胞期以後の胚発生は認められず2-cell block現象が成立することが確認された。一方培養液HECM-1を用いると、基本培養で採卵所要時間5分および10分、低酸素下培養で採卵所要時間5分および10分の8細胞期胚率は、各々48.4%, 34.0%, 81.8%および64.2%であった。採卵所要時間に関しては時間が短縮すると成績は良好となり、酸素濃度に関しては低酸素下培養が基本培養と比べ有意に成績が良好であり、2-cell blockおよび4-cell block現象の解除効果が確認された。以上より培養液HECM-1を用いれば、低酸素および短時間採卵による胚発生促進

効果が認められた。

考察：本研究では、egg

activation 12時間後の至適

培養条件下 (HECM-1, 採卵

所要時間5分, 低酸素下培

養)で, ハムスター 1細胞期

胚を培養すると, 20.8%の胚

盤胞率が得られた。タイロ

ード培養液に4種類のアミ

ノ酸を添加した従来の培養

液mTALPでは, 例え低酸素下培養で可及的に採卵時間を短縮しても依然として2-cell block 現象は解除できず,

培養液の構成成分に欠陥があることが明らかとなった。さらにmTALPと同一の培養条件でHECM-1を用いる

と, 8細胞期胚までの発生が可能であったことより, Bavisterの推論<sup>23)</sup>と同様に, 体外培養においてglucose

および無機リン酸によるエネルギー代謝の傷害が発生し, block現象に関与していると考えられた。さらにマウ

スと同様にハムスター胚の初期発生においても, 酸素濃度が無視できぬ影響を及ぼしていることが明らかとな

った。我々は酸素毒性の観点から,  $O_2^-$ の消去系酵素であるsuperoxide dismutase(SOD)を用いた実験で, マウ

スにおいて低酸素下培養およびSOD添加低酸素下培養の有用性を既に報告している<sup>45)</sup>。本実験における低酸素

下培養で基本培養と比べ, 8細胞期胚率および胚盤胞率が有意に高値であったことより, ハムスターにおいて

も低酸素下培養の有用性が実証された。しかしin vivo胚発生効率に比べると, 未だ胚発生効率は悪く低酸素下

採卵で採卵時間を短縮すれば, 胚盤胞率が有意に高値を示したことから考えて, 酸素毒性の影響以外にその他

の要因例えば採卵時の可視光線や紫外線の影響に関与している可能性が示唆された。本研究は昭和63年度文部

省重点領域研究「生殖系列」および科研費一般研究B(01480391)によって助成された。

文献：

- 1) Bavister BD, Leibfried LM, Lieberman G : Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. Biol. Reprod. 28:235, 1983.
- 2) Shini SA, Bavister BD : Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. Biol. Reprod. 39:1183, 1988.
- 3) Seshagiri PB, Bavister BD : Phosphate is required for the inhibition by glucose of hamster 8-cell embryos in vitro. Biol. Reprod. 40:607, 1989.
- 4) Noda Y, Matsumoto H, Umaoka Y, Tatsumi K, Kishi J, Mori T : Involvement of superoxide radicals in mouse 2-cell block phenomenon. Molec Reprod Devel 1991 ; in press.
- 5) 馬岡 陽, 野田洋一, 松本 央, 森 崇英 : マウス初期胚培養における酸素毒性の影響, 日不妊会誌, 35:285, 1990

ハムスター 1細胞期胚培養に培養液, 酸素濃度, 採卵所要時間が及ぼす影響

培養液	採卵・培養気相	採卵所要 時間 (分)	実験 回数	1細胞期 胚数	≥ 4細胞期 胚数 (%)	≥ 8細胞期 胚数 (%)	胚盤胞数 (%)
m-TALP	大気中採卵・基本培養 (5 % CO <sub>2</sub> in air)	5	8	99	0 ( 0 )	0 ( 0 )	0 ( 0 )
		10	8	101	0 ( 0 )	0 ( 0 )	0 ( 0 )
	低酸素下採卵培養 (5 % O <sub>2</sub> , 5 % CO <sub>2</sub> , 90 % N <sub>2</sub> )	5	8	113	0 ( 0 )	0 ( 0 )	0 ( 0 )
		10	8	107	0 ( 0 )	0 ( 0 )	0 ( 0 )
HECM-1	大気中採卵・基本培養 (5 % CO <sub>2</sub> in air)	5	6	62	45 (72.6)	30 (48.4)	1 ( 1.6 )
		10	4	50	29 (58.0)	17 (34.0)	0 ( 0 )
	低酸素下採卵培養 (5 % O <sub>2</sub> , 5 % CO <sub>2</sub> , 90 % N <sub>2</sub> )	5	6	77	73 (94.8)	63 (81.8)	16 (20.8)
		10	6	81	63 (77.8)	52 (64.2)	6 ( 7.4 )

採卵時刻は, 妊娠1日目午後4時 (12 hr post egg activation)

$\chi^2$  test

\*: P < 0.05, \*\*\*: P < 0.005

# 各種培養条件下でのラット前核期胚発育の検討

## Rat Pronuclear Embryo Culture under Various Conditions

岸 淳二・野田洋一・成本勝彦・馬岡 陽・森 崇英

Junji KISHI, Yoichi NODA, Katsuhiko NARIMOTO,  
Yoh UMAOKA, Takahide MORI

京都大学医学部婦人科学産科学教室

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

**目的：**ラット初期胚の培養は極めて困難であり、2細胞期および4細胞期での胚発生の停止[1]が知られている。本研究では、ラット初期胚発育にグルコース代謝が与える影響を検討するために、2種類(modified Krebs-Ringer solution (m-KRB)[2]、Hamster Embryo Culture Medium-1 (HECM-1)[3])の培養液中でラット前核期胚を培養し、その胚発生効率を比較検討した。さらに、マウス初期胚においてすでに証明されている酸素毒性からの胚の保護の必要性[4,5,6]が、種普遍的なものであるか否かを検討するために、低酸素濃度下でラット前核期胚の培養を行い胚発生効率を検討した。

**方法：**4週齢のWistar系雌ラットにPMSG15単位とhCG15単位を48時間間隔で投与した後に、同系雄ラットと交配させ、翌朝腔栓の認められたものから、hCG投与の20～22時間後に前核期胚を採取して培養を行った。培養液はm-KRB+0.4%BSAと、HECM-1+0.1%PVAの2種類を用いた。培養条件は37℃、5%CO<sub>2</sub> in airとした。また、hCG投与の48時間後および72時間後に採取した2細胞期胚と4細胞期胚の培養をm-KRB+0.4%BSAを用いて行った。低酸素濃度下胚培養は培養液にHECM-1を用いて行い、同一のラットから採取した前核期胚を2群に分け、低酸素濃度下培養群では5%O<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>、90%N<sub>2</sub>の気相下で胚培養を行い、対照群では5%CO<sub>2</sub> in airの気相下で胚培養を行った。

**結果：**m-KRBを用いた培養では、9/181(5.0%)の胚が、前核期胚から4細胞期胚へと発育したが、8細胞期胚以降への発育は全く認められなかった。また、2細胞期胚および4細胞期胚からの培養でも8細胞期以降へと発育する胚は認めなかった。HECM-1を用いた培養では、142/221(64.3%)の胚が前核期胚から4細胞期胚へと発育し(表 I.)、さらに、31/221(14.0%)の胚が培養120時間後に胚盤胞へと発育した(表 I.)。しかし、胚盤胞からの孵化は認められなかった。HECM-1を用いた、低酸素濃度下での胚培養では低酸素濃度群で43/214(20.1%)と対照群の11/201(5.5%)に比べ有意に高い( $\chi^2$  test,  $P < 0.005$ )前核期から胚盤胞への胚発育率を得た(表 II.)。

表 I. HECM-1液中でのラット前核期胚培養

前核期胚数	4細胞期	8細胞期	桑実胚	胚盤胞
221	142(64.3%)	90(40.7%)	53(24.0%)	31(14.0%)

表 II. 低酸素濃度下でのラット前核期胚培養

酸素濃度	前核期胚数	胚盤胞数
5%	214	43(20.1%) *
20%	201	11( 5.5%)

\*  $P < 0.005$  ( $\chi^2$  test)

考察：グルコースとリン酸を含まない培養液であるHECM-1を用いることにより、前核期から胚盤胞までのラット初期胚培養が、初めて可能となった。mKRBとHECM-1の主な相違点としては、後者は前者に含まれているグルコースとリン酸を含んでいないことと、前者に含まれていない20種のアミノ酸を含んでいることが挙げられる。ハムスターではリン酸の存在下でグルコースが胚発育を抑制する[3]ことが知られており、ラットにおいてもハムスター同様にリン酸、グルコースが胚発育を抑制していることが推察される。アミノ酸のラット胚に与える影響については、8細胞期以降の胚に対して促進的効果がある[7]ことが報告されているが、4細胞期以前の胚に対する影響は未だ明らかにされていない。しかし、マウスでは、2細胞期胚から胚盤胞までアミノ酸を含まない培養液で培養可能である[8]ことや、アミノ酸の胚への取り込みが8細胞期から胚盤胞にかけて増加する[9]ことが知られている。それらの事実から推察すると、HECM-1によるラットのdevelopmental blockの解除は、アミノ酸が存在していることよりも、リン酸とグルコースが欠如していることと大きく関連していると考えられる。さらに、低酸素下で培養するとラット胚の発育促進効果が認められたことから、ラットにおいてもマウス同様に酸素ストレスからの保護が胚にとってより良い培養環境を与えることが判明し、初期胚培養における胚の酸素毒性からの保護が、種普遍的に必要とされることが示唆された。なお、本研究は文部省重点領域研究（生殖系列：No.01640004, No.02222104）および科学研究費一般研究B（No.01480391）により補助を受けた。

## 主要文献：

- 1) Mayer, J.F. and Fritz, H.I.: (1974) J. Reprod. Fert., 39:1-9.
- 2) Toyoda, Y. and Chang, M.C.: (1974) J. Reprod. Fert., 36: 9-22.
- 3) Schini, S.A. and Bavister, B.D.: (1988) Biol. Reprod., 39:1183-1192.
- 4) Quinn, P. and Harlow, G.M.: (1978) J. Exp. Zool., 206:73-80.
- 5) 野田洋一ら: (1989) 日産婦誌, 41:751-752.
- 6) Noda, Y. et al.: (1991) Molec. Reprod. Develop., "in the press".
- 7) Zhang, X. and Armstrong, D.T.: (1990) Biol. Reprod., 42: 662-668.
- 8) Cholewa, J.A. and Whitten, W.K.: (1970) J. Reprod. Fert., 22: 553-555.
- 9) Brinster, R.L.: (1971) J. Reprod. Fert., 27: 329-338.

# Hatching 前 後 に お け る 内 細 胞 塊 の 形 態 異 常

## Atypical Inner Cell Mass Formation before and after Hatching

Satoru CHIDA, Masakuni SUZUKI, Lisellote METTLER.

千 田 智 鈴 木 雅 洲 リゼロッティメットラー

スズキ病院産婦人科, Kiel 大学産婦人科

Department of Obstetrics and Gynecology, Suzuki Hospital  
Department of Obstetrics and Gynecology, Kiel University Hospital

目的：マウス受精卵を用いて培養系の quality control をしていた際、2 個の内細胞塊をもつ胞胚へ発育するものや、内細胞塊の発育不良（発育不全）と思われるものがあり、それらの Hatching 後の発育形態を plastic dish 上に接着させて観察した。またそれらの頻度について検討した。

方法：今回の報告は、西ドイツ Kiel 大学産婦人科研究室において 1987 年 12 月から 1989 年 10 月まで、Ham's F10 培養液を用いた quality control のシリーズより得たデータによるもので、マウスは C B 6 F 1 を使用した。幼若雌マウスに過排卵処理後、同系雄マウスを用いて体外受精ないし交配による体内受精にて得た 2 細胞期胚をさらに 3 日間培養し、胞胚期の内細胞塊の形態を倒立顕微鏡下に詳細に観察した。さらにそれらを CMRL-1066 培養液に移し 2 日間培養し、Hatching 後の trophoblast の dish 上での outgrowth 及び内細胞塊の発育を観察した。

結果：2 個の内細胞塊をもつ胞胚への発育率は、体内受精由来胚で 0.6 % (3 / 526), 体外受精由来胚で、3.1 % (8 / 261) と有意に体外受精由来胚において高く、またこれらの胚は Hatching 後にも 2 個の内細胞胚として 1 個の trophoblast 上に発育した (表 1)。また、1 個の内細胞塊をもつ胞胚でも Hatching 後 dish 上に 2 個の内細胞塊へと分裂発育するものがあり、体内受精由来胚で 1.2 % (4 / 346) および体外受精由来胚で 2.0 % (2 / 98) と頻度に差を認めなかった。さらに両群において胞胚期に明確な内細胞塊を認め難いものがあり、これらは Hatching 後 dish 上で trophoblast が発育増殖しても内細胞塊は発育不良ないし内細胞塊を認めない胞胚として観察された。これらの頻度は体内受精由来胚で 8.1 % (28 / 346), 体外受精由来胚で、11.2 % (11 / 98) であった。

Table 1. Number of monozygous double inner cell masses blastocysts after fertilization in vitro and in vivo.

Fertilization	No. blastocysts	No. double inner cell masses
	No. 2-cell embryos	No. blastocysts
in vivo	526/617 (85.3 %)	3/526 (0.6 %) —*
in vitro	261/373 (70.0 %)	8/261 (3.1 %) —*

\*  $P < 0.025$  by chi-square test.

Table 2. Number of monozygous double inner cell masses formation and number of no inner cell masses formation in trophoblastic outgrowth stage of single inner cell mass blastocysts.

Fertilization	No. blastocyst attachment	No. double inner cell masses	No. no inner cell masses
	No. single blastocysts	No. blastocyst attachment	No. blastocyst attachment
in vivo	346/471 (73.5 %)	4/346 (1.2 %)	28/346 (8.1 %)
in vitro	98/239 (41.0 %)	2/98 (2.0 %)	11/98 (11.2 %)

考察：今回の観察において、一卵性双胎の起源は1 胞胚内2 内細胞塊卵にあると思われるこの発生頻度は体外受精由来胚において高率であった。<sup>2)</sup> ヒト体外受精胚移植後に発生する一卵性双胎は1 絨毛2 羊膜の形態をとっており今回の観察と一致して興味深い。<sup>3) 4)</sup> 一卵性双胎の発生機序には諸説あるが、透明帯に囲まれた2 細胞期から胞胚期に生体内で2 分割することは考え難い。1 個の内細胞塊がHatching 後、着床期に分裂していくことは考えられ、臨床上結合体として認められている。しかしその頻度はきわめて低く、今回の in vitro <sup>5)</sup>での内細胞塊の分裂も dish 上における接着形態によるものと説明され子宮内膜上ではおこり難い現象である。Hatching 後 trophoblast は発育増殖するが、内細胞塊の発育しないものが観察されたが、これらは臨床上 Blighted ovum (枯死卵) となるものであろう。つまり桑実胚から胞胚に至る過程での内細胞塊の発育、形成不全が枯死卵の起源と思われる。本研究は(旧)西ドイツ Alexander von Humboldt 財団の助成を受けた。

#### 主要文献：

- 1) Chida, S. and Mettler, L. (1989). Screening test for mouse blastocysts as an index of the vitality of embryos. J. In vitro Fert. Embryo Transfer, 6, 310.
- 2) Chida, S. (1990). Monozygous double inner cell masses in mouse blastocysts following fertilization in vitro and in vivo. J. In vitro Fert. Embryo Transfer, 7, 177.
- 3) Yovich, J. L., Stanger, J. D., Grauberg, A., and Mulcahy, M. T. (1984). Monozygotic twins from in vitro fertilization. Fertil. Steril., 41, 833.
- 4) Chida, S. und Mettler, L. (1990). Monozygote Zwillingsembryoblastenentwicklung von Mausembryonen nach in vitro und in vivo Fertilisation. Reprod. Dom. Anim., 25, 173.
- 5) Hsu, Y. C. and Gonda, M. A. (1980). Monozygotic twin formation in mouse embryos in vitro. Science, 209, 605.

# 家 兎 受 精 卵 着 床 の メ カ ニ ズ ム

## A MECHANISM OF IMPLANTATION OF RABBIT FERTILIZED OOCYTES *IN VITRO*

根 上 晃<sup>1</sup>、前 田 淳一<sup>2</sup>、河 原 和 美<sup>1</sup>、富 永 敏 朗<sup>1</sup>

Akira NEGAMI<sup>1</sup>, Jun-ichi MAEDA<sup>2</sup>, Kazumi KAWAHARA<sup>1</sup>,  
Toshiro TOMINAGA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>福井医科大学産婦人科学教室、<sup>2</sup>福井県畜産試験場

<sup>1</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, Fukui Medical School.

<sup>2</sup> Fukui Prefectural Animal Experimental Station.

目的：近年、細胞培養において培養基質の導入はめざましいものがある。各種コラーゲンや基底膜成分を培養基質に導入することによって、子宮内膜細胞の機能や形態はほぼ生理的なものまで、培養系で再現することが可能になった<sup>1-3)</sup>。胞胚の最初の相互作用が子宮内膜や基底膜を含む細胞外成分であることを考え、本研究では受精卵着床の基本的なメカニズムを着床期の家兎初期胚と細胞外成分（ECM）をもちいて検討した。

方法：家兎を自然交配させ、交配後61/2日目に開腹し得た、着床前期の胚盤胞を本実験に供した。培養は5%CO<sub>2</sub>、95%空気下とし、培養液はWHF631（Waymouth：Hanks：FCS＝6：3：1）を用い、この条件下で35mm培養皿にて胞胚の接着、着床、分化の過程を観察した。ECMは各種コラーゲンやEngelbreth-Holm-Swarm腫瘍から抽出した基底膜成分（Basement membrane extracts：BME）を基質として使用した。コーティング方法は（1）基質の成分を変化させる、（2）基質の厚さを変化させる、（3）基質の濃度を変化させるの3点で検討した。培養液量の胞胚接着に与える影響の検討は胞胚の高さに応じて培養液量を変化させ解析した。

結果：コントロール、コラーゲン存在下、BME存在下の順に胞胚の接着率が向上した（図1）。BME存在下での接着率は家兎子宮内膜上皮細胞上での接着率とほぼ一致した。BMEの厚さは胞胚の発育や接着率に影響を与えるもののコントロールに比べて有意な差はなかった。BMEの濃度と接着率との相関を検討すると、2.5 - 5.0 mg/mlの濃度に至適濃度が存在した。培養液量が胞胚の接着率に与える影響を検討すると、液量が胞胚の高さの1/4 - 1/2で有意に接着率を促進させた（図2）。これらの条件下で61/2日の家兎胞胚を培養すると、BME

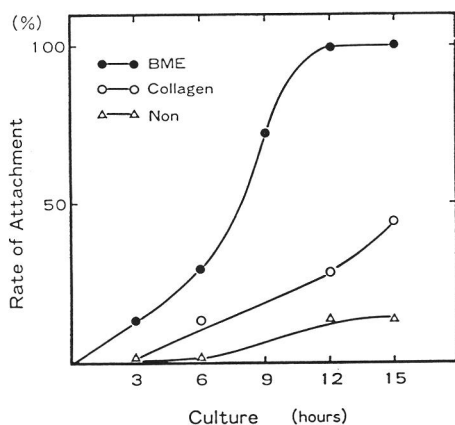


図 1. 胞胚接着率と基質

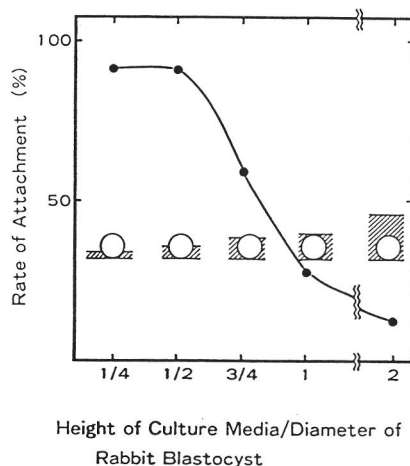


図 2. 培養液量と胞胚接着率

内やBME上で胞胚は初期発育と分化を遂行し、透明帯亀裂、孵化、内細胞塊、胚盤、原始卵黄嚢、原始線条等の観察が子宮内膜の存在なしで観察された。

考察：着床の最初のステップである胞胚の接着に基底膜成分は促進因子として働き、かつ胞胚の分化をも制御している可能性が示唆された。種が異なり着床形態もヒトのそれとは異なるものの、子宮内膜上皮細胞は中心性着床の着床現象にとって十分条件ではあるものの、必要条件ではない可能性も示唆された。培養液量は表面張力もしくは、培養気層の影響を胞胚に与える結果、着床を促進させる効果があると思われ今後さらに検討する必要があると思われた。

文献：

- 1) Negami, A.I. and Tominaga, T. : Gland and epithelium formation *in vitro* from epithelial cells of human endometrium. Human Reprod., 4: 620 (1989)
- 2) Negami, A.I. et al. : Culture model of human endometrial epithelial cells. J. Clin. Electron Microscopy, 22: 848 (1989)
- 3) Negami, A.I. et al. : A study of regulatory mechanism of human endometrial epithelial regeneration using an *in vitro* culture model. J. Fertil. Implant. (Tokyo), 7: 196 (1990)

# 受精阻害抗透明帯モノクローナル抗体 (5H4) が認識するペプチドのアミノ酸配列について

Amino acid sequence of a peptide fragment recognized by  
a fertilization-blocking monoclonal antibody (5H4) to zona pellucida.

長谷川昭子・井上みゆき・香山浩二・磯島晋三

Akiko HASEGAWA, Miyuki INOUE, Koji KOYAMA, Shinzo ISOJIMA

兵庫医科大学産婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology, Hyogo Medical College.

**目的：** 哺乳動物の卵をとりまく透明帯に対する抗体には強い受精阻害作用があり，またブタ透明帯はヒト透明帯と抗原性を強く交差することから，ブタ透明帯を用いて避妊ワクチンを開発する研究が行われている<sup>(1,2)</sup>．我々はブタ透明帯構成成分(ZP1, ZP2, ZP3, ZP4)のZP1とZP3とZP4にヒト透明帯との共通抗原が存在し，この3成分に対するポリクローナル抗体に，ヒト精子の透明帯への結合を阻害する作用があることを報告した<sup>(3)</sup>．またヒト精子の透明帯への結合を阻害するモノクローナル抗体(5H4)を作成し，その対応抗原がZP1とZP4糖蛋白質の蛋白質部分に存在することを発表した<sup>(4)</sup>．本研究では，5H4が認識するペプチドフラグメントをZP4から単離し，そのアミノ酸配列について検討を行った．

**方法：** ブタ透明帯を70℃，30分加熱処理して可溶化し，還元条件の調製用SDS-PAGEによりZP4(MW:23K)を単離した．100μgのZP4蛋白質に対し，Endoproteinase LysC 2.5μgまたはtrypsin 1μgを加え，37℃，2時間処理することにより断片化した．これを0.1%トリフルオロ酢酸を含む15%アセトニトリルで平衡化した逆相HPLC(μBondapak C18)にかけ，15%~60%(120分)のアセトニトリル直線上昇勾配で溶出した．5H4に対する抗原活性の検出は，各フラクションをコーティングバッファーで100倍希釈して直接ELISA法にて行った．N-末端側アミノ酸配列の分析は気相式シーケンサーにより行った．

**結果：** Fig.1-aに示すように，Endoproteinase LysC 処理により断片化したZP4は，逆相HPLCにより4つのピークに分画され，5H4との反応はPⅢに一致して検出された．PⅢをリクロマトグラムした後(Fig.1-b)，N-末端側アミノ酸配列を分析するとArg-Val-Arg-Gly-His-His-Gln-Met-Thr-Ile-Arg-Leu-Ile-Asp-Asp-Asn-Ala-Ala-Leu-Arg-Gln-Glu-Ala-Leu-Met-Tyr-His-Ile-Ser-の配列が得られた．SDS-PAGEによりPⅢの分子量を求めると7Kであった(Fig.1-c)．一方，トリプシン処理により断片化した

ZP4を、逆相HPLCにかけて得られたPⅢ (Fig.2-a) のアミノ酸配列を調べた結果、Leu-Ile-Asp-Asp-Asn-Ala-Ala-Leu-Arg-Gln-の配列が得られ、この配列はEndoproteinase Lys処理ZP4から得られた7Kの12番目から21番目の配列と完全に一致した。このペプチドは5H4に反応せず、分子量は5Kであった (Fig.2-b)。

考察：今回、N-末端側アミノ酸配列が判明した2つのペプチドフラグメント (7K, 5K) の比較から、5H4のエピトープ配列は7KフラグメントのN-末端側 (Arg-Val-Arg-Gly-His-His-Gln-Met-Thr-Ile-Arg-) に存在することが推定された。このアミノ酸配列のペプチドを化学合成することにより、避妊ワクチンに応用することが可能である。また、合成DNAプローブを作成し、c-DNAをスクリーニングすることにより、透明帯蛋白質の遺伝子レベルでの解析が可能になった。

#### 文献：

- 1) Sacco, A.G. (1987) Zona pellucida: Current status as a candidate to antigen for contraceptive vaccine development. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.* 15, 122-130.
- 2) Henderson, C.J., Hulme, M.J and Aitken, R.J. (1988) Contraceptive potential of antibodies to the zona pellucida. *J. Reprod. Fertil.* 83, 325-343.
- 3) Hasegawa, A. Koyama, K. and Isojima, S. (1991) Isolation of four major glycoprotein families (ZP1, ZP2, ZP3, ZP4) of porcine zona pellucida and characterization of antisera raised to each glycoprotein family. *Acta Obst. Gynaec. Jpn.* 43. (2) 221-226.
- 4) Hasegawa, A. Koyama, K. and Isojima, S. (1989) Production of monoclonal antibodies to the zona pellucida antigen (23K) common to human and thier inhibitory effect on in vitro fertilization in humans. *J. Mamm. Ova Res.* 6, 53-54.

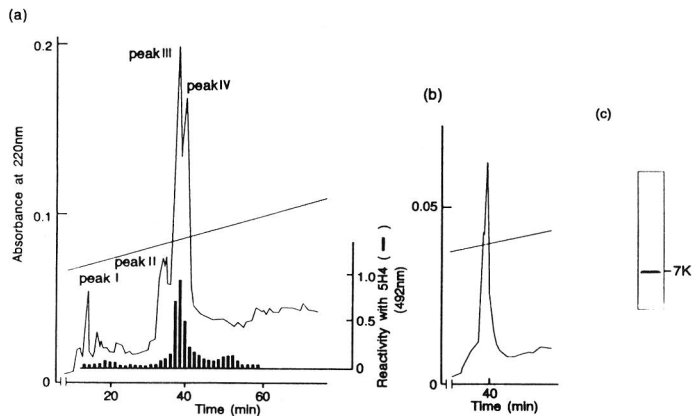


Fig.1 Reverse phase HPLC pattern of ZP4 digested with endoproteinase Lys C

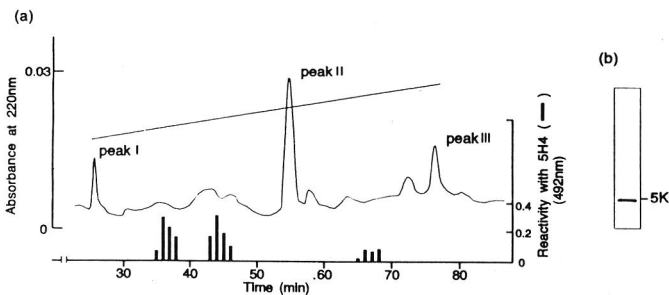


Fig.2 Reverse phase HPLC pattern of ZP4 digested with trypsin

# 牛体外受精胚細胞の幹細胞化に関する研究

## Isolation of the colony derived from bovine embryo in vitro fertilization

正木 全、柳 在雄、菅原七郎、正木淳二

Tamotsu MASAKI, Zae young RYOO, Shichiro SUGAWARA, Junji MASAKI

東北大学農学部畜産学科家畜繁殖学教室

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

＜目的＞ES細胞は多分化能を持った培養細胞株であり、遺伝子導入等の操作が比較的容易である。このためジーンターゲット法により特定の遺伝子に相同的組換えを起こさせた後、胚盤胞へ顕微注入すれば、キメラ個体を作製することができる。また、生殖細胞系列でキメラができれば、その子孫から特定の遺伝子を改変された個体の生産が可能となる。この技術が家畜に応用されれば、改良増殖の有効な手段となり、高い経済的効果が期待される。しかし、マウス以外の動物におけるES細胞の樹立に関する研究例は少なく、現在までにハムスターと豚で報告されているに過ぎない。本研究では、牛ES細胞の樹立を目的として、2細胞期から胚盤胞期の牛体外受精卵子とマウス胎児線維芽細胞との接着条件について検討した。また、胚盤胞を培養して得たICM(inner cell mass:内部細胞塊)に由来するコロニーを分離した。

＜方法＞feeder layerとして用いるマウス胎児線維芽細胞は、妊娠15日齢のICR系マウスの胎児から分離培養した。また、牛体外受精には、仙台市食肉屠場より得た黒毛和種の卵巣から採集した卵胞卵子を用いた。媒精はカフェイン-ヘパリン法により行った。

実験には継代3回までのマウス胎児線維芽細胞と、2細胞期から胚盤胞期までの牛体外受精胚を用いた。マウス胎児線維芽細胞は、マイトマイシンCで処理後feeder layerの作製に用いた。各発生ステージの胚は、透明帯を除去後、feeder layer上で培養し、接着、増殖、コロニー化について、基礎培地(DMEM, TCM199)及び培養温度(37.5℃, 39.0℃)の影響を検討した。また、2-16細胞期の胚は、EDTAで割球を分散させた後、個々の割球で培養温度の影響について同様の検討を行った。次に、胚盤胞の培養によって得られたICMをトリプシンで解離後、再びfeeder layer上で培養し、コロニー化について検討した。

＜結果＞2-16細胞期の胚を培養したとき、割球は分散した。このとき2、4細胞期の割球数の増加がみられたが、8、16細胞期では増加しなかった。割球を分散させた後、割球毎に培養したときには、2、4、8細胞期の割球で2-3回の分裂増殖が観察されたが、16細胞期では分裂しなかった。これらの実験区で、いくつかの割球はfeeder layerと接着したが、いずれの場合も胚細胞の増殖及びコロニー化は起こらなかった。桑実胚を培養したときには、このステージの胚が直接コロニー化することはなかったが、一部の胚は、胚盤

胞への発生を経て、栄養外胚葉とfeeder layerとの接着伸展及びICMの露出が観察された。胚盤胞を培養したときには、全ての実験区で、栄養外胚葉とfeeder layerとの接着伸展及びICMの露出が観察された。接着は培養24-96時間に起こり、栄養外胚葉の伸展及びICMの露出は72-120時間の間に観察された。また、実験区により接着、伸展を開始するまでの時間差がみられ、DMEM-37.5℃区と199-37.5℃区では早く起こった(Table)。露出したICMを解離して再培養した結果、ICMに由来するコロニーを得た。

Table. Effect of medium and temperature on the attachment and outgrowth of bovin blastocysts in feeder layer of mouse embryonic fibroblasts

medium	temp. (°C)	number of blastocysts	culture time(hr)											
			24		48		72		96		120		144	
			A	G	A	G	A	G	A	G	A	G	A	G
DMEM	37.5	10			2		1	2	3	2	1	4		4
DMEM	39.0	10					2		1	1		2		2
DMEM <sup>*</sup>	39.0	11									2			2
TCM199	37.5	10			1			2	1	2		3		3
TCM199	39.0	9					1		1	1		2		2
TCM199 <sup>†</sup>	39.0	12								1		1		1

A: Number of blastocysts that trophoblasts attached to feeder layer.

G: Number of blastocysts that trophoblasts attached and grown to feeder layer.

\*: Supplemented with 5% FCS only.

<考察> 胚盤胞の接着及びICMの露出にいたる過程には、マウス胎児線維芽細胞の培養、あるいは牛受精卵子の体外発生に通常用いている培地でも可能であることを示しているが、ES細胞樹立用の添加物と20%のFCSを加える方が、より適しているといえる。また、胚盤胞の接着伸展の過程は、培養液よりもむしろ培養温度に影響を受けることが示唆された。また、DMEMと199培地間の比較から、これらの間に明確な差は認められなかったが、最終的に接着伸展した胚はDMEMを用いた方が多く、培地としてDMEMがより至適なことが明らかになった。

胚盤胞のICMを解離し、新しいfeeder layer上で培養したところ、ICMからコロニーを得ることに成功した。マウスのES細胞は、細胞質に対し大きな核を持つ比較的小形の細胞で、コロニーは細胞の境界が不鮮明でやや盛り上がる特徴を持っている。しかし、今回得られたコロニーはこのような特徴は持っていなかった。また、得られたコロニーは1つであり、コロニー分離の条件についてはさらに検討を要する。

# 添加した牛初乳乳清と血清の種類が牛体外受精 における胚盤胞への発生率に及ぼす影響

Effects of the colostrum milk serum and serum in the culture medium  
on development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro

山田 均・吉羽宣明・室賀友子・福島毅

Hitoshi YAMADA, Nobuaki YOSHIBA, Yuko MUROGA, Takeshi FUKUSHIMA,

埼玉県畜産試験場

Saitama Prefectural Livestock Experiment Station

目的：牛体外受精の未成熟卵子の成熟培養・発生培養には、一般に牛血清を添加した用いられているが、その添加する血清の種類やその添加濃度により、胚盤胞への発生率に差があることが、知られている<sup>1)</sup>。牛受精卵の体外培養には、砂川ら<sup>2)</sup>により牛初乳乳清、鈴木<sup>3)</sup>らにより供卵牛採卵日血清の有効性が報告されている。そこで、本試験では、牛初乳乳清（以下CMS）と、供卵牛採卵日血清（以下DS）を牛体外受精の成熟・発生培養に用い、胚盤胞への発生に及ぼす影響について検討した。

方法：2頭の牛初乳乳清の採取は砂川ら方法に従い、3頭の供卵牛採卵日血清の採取は、鈴木らの方法に従った。採取した2頭のCMS、3頭のDS、及び子牛血清（以下CS）は、それぞれ56℃30分間非働化处理した。体外受精の成熟・発生培地への添加濃度は、5%試験区、10%試験区とした。

未成熟卵子は、卵巢の5mm以下の小卵胞から注射器で吸引し、卵丘細胞の付着の緊密なA、Bランクを供試した。未成熟卵子の成熟培地は、25mM Hepes緩衝TCM199 (FSH 0.02Au/ml E<sub>2</sub> 1μg/ml)を用い、20~22時間成熟培養した。牛初乳乳清試験群の成熟・発生培地は、Glucoseとacetateを除いた25mM Hepes緩衝TCM199 (G1BC0, 88-0066AG)を用いた。

精液処理は、1頭の黒毛和種の凍結射出精子を融解後、10mMカフェイン加B0液で2回洗浄後、最終精子濃度を $9.375 \times 10^6$ /mlに調整した。その後、10μl/mlヘパリン加BSA-B0液で等量に希釈し、15分間培養後に卵子を導入した。媒精後6時間目に発生培地に移し替え、96時間目に、ピペツティング操作により卵丘細胞を除去し、分割状況検査を行なった。その後48時間ごとに培養液を交換し、7~10日目まで胚盤胞への発生を経時的に観察した。

結果：CMS群、DS群、CS群の分割率、胚盤胞への発生率は、表-1に示すとおりである。受精率は、92.9~100%で血清添加群では差は認められなかったが、10%乳清添加区で72.7~65.0%と低い

傾向であつた。CMS群5%添加区の分割率は、49.8% (211/424) でDS群、CS群と同様な成績が得られ、胚盤胞への発生率は9.9% (42/424) だつた。CMS群10%添加区の分割率は、38.2% (136/356) で胚盤胞への発生率は0.5% (2/356) と低い成績であつた。DS群では、5%添加区に比べ、10%添加区において分割率・胚盤胞への発生率が高かつた。(65.9%vs72.8%, 14.8%vs26.9%) そのうち2頭で、10%添加区で胚盤胞への発生率に有意差 ( $P<0.05$ ) が認められた。CS群では、10%添加区に比べ、5%添加区において8細胞・胚盤胞への発生率が高かつた。(48.7%vs53.6%, 16.6%vs23.9%) そのうち10頭で、5%添加区で胚盤胞への発生率に有意差 ( $P<0.05$ ) が認められた。またDS群・CS群ともに5%・10%添加区において、胚盤胞への発生率に個体・ロット間に有意差 ( $P<0.05$ ) が認められた。

考察：5%牛初乳血清添加群は、血清添加群と同様な分割率が得られ、供卵数の9.9%が胚盤胞に発生したことは、牛初乳血清も未成熟卵子の成熟・発生培養に利用できるものと考えられる。10% 供卵牛採卵日血清を添加群は、5%子牛血清添加群に比べても、その分割率、胚盤胞への発生率も高く、添加血清として有効性が認められた。

**Table 1:** Effect of serum concentrations upon in vitro development of bovine follicular oocytes fertilized in vitro.

Group	serum (%)	No. of oocytes	% and (No.) of 2 cell $\leq$	% and (No.) of 8 cell $\leq$	% and (No.) of developed to Blast
CMS	5	424	65.3 (277)	49.8 (211)	9.9 (42)
	10	356	38.2 (136)	26.1 (93)	0.5 (2)
DS	5	884	65.9 (583)	52.3 (462)	14.8 (131)
	10	791	72.8 (576)	61.8 (489)	26.9 (213)
CS	5	755	60.8 (459)	48.7 (368)	23.9 (181)
	10	1242	65.0 (807)	53.6 (666)	16.6 (206)

CMS: The medium was TCM199 (25mM HEPES Earle-salt) without glucose and acetate

文献:

- 1), 梶原豊・後藤和文・小坂昭三・中西喜彦・小川清彦: 牛卵胞卵子の体外受精および体外培養によるふ化. Jpn J Anim Reprod 33, 173~180, (1987)
- 2), 砂川政広・木暮誠一・笠原民夫・田中尚道: 牛初乳血清を添加した保存液による牛胚の培養及び移植成績. 東日本受精卵移植技術研究会報, 4号: 44~46, (1989)
- 3), 鈴木達行・高橋芳幸・下平乙夫・桶谷良至・斎藤則夫: ウシ受精卵の非手術的移植と過剰排卵処理牛の7~8日目に採取した血清を含む培地内での培養試験. 家畜繁殖誌, 28巻3号: 119~123, (1982)

## 単為発生胚をホストとしたES細胞集合キメラ胚の発生能

Developmental potential of chimaeric embryos produced by aggregation  
between parthenogenetic 8-cell stage embryo and ES cells

徳永智之・岡崎正幸・古沢 軌・林 司・角田幸雄\*

Tokunaga T., M. Okazaki, T. Furusawa, T. Hayashi and Y. Tsunoda\*

日本全薬工業 中央研究所・\* 近畿大学 農学部

Central Research Labs, Nippon Zenyaku Co., Ltd.

\* Faculty of Agriculture, Kinki University

角田ら<sup>1)</sup>は8細胞期受精胚の割球1個を本来個体に発生できない単為発生胚と集合させ、受精胚由来の遺伝形質のみを示す1卵性多胎子を得ている。本研究ではこの手法がより効率的なES細胞キメラ作製法として応用可能か否か検討する目的で、単為発生胚をホストとしたES細胞キメラの作製を試み、その発生能力を検討した。

### 材料および方法

ES細胞とICM：実験に供したES細胞F1/1は、既報<sup>2)</sup>に従ってF<sub>1</sub> (C57BLXCBA)系マウス胚盤胞から樹立した細胞であり、XY型の正常核型を有している。また、in vitroで多能性を示し、高度なキメラ形成能を有しており、生殖系列キメラを形成することが明らかにされている。また、対照としてF<sub>1</sub> (C57BLXCBA)系マウス胚盤胞から免疫手術法により単離した内部細胞塊 (ICM)を用いた。

単為発生8細胞期胚：ICR系成熟雌マウスにPMSGおよびhCGを5IUずつ48時間間隔で腹腔内投与し過剰排卵処理を行った。hCG注射後17-18時間目に卵管を摘出し、M2液中で卵管膨大部を切開して未受精卵を回収した。卵丘細胞を付いたままの未受精卵を7%エタノールを含むM16液に移し、室温で7分間培養して単為発生刺激を与えた。ついで、卵子塊をM16液で3回洗浄後、サイトカラシンBを5  $\mu$ g/ml添加したM16液中に移し、37°Cで5時間培養を行った。培養終了後、M16液で3回洗浄して新鮮なM16液に移して、37°C、5% CO<sub>2</sub>、95%空気の培養器内で培養した。3日間の培養によって8細胞期に发育した胚を選別してホストとして用いた。

集合キメラ作製：既報<sup>3)</sup>に従い、あらかじめマニピュレーターを用いて単為発生由来8細胞期胚(P)の透明帯を一部カットし、このスリットから10~15個のES細胞あるいは1個のICMを卵卵腔に注入した。作製した集合胚を培養に供して胚盤胞への発生率を調べ、さらに、得られた胚盤胞を胚移植して産子生産率を調べた。また、対照として受精卵由来8細胞期胚(F)を用いて同様の検討を行った。

### 結 果

培養の結果を表1に示した。PとES細胞の集合キメラ胚の胚盤胞への発生率は、FとES細胞、PとICMおよびFとICMの集合キメラ胚さらにPの胚盤胞への発生率のいずれと比較しても有意に低かった。PとICMおよびFとICMの集合キメラ胚の発生率は変わらず、PとICMの集合キメラ胚はPの胚盤胞への発生率と比べ有意に高い値を示した。一方、それぞれのキメラ胚由来の胚盤胞の移植試験の結果を表2に示した。Fをホストとした場

合にはES細胞とICMのいずれの集合胚からも産子を得られ、キメラ個体も高率に得られた。これに対してPをホストとした場合、ES細胞集合胚では産子を得ることができなかった。また、ICM集合胚ではわずか1頭ではあるがキメラ産子を得られた。

### 考 察

PをホストとしたES細胞キメラ胚を作製し、その発生能力を培養および移植試験によって調べた。培養試験の結果、PはICMと集合することによって発生率が向上するが、ES細胞ではその様な効果は認められず、発生率はむしろ低下した。移植試験の結果、PとES細胞の集合キメラ胚からは全く産子を得ることができなかった。この原因は、単為発生胚では雄ゲノムの不在によってplacentaやyolk sacなどの胚胎外膜組織の発育が不全であるため<sup>4)</sup>と推定される。また、受精胚 表 1

細胞と単為発生胚の集合キメラでは受精胚細胞の一部が胚胎外膜組織に寄与し、胚の発育を支持すると考えられるが、ES細胞はそれらの組織に機能的に寄与せず、ES細胞キメラ胚の発生はホスト胚由来の胚胎外組織に依存していると推察される。最近、受精卵を倍化して得た4倍体胚をホストとした場合、ES細胞キメラが得られることが報告<sup>5)</sup>されている。

一方、ICMと単為発生胚のキメラの産子生産率は極めて低いが、これは、ホスト胚に比べ細胞が量的に少ないためと考えられ、ES細胞の場合にもこの点の検討を要する。また、キメラ胚におけるES細胞の分布を組織学的に検討したい。

### 引用文献

- 1) 徳永智之・角田幸雄. (1989) 家畜繁殖誌 35:173-178.
- 2) Tokunaga and Tsunoda (1991) 投稿中.
- 3) Tsunoda et al (1987) Theriogenology 28, 615-623.
- 4) Surani et al (1984) Nature 308, 548-550.
- 5) Nagy et al (1990) Development 110, 815-821.

In vitro development of chimaera embryos between ES cell or ICM and parthenogenetic 8-cell stage embryo

Donor cell	Host embryo	No. of embryos developed to blastocysts/ No. of embryos aggregated (%)
F1/1	P	29/67 (43) <sup>a)</sup>
	F	41/44 (93) <sup>b)</sup>
ICM	P	42/48 (88) <sup>c)</sup>
	F	25/28 (89) <sup>d)</sup>
	P	58/85 (68) <sup>e)</sup>

P: Parthenogenetic 8-cell stage embryos  
F: Fertilized 8-cell stage embryos  
a) vs b), c), d); P<0.001. a) vs e); P<0.005.  
c) vs e); P<0.01.

表 2

Postimplantation development of chimaera embryos between ES cell or ICM and parthenogenetic 8-cell stage embryo

Types of chimaera	No. of youngs/ No. of embryos transferred (%)	No. of chimaeras (%)
P ⇔ F1/1	0/127 (0)	-
F ⇔ F1/1	27/59 (46)	22 (81)
P ⇔ ICM	1/52 (2)	1 (100)
F ⇔ ICM	16/44 (36)	10 (63)
P	0/20 (0)	-
F	21/39 (54)	-

P: Parthenogenetic 8-cell stage embryos  
F: Fertilized 8-cell stage embryos  
ICM: Inner cell mass

# Y染色体特異的配列の検出によるマウス初期胚の性判別

Sexing of mouse early embryos by detection of Y-specific DNA sequences.

洗美薇<sup>1</sup>、国枝哲夫<sup>1,2</sup>、小林栄治<sup>2</sup>、東貞宏<sup>1</sup>、豊田裕<sup>1</sup>

Meiwei XIAN<sup>1</sup>, Tetsuo KUNIEDA<sup>1,2</sup>, Eiji KOBAYASHI<sup>2</sup>, Sadahiro AZUMA<sup>1</sup>, Yutaka TOYODA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東京大学医科学研究所獣医学研究部

<sup>1</sup>Department of Animal Pathology, Institute of Medical Science, University of Tokyo.

<sup>2</sup>(財)動物繁殖研究所

<sup>2</sup>Imamichi Institute for Animal Reproduction.

目的： 哺乳類のY染色体上には性決定や精子形成などに関与すると考えられるいくつかの機能的な遺伝子が存在することが知られている。ヒトではY染色体部分欠失個体の解析からY染色体短腕の特定の領域に精巢決定因子(TDF)の有力な候補と考えられているSRY遺伝子が存在することが明らかとされている。また、この領域には精子形成等に関与すると考えられるZFY遺伝子も存在することが知られている。これらの遺伝子は哺乳類の種間で強く保存されており、マウスにおいてもSRYおよびZFY遺伝子と相同性のあるSry遺伝子<sup>(1)</sup>、および2つのZfy遺伝子(Zfy-1、Zfy-2)<sup>(2)</sup>が単離されている。本研究ではこれらのY染色体上の機能的遺伝子を配列特異的なDNAの増幅法であるPolymerase Chain Reaction(PCR)法<sup>(3)</sup>を用いて検出することにより、マウス初期胚の性判別を試みた。

方法： C57BL/6Nの卵子とB10BR・Y<sup>del</sup>の精子を用いた体外受精により得られた受精卵をWhitten培地にて培養し、2細胞から胚盤胞の各期の初期胚を用いた。一部の胚では2細胞期で片方の割球を分離し、Tarkowski法に従って染色体標本を作製し、核型分析を行った。各胚は熱処理の後にPCR法に供した。

マウスのSry遺伝子、Zfy遺伝子の塩基配列に基づき、19merから25merのオリゴヌクレオチドからなるプライマーを同一の領域をはさむ形で各々2組合成した。また、コントロールとしてX染色体上のDxnds3遺伝子座<sup>(4)</sup>の配列についても同様に2組のプライマーを合成した。各配列について外側のプライマーを用いて1回目の増幅を行い、さらにその産物を内側のプライマーを用いて2回目の増幅を行う2重PCR法を行った。各増幅は94℃60秒、60℃150秒、72℃150秒で30サイクル行った。PCR産物は3%アガロースゲルにて電気泳動の後、エチジウムブロマイド染色により検出した。

結果： Sry遺伝子およびZfy遺伝子に対する上記のプライマーを用いて、雄および雌マウスに由来するDNAについてPCR法を行ったところ、いずれも雄マウス由来のDNAのみで目的とする配列が検出されることが

確認された。さらに、2重PCR法により、10個以下の細胞に対応する量のDNAでも目的とする配列を検出し得ることが確認された。

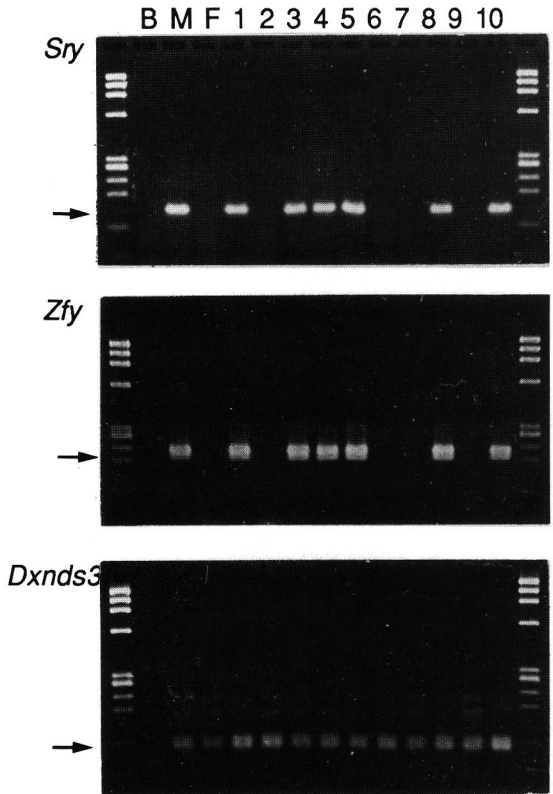
マウスの初期胚を用いて、上記のSry遺伝子およびZfy遺伝子に対する2重PCR法を行なったところ、Sry遺伝子において147bpの、Zfy遺伝子では199bpおよび217bpの目的とする配列が約半数の胚で検出され、残りの胚では検出されなかった。それに対しDxnds3遺伝子座の110bpの配列は全ての胚に検出された。Sry遺伝子の検出された胚とZfy遺伝子の検出された胚は完全に一致した。次に核型分析により性判別された胚を用いて上記のPCR法を行ったところ、Sry遺伝子とZfy遺伝子の検出はY染色体の存在と一致していることが確認された。以上の結果より、Sry遺伝子とZfy遺伝子を対象としたPCR法によりマウス初期胚の性判別が可能であることが結論づけられた。

考察：これまでにヒトおよびマウスではY染色体上の反復配列をPCR法を用いて検出することにより初期胚の性判別が可能であることが報告されている。しかし、これらの反復配列は一部常染色体上にも存在するため必ずしも厳密な性特異性が得られていない。

本研究ではY染色体上の単一の機能的遺伝子を対象とすることにより、より厳密な性特異性を得ることを可能とした。また、Sry遺伝子およびZfy遺伝子は哺乳類の種間で強く保存されているため、上記方法は他の動物への応用も容易であると考えられる。さらに本研究では、2重PCR法により初期胚においてもゲノム当り単一の配列の検出が可能であることが明かとなり、2重PCR法は初期胚における特定の配列の検出に有用な方法であることが示唆された。

文献：

- 1) Gubbay, J. et al. : A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346 : 245 (1990)
- 2) Mardon, G. and Page, D. C. : The sex-determining region of the mouse Y chromosome encodes a protein with a highly acidic domain and 13 zinc fingers. *Cell* 56 : 765 (1989)
- 3) Saiki, R. K. et al. : Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 : 487 (1988)
- 4) Love, J. M. et al. : Toward construction of a highly resolution map of the mouse genome using PCR-analysed microsatellites. *Nucleic Acids Research* 18 : 4123 (1990)



(Fig. 1) Detection of Sry, Zfy, and Dxnds3 sequences in mouse morulae by PCR method. Left arrows show the amplified fragments. Lanes: B, blank; M, male DNA; F, female DNA; 1, 3, 4, 5, 8, and 10, male morulae; 2, 6, 7, and 9, female morulae. Left and right lanes contain DNA size marker.

# ハムスターの卵管内精子移動に及ぼす排卵の影響

## Effect of ovulation on sperm transport in the hamster oviduct

伊藤 雅夫<sup>1)</sup>・T.T. Smith<sup>2)</sup>・柳町 隆造<sup>3)</sup>

Masao ITO, T. Timothy SMITH, Ryuuzou YANAGIMACHI

日本大学医学部衛生学教室 (Dept. of Hygiene School of Medi., Nihon Univ.)<sup>1)</sup>

Worcester Foundation for Experimental Biology<sup>2)</sup>

Dept. of Anatomy and Reproductive Biol. Univ. of Hawaii Medical School<sup>3)</sup>

〔目的〕 ハムスターにおいては発情の開始と排卵がおおよそ8時間ずれており、雌性生殖器官内に射精された多数の精子の殆どは排卵の時間が近づくまで卵管狭部に留まっている。そして、排卵が近づくに従ってごく一部の精子が卵管膨大部まで上昇して受精に関与する (Yanagimachi & Chang, 1963; Smith et. al, 1987)。卵管狭部が排卵前に射精された精子の貯蔵機能を果たしていることはマウス (Olds, 1970; Nicol & McLaren, 1974)、ウサギ (Harper, 1973; Overstreet & Cooper, 1978)、ウシ (Thibault et. al, 1975)、モルモット (Yanagimachi & Mahi, 1976)、ラット (Shalgi & Kraceir, 1978)、ヒツジ (Hunter et. al, 1980)、ブタ (Hunter, 1981) 等の種においても認められている。しかし、排卵と精子の移動がどのように同調されているか、そのメカニズムは明らかにされていない。本研究は精子の雌性生殖器官内の移動に及ぼす排卵の影響を明らかにする目的で①superovulation、②precocious ovulation、③ovulatory productsの卵管への侵入阻止、の3つの条件下における精子の移動について検討したものである。〔方法〕 供試動物：成熟シリアンハムスター（雌; 2-3、雄; 4-6月令）で、これらの雌は正しく4日の性周期を有し、Day4の18:00-19:00hに発情が開始し、Day1の00:30-02:00hに排卵する集団から選抜された。①精子移動に及ぼす過排卵の影響：Day1の10:00hにPMS 30IUを皮下注射し、Day4の20:00hから30分間交配した。交尾を確認した雌を交配後3、6、12時間で屠殺し卵管の組織を作成した。②精子の移動に及ぼすprecocious ovulationの影響：Day3の14:00hにhCG 25IUを皮下注射し、同日の20:00hから30分間交配した。一部のグループにおいては交配に加えて、同時に交配された別の雌より採取した射精精子を用いて子宮内に人工授精を施した(20:30h)。これらの雌を交配後3、6時間で屠殺し、卵管の組織を作成した。③精子の移動に及ぼすovulatory productsの影響：Day4の20:00hから30分間交配した雌について、ovulatory productsの卵管への侵入を阻止する為に a) 卵管膨大部上端の結紮、あるいは b) Technovit の卵卵腔内への注入を行った(23:00、一部 03:00h)。これらの動物を交配後12時間で屠殺し、卵管の組織を作成した。精子数の算定：卵管の連続切片を(10 $\mu$ )作成し、卵管内精子数を顕微鏡下でIntramural Isthmus (In. I.), Caudal I. (Ca

.I.), Cephalic I. (Ce.I.), Ampulla (Amp.) の4部位に分けて算定した。固定はA.F.A. 固定液、染色はSchiff's reagentとFast Green F.C.F. で行った。〔結果〕表1に過排卵誘起動物における卵管内精子数を示した。過排卵誘起した場合の卵管内の総精子数は何れの時間帯においても自然排卵時に比べて大であり、交配後6時間における Ca. I., Amp. 交配後12時間における Ce. I., Amp. で統計学的に有意な差が認められた。特に、Ce. I.

およびAmp. に到達する精子数が異常に多いことが特徴的に示された。表2に hCGによってDay3に排卵を誘起した動物における卵管内精子数を示した。hCGによって早期に排卵を誘起した場合、卵管に侵入する精子数は自然排卵の場合に比べて有意に少なくなる。これは、精子の上昇が子宮頸で阻止されていることに起因しており、hCGによって排卵を誘起した場合でも子宮内に人工授精を施せば卵管内の精子の動態は自然排卵の場合と変わらない結果であった。

卵管膨大部上端の結紮によって ovulatory productsの卵管内への侵入を阻止した時、あるいは Technovitの卵卵腔内注入によって排卵を物理的に阻止した時の卵管内精子数を表3に示す。

排卵の直前における卵管結紮によってCa. I. より上部に到達する精子数は有意に減少した。同様に排卵直前の Technovitによる排卵の阻止は精子の卵管内上昇を阻害する。しかし、排卵後の Technovitの注入は卵管内の精子移動に何ら影響を与えず、ovulatory productsが精子上昇を誘引している事が示唆された。

Table 1. Mean number, (range) and distribution of spermatozoa in the oviduct and bursal cavity after induction of superovulation with PMSG. Superovulation began at 00:30 - 02:00 h Day 1. ( $n=4-6$  oviducts)

Type of treatment	Hours after mating	Segments of the Oviduct				Total
		Intramural isthmus	Caudal isthmus	Cephalic isthmus	Ampulla and bursa	
PMSG 10:00 h Day 1 & Mate 20:00 h Day 4	3	12459 (91-28534)	6548 (245-8467)	1.7 (1-7)	0	19009 (337-35064)
Control Mate 20:00 h Day 4	3	7360 (2322-11754)	3346 (1839-4605)	0	0	10706 (6255-16256)
PMSG 10:00 h Day 1 & Mate 20:00 h Day 4	6	15704 (7336-25210)	19640 <sup>*</sup> (7517-27477)	2.2 (0-4)	7.2 (1-28)	35352 (16597-49531)
Control Mate 20:00 h Day 4	6	8745 (3896-12237)	10323 (6762-15343)	1.6 (0-3)	0.8 (0-2)	19070 (15157-22635)
PMSG 10:00 h Day 1 & Mate 20:00 h Day 4	12	4095 (3660-6178)	5427 (3968-11966)	141 <sup>*</sup> (42-236)	1820 <sup>*</sup> (183-4244)	11484 (6422-15954)
Control Mate 20:00 h Day 4	12	2034 (181-5239)	4807 (629-7484)	7.8 (2-18)	9.5 (8-14)	6860 (818-9804)

<sup>\*</sup> Significantly different from control ( $P \leq 0.05$ )

Table 2. Mean number, (range) and distribution of spermatozoa in the oviduct following mating or mating plus artificial insemination (A.I.) after induction of precocious ovulation with hCG. Precocious ovulation began 14:00 h Day 4. ( $n=4-6$  oviducts)

Type of treatment	Hours after mating	Segments of the Oviduct				Total
		Intramural isthmus	Caudal isthmus	Cephalic isthmus	Ampulla	
hCG 14:00 h Day 3 & Mate 20:00 h Day 3	3	0.3 (0-1)	0.3 (0-1)	0	0	0.7 <sup>*</sup> (1-2)
Control Mate 20:00 h Day 4	3	7360 (2322-11754)	3346 (1839-4605)	0	0.3 (0-1)	10706 (6255-16256)
hCG 14:00 h Day 3 & Mate 20:00 h Day 3	6	205 (0-691)	1003 (0-4021)	0.7 (0-1)	0	1208 <sup>*</sup> (0-4722)
Control Mate 20:00 h Day 4	6	8745 (3896-12237)	10323 (6762-15343)	1.6 (0-3)	0.8 (0-2)	19070 (15905-22635)
hCG 14:00 h Day 3 & Mate 20:00 h Day 3 & A.I. 20:30 h Day 3	6	6884 (455-17122)	10174 (3902-14522)	3.5 (1-8)	4.3 (0-13)	17065 <sup>*</sup> (9497-22751)
Control hCG 14:00 h Day 3 & Mate 20:00 h Day 3	6	0 (0-1)	0.5 (0-1)	0.5 (0-2)	0	1.0

<sup>\*</sup> Significantly different from control ( $P \leq 0.05$ )

Table 3. Mean number, (range) and distribution of spermatozoa in the oviduct after ampullary ligation or Technovit injection into the bursal cavity. Ovulation began 00:30 - 02:00 h Day 1. ( $n=3-4$  oviducts)

Type of Treatment	Hours after mating	Segments of the Oviduct				Total
		Intramural isthmus	Caudal isthmus	Cephalic isthmus	Ampulla	
Mate 20:00 h Day 4 & Ligation 23:00 h Day 4	12	2539 (564-4719)	43 <sup>*</sup> (12-75)	0	0 <sup>*</sup>	2582 (639-4731)
Control Mate 20:00 h Day 4	12	2913 (2197-4765)	2026 (1064-2828)	34 (15-58)	200 (63-354)	6158 (3643-9686)
Mate 20:00 h Day 4 & Technovit 23:00 h Day 4	12	2388 (1993-2954)	2913 <sup>*</sup> (1248-5097)	11 (3-26)	8.7 <sup>*</sup> (2-16)	5324 (4399-7357)
Control Mate 20:00 h Day 4	12	6040 (4544-7369)	8601 (5850-11243)	18 (9-33)	25 (16-38)	14686 (12009-16147)
Mate 20:00 h Day 4 & Technovit 03:00 h Day 1	12	3129 (1138-5280)	4029 (2308-6914)	19 (4-48)	59 (21-163)	6988 (4510-12232)
Control Mate 20:00 h Day 4	12	2509 (461-6988)	4714 (1311-10692)	36 (12-59)	84 (28-185)	7342 (2006-17767)

<sup>\*</sup> Significantly different from control ( $P \leq 0.05$ )

# ヒト体外受精卵の後期胞胚への 発達過程について

Development of the human in-vitro  
fertilized eggs to late blastocyst.

雀部 豊、安部裕司、臼井 彰、  
片山 進、久保春海

Yutaka SASABE, Yuji ABE, Akira USUI,  
Susumu KATAYAMA, Harumi KUBO

東邦大学医学部第一産科婦人科学教室

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

目的：ヒト体外受精-胚移植(IVF-ET)の技術的進歩は目覚ましいものがあるが、ヒトIVF受精卵の発育過程を経時的に観察した報告はない。今回、われわれはIVF後、受精から着床後期胚(培養14日以内)にいたるヒト胚の発育を経時的に観察した。また、培養液(HTF, HamF10)による胚発育の差を検討した。さらに、この胚発育能とIVF-ET後の妊娠率との相関を検討した。

方法：当科のIVF-ET, GIFTプログラムに登録された患者のうち、採卵数が多く、移植受精卵数に余剰がでた場合、インフォームド・コンセントによって、その取扱いが担当医に一任されている29症例に限り上記目的のために日産婦学会倫理委員会の申し合わせ規定範囲内の14日間以内において長期培養を試みた。卵胞刺激法は前周期黄体期中期よりGnRHa(Buserelin)  $900 \mu\text{g/day}$  を用いる long term protocol を実施し、14-16日後に hMG(300IU/day)を開始した。hMG開始後5日目より血清 $E_2$ 測定、USG による卵胞計測を行い、 $E_2 \geq 200\text{pg/ml}$ /卵胞、卵胞数3個以上で最大卵胞径18mm以上、次席卵胞16mm以上となった時にGnRHaを中止し、最終hMG注より36時間後にhCG 10,000 IU注した。hCG注34時間後に超音波下経腔採卵法を実施した。前培養(4-5時間)後、遠沈重層法による洗浄活力精子  $1 \times 10^5/\text{ml}$ 濃度で媒精した。培養液(HTF, Ham's F10)は媒精時8%非働化HCSを添加し、18-20時間後、20%HCS添加培地に移し、20時間培養を行った。培養終了後、平等割球を有する 2cell-4cell胚、4-5個の受精卵をETに供し、更に余剰受精卵が出た場合にのみ、これらに対して培養を継続した。培養に用いた培養液は①Ham's F10(Flow Lab.)および②HTF(Irvine Scientific)であり、使用時に280mOsm/kg、pH 7.3に調整し24時間CO<sub>2</sub>インキュベーター内で平衡化したものを用いた。培養後は観察終了まで同一条件下で行い、

培地交換は一切行わなかった。

結果:余剰受精卵は症例29例で計82個、1症例あたり平均2.8個(1~12個)であった。これらの余剰胚が到達した各分割期の割合は表1のごとく、PN期 85.4%(70/82)、2細胞期 76.8(63/82)、4細胞期 74.4%(61/82)、8細胞期 47.6%(39/82)、桑実期 31.7%(26/82)、胞胚期 21.9%(18/82)であった。各期に到る時間的経過は媒精後PN期  $15.0 \pm 2.6$ (12-18)時間、2細胞期  $36.8 \pm 8.9$ (26-48)時間、4細胞期  $48.7 \pm 12.1$ (34-68)時間、8細胞期  $59.7 \pm 12.2$ (48-72)時間、桑実期  $92.3 \pm 21.8$ (85-120)時間、胞胚期  $148.6 \pm 26.5$ (140-160)時間であった。拡張期胞胚を形成後ハッチング終了までの時間は平均 7.5時間、ハッチング後接着までの時間は平均 24.2時間、トロホブラストの伸展は接着より平均 39.5時間であった。形態的観察ではハッチングは栄養芽細胞層の herniation によって開始し、約4時間前後で1/2が、6時間で2/3が、7.5時間で全体が hatching を完了した。ハッチングした胚の平均直径は $190 \mu\text{m}$ であった。ハッチング後接着した胚の周辺部よりトロホブラストの突起が伸展しはじめ、偽足状構造を示した。胚細胞塊中には立方上皮様構造や分離した多核細胞、空胞形成なども認められた。

これらの発生能が HTF および Ham's F10 の培養液によって差があるかどうか検討した。2~4細胞期までの発生ではHTF 79.4%(27/34)、Ham's F10 75.0%(36/48)と差は認められないが、胞胚発生能は HTF 14.7%(5/34)、Ham's F10 27.1%(13/48) と有意差( $p < 0.01$ )を認めた。また、HTF でのハッチング率は0%(0/5)であり、Ham's F10 では 30.8%(4/13)であった。つぎに、移植胚による妊娠、非妊娠群と余剰胚の発生能との関係について検討した。妊娠群( $n=9$ 例)における余剰胚の8細胞期への平均発生数は 2.0(18/9)、非妊娠群( $n=20$ 例)では1.1(21/20)であった。また、胞胚形成率は妊娠群 0.8(7/9)、非妊娠群 0.6(11/20)であった。

まとめ: IVF-ET 時における余剰胚を用いて経時的に2前核期より着床後期胚にいたる形態的観察を行った。2前核期より4細胞期には大多数の胚が到達することが出来たが、4から8細胞期へは 47.6% しか分裂せず、ヒト受精卵の 4-cell block の可能性が示唆された。媒精後、2前核期胚が観察される時間は平均15時間前後であり、その後の分割間隔は各期で重なる部分が認められる。しかし、発生速度の遅い胚では途中で発育を停止してしまうものが多く認められた。また、後期胞胚形成後ハッチングをした胚は4個(22.2%)のみであった。このうち HTF 培養液を用いた場合、4細胞期までの発生はHam's F10 と差はなかったが、胞胚形成、ハッチング率は Ham's F10 の方が良好であった。妊娠群、非妊娠群における余剰卵の発生能の差が予后を反映しているかどうかを検討したが、やや妊娠群における発生能が良好であったが、有意差は認められなかった。

#### 文献:

- 1) Lopata, A., 1989; Fertil. Steril, 51: 984-991
- 2) Bolton, V. N., Hawes, S. M., Taylor, C. T. and Parsons, J. H., 1989; J. IVF-ET, 6: 30-35
- 3) Trounson, A. O., Mohr, L. R., Wood, C. and Leeton, J. F., 1982; J. Reprod. Fert., 64: 285-294

# 卵 子 内 精 子 注 入 の 試 み

## Micromanipulation of Human Spermatozoa into Human Oocytes

淡路英雄・松井素子・小林善宗・本田育子

宗 完子・井上正人・藤井明和

Hideo AWAJI, Motoko MATSUI, Yoshimune KOBAYASHI,

Ikuko HONDA, Hiroko SOU, 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。最近、男性不妊に対する新たな治療法として顕微操作 micromanipulation が登場してきた。透明帯開孔術、囲卵腔内精子注入については、すでに妊娠、分娩例が報告されている。しかし、精子受精能力障害を伴う男性不妊では、これらの方法は無効であり、精子を直接卵子細胞質内に注入するしか治療法はない。今回、われわれは IVF で受精しなかったヒト卵子を用いて卵子内精子注入 micromanipulation 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、GnRH $\alpha$ -HMG-HCG にて行った。月経第 1 日より GnRH $\alpha$  (スプレキュア<sup>®</sup>) 600~900  $\mu$ g/日を投与し、3 日目より HMG150~300IU を連日注射した。2 個以上の卵胞が 18mm 程度、血中 estradiol 300pg/ml/卵胞 ( $\geq 15$  mm) 以上になった時点で HMG を中止し、約 32 時間後に HCG10,000IU 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 ( $5\sim 10\times 10^4$ /ml) を加えてさらに培養した (37 $^{\circ}$  C, 5% CO $_2$ , 95% air)。精子の受精能力はあらかじめ、Ca ionophore A $_{23187}$  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。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、非受精卵は小さな pipette で顆粒膜細胞をよく除去してから実験に供した。

Micromanipulation には、通常の油圧駆動 micromanipulator (ナリシゲ)、および圧電方式の Piezo micromanipulator controller (プリマハム) を使用した。倒立顕微鏡 (オリンパス) 下に卵子を microholder で固定し、insemination mixture 中の夫精子を 1 個 micropipette に吸引して、卵子細胞質内に注入した。術後の卵子はただちに培養液に移し、18~48 時間培養した。なお、後半の実験では micromanipulation 後、卵子を 5  $\mu$

MA<sub>23187</sub> を含む PBS で5分間処理してから培養液に移した。

結果：油圧駆動 micromanipulator を用いた初期の実験では(表1)、64個の卵子中54個(84.3%)が生存し、うち7個(13.0%)に2個の前核の形成を認めた。しかし、分割したのはわずか1個(1.9%)であった。これに対して、圧電駆動で microinjection を行い、術後 ionophore で5分間処理した群(表2)では、73個の卵子中67個(91.8%)が生存し、このうち15個(22.4%)に2個の前核を認め、11個(16.4%)は2～4細胞期に分割した。

表1. 卵子内精子注入の成績

卵 子 数	64
生存卵子	54 (84.3%)
受 精 卵	7 (13.0%)
分 割 卵	1 (1.9%)

油圧駆動 micromanipulator 使用

表2. 卵子内精子注入 (A<sub>23187</sub> 処理) の成績

卵 子 数	73
生存卵子	67 (91.8%)
受 精 卵	15 (22.4%)
分 割 卵	11 (16.4%)

圧電駆動 micromanipulator 使用

考察：IVF, GIFT の開発により、女性不妊の治療は大巾に進歩した。これに対して、男性不妊の予後は相変わらず不良である。適切な治療法が無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。なかでも、精子受精能力障害 (ZSPT 0%) を合併する場合は妊娠は絶望的である。不妊患者2029例の分析では、全体で8.2%, 乏精子症では実に29.8%に精子受精能力障害が認められた。このような症例に対しては、卵子内精子注入が唯一の治療法である。Microinjection でまず問題になるのは、卵子に対する損傷であるが、今回の実験ではほぼ満足すべき生存率が得られた。しかし、受精率、分割率はきわめて低かった。精子を単に卵子内に注入するだけでは卵子の activation には不十分なのであろう。実際、microinjection 後の卵子を ionophore で短時間処理すると、受精率、分割率ともかなり改善した。ionophore A<sub>23187</sub> が卵子の活性化を誘起することはよく知られている。ウサギでは microinjection によりすでに産仔が得られているが胚の発生率はやはり低いという。ウシの卵子についてもほぼ同様で、microinjection 単独では受精率はきわめて低いが、ionophore A<sub>23187</sub> で処理すると、受精率、分割率とも大巾に改善すると報告されている。

最近、後藤ら (1990) は microinjection で受精したウシ卵子を移植し、子牛の生産にはじめて成功したが、これらの卵子もやはり ionophore A<sub>23187</sub> 処理によるものであった。

ヒトの卵子は in vitro で activation されにくいといわれている。しかし、ionophore 処理により microinjection 後の受精、分割が促進されることは事実であり、卵子内精子注入は男性不妊に対する究極の治療法としていずれ臨床応用さ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. Iritani, A. (1990). Micromanipulation of gametes for in vitro assisted fertilization  
Molec. Reprod. Dev. 28:199

3. 後藤和文, 他 (1990). 顕微受精・体外培養胚の移植による子牛の生産  
第78回家畜繁殖学会講演要旨

# 凍結マウス精子の卵管内注入による新生仔の作成

## Production of Normal Young Following Injection of Frozen-Thawed Mouse Spermatozoa into Fallopian Tubes of Pseudopregnant Females

中瀉直己

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、マウス精子の凍結保存の成功例が相次いで報告され、それら精子を用いて体外受精・胚移植あるいは人工授精を行なうことにより、産仔が得られている<sup>1-4)</sup>。しかしながら、体外受精・胚移植は卵子提供雌の卵子と凍結精子との間で体外受精を行ない、得られた胚をさらに受容雌へ移植するという二段階の操作を必要とし、また、人工授精は、直接、妊娠せしめようとする雌の膣あるいは子宮へ多量の精子を注入しなければ、高い受胎率が得られないことから、融解後、活発な運動を呈する精子が極めて少ない凍結マウス精子においては、産仔の作出法として、体外受精・胚移植および人工授精は必ずしも良好な方法とはいえないように思われる。そこで本実験では、より少ない精子数で高率に受精可能であろうと考えられる卵管内授精に着目、排卵直後の偽妊娠雌の卵管に凍結マウス精子を注入することにより、産仔の作出を試みた。

方法：①精子浮遊液の作製：Jcl:ICR 成熟雄マウスの精巢上体尾部4ヶを0.4 mlの保存液(18% raffinose, 3% skim milk in D.W.)内で細切し、1～2分間浸漬することにより、精子浮遊液を作製した。②精子の凍結および融解：作製した精子浮遊液を0.1 mlずつ0.5 mlの凍結用チューブに分注し、室温より凍結用チューブを液体窒素ガス中に移し、約10分間静置後、液体窒素中に浸漬することにより精子の凍結を行なった。また、融解は、凍結用チューブを液体窒素保管器より取り出し、3～4分、室温に放置することにより行なった。③融解後の保存液の希釈および洗浄：融解した精子浮遊液を0.4mlの培養液下部に静かに挿入し、培養器内で30分静置後、0.45μmのミリアフィルターを用いて保存液の除去を行ない、最終精子浮遊液量を0.4mlとした。続いてこの精子浮遊液をシャーレ内の中央に取り、その表面約2/3を流動パラフィンで被った後、培養器内で1.5時間の前培養を行なった。⑤卵管内授精：卵管内授精は、精管結紮雄と交配し、偽妊娠を誘起したJcl:MCH(ICR)雌マウスの卵管へ凍結精子を注入することにより行なった。即ち、前培養した精子浮遊液の上層部より、キャピラー(Φ150μ)内に精子浮遊液を吸引後、卵管採一排卵部位間の卵管壁を介して排卵卵子近傍の膨大部内に一側当たり最大許容量約3-5μlの精子浮遊液(約6000-10000精子)を注入した。また、同様の方法により未凍結精子を同部位に注入したものを対照区とした。尚、卵管内への精子の注入は、膣栓確認日の午前8:00～10:00に行なった。

結果：卵管内へ凍結精子を注入された計12匹の受容雌の内、5匹が妊娠し(41.2%)、その全例から計28匹( $5.6 \pm 1.50$ )の新生仔が得られた。一方、対照区においては移植を受けた6匹中4匹が、妊娠・分娩し(66.6%)、計30匹( $7.5 \pm 2.69$ )の新生仔が得られた(表1)。

Table 1. Conception and litter size following injection of frozen-thawed mouse spermatozoa into Fallopian tubes of pseudopregnant females

Sperm	No. of pseudopregnant females used <sup>a</sup>	No. of animals which delivered live young <sup>b</sup> (b/a, %)	No. of live young			
			♀	♂	Total <sup>c</sup>	(Litter size : c/b)
Frozen-thawed	12	5 (41.2)	16	12	28	( $5.6 \pm 1.50^*$ )
Control (unfrozen)	6	4 (66.6)	17	13	30	( $7.5 \pm 2.69^*$ )

\* : Mean  $\pm$  S.D.

考察：排卵直後の偽妊娠雌の卵管に良好な運動性を有する凍結マウス精子を注入すると、擬妊娠雌の一部は妊娠し、新生仔が得られることが明らかとなった。本法は体外受精・胚移植に比べ、簡易であり、また、膈ある子宮に精子を注入する人工授精より、極めて少ない精子数で受胎が可能であることから、凍結マウス精子を用いた産仔の作出法として有効な方法と思われる。しかしながら、凍結マウス精子による妊娠率および平均産仔数は対照区のそれらと比べ低く、今後、さらに検討を要するものと思われる。本研究は、平成2年度文部省科学研究費重点領域研究「遺伝子導入動物」の一部として実施された。

## 文 献

- 1) 横山峯介、秋葉久弥、勝木元也、野村達次：(1990) 凍結保存マウス精子の体外受精による正常産仔の作成。日本実験動物学会雑誌. 39 125-128.
- 2) Tada, N., Sato, M., Yamanoi, J., Mizorogi, T., Kasai, K. and Ogawa, S. : (1990) Cryopreservation of mouse spermatozoa in the presence of raffinose and glycerol. J. Reprod. Fert. 89 511-516.
- 3) 奥山 学、磯貝滋樹、佐賀正彦、浜田 宏、尾川昭三：(1990) マウス凍結精子の体外受精および人工授精試験。日本受精着床学会雑誌. 7 116-119.
- 4) 竹島 勉、中潟直己、尾川昭三：(1991) マウス精子の凍結保存。日本実験動物学会雑誌. 投稿中

# クライオバイアルを用いたマウス初期受精卵の 超急速凍結保存について

## Ultrarapid freezing of early stage mouse embryos by using cryovial

田谷順子・竹田 省・木下勝之

Junko Taya, Satoru Takeda, Katsuyuki Kinoshita

埼玉医科大学総合医療センター 産婦人科

Department of Obstetrics and Gynecology,

Saitama Medical Center, Saitama Medical School

目的：近年、Rall and Fahy による Vitrification 法<sup>1)</sup>を初めとする凍結保存技術の操作簡略化を目的とした種々の研究が進められ、それらの産業動物（実験動物を含む）への応用が望まれている。これら研究の多くはプラスチックストローを凍結容器として用い、バイアルによる試みはほとんどなされていない。発生工学の進歩が目覚ましい現在、貴重な受精卵の確保並びに保存時の識別管理が重要になると思われる。そこで、凍結容器に識別記入が十分可能なクライオバイアルを使用し、超急速凍結法によりマウス初期受精卵（前核期および2細胞期胚）の凍結保存を試み、融解後の生存性について検討を行なった。

方法：ICR 並びに IVCS 系成熟雌マウスに 5iu PMSG と hCG を48時間間隔で腹腔内投与し、成熟雄と交配させた。hCG 投与24時間後に前核期受精卵および48時間後に2細胞期胚を卵管灌流法にて採取した。受精卵は15% FCS 添加 HTF 培養液<sup>2)</sup>中で20-30分培養後、凍結実験に供した。2M Dimethyl sulphoxide, 1M Acetamide 3M Propylene glycol 組成の DAP 213<sup>3)</sup>を凍結保存液として用いた。凍結は1.5ml 容量のクライオバイアル（ポリプロピレン製、エバークリン社）内に50 $\mu$ l の保存液を入れ、その中に15-20個の受精卵を少量の培養液と共に移し、即座に液体窒素へ浸漬して行なった。一定期間保存後、保管器よりバイアルを取り出し、37℃の微温湯中で加温しながら0.3M Sucrose HBI 液<sup>4)</sup>を添加、振盪して保存液を希釈した。バイアル中の溶液をパスツールピペットでシャーレに移して受精卵を回収し、HTF 培養液で十分な洗浄の後に受精卵の形態的観察を行なった。形態的に正常と判定したものについては100 $\mu$ M EDTA 添加 HTF 培養液内で体外培養し、胚盤胞期への発生を観察した。

結果：凍結融解時の生存率と体外培養成績を Table 1 および Table 2 に示した。融解時には90%以上の受精卵が回収され、その形態的正常割合は前核期受精卵では84%、2細胞期胚では89%であった。また、形態的に正常と判定した受精卵のうち、体外培養によりそれぞれ65および74%が胚盤胞期へと発生した。

Table 1. Survival rates of frozen-thawed mouse embryos on thawing

Stage of embryos at freezing	No. of embryos frozen	No. of embryos	
		recovered(%)	morphologically normal(%)
1-cell	217	201 (92.6)	169 (84.1)
2-cell	240	226 (94.2)	200 (88.5)

Table 2. Development in culture of frozen-thawed mouse embryos

Stage of embryos at freezing	No. of embryos cultured	No. (%) of embryos developed to blastocyst
1-cell	169	110 (65.1)
2-cell	200	147 (73.5)

考察：セラムチューブ使用によるマウス初期胚の超急速凍結保存は河野ら<sup>5)</sup>により試みられ、8細胞期および桑実胚以外の発生段階では高い生存率が得られないと報告している。しかしながら、本実験結果からは演者が先に報告<sup>6)</sup>した成績とほぼ同程度の成績が得られた。このことから、超急速凍結法におけるクライオバイアルの適用が可能となり、凍結保存時に識別管理が重要視される受精卵への本法適応は有用であると考えられた。

#### 主要文献

- 1) Rall, W.F., and Fahy, G.M. (1985) Nature 313, 573-575
- 2) Quinn, P.Q., Kerin, J.F., and Warnes, G.M. (1985) Fertility and Sterility 44, 493-498
- 3) 中潟直己 (1989) 日本不妊学会雑誌 34, 757-760
- 4) Rall, W.F (1987) Cryobiology 24, 387-402
- 5) 河野友宏、角田幸生 (1987) 家畜繁殖学会誌 33, 77-81
- 6) 田谷順子、吉田長生、吉田竹瑯 (1989) 日本不妊学会雑誌 34, 638 [講演要旨]

# ラット卵巣のガラス化法による凍結保存

## —— V S 1 1 0 0 % 液への直接浸漬 ——

Cryopreservation of rat ovary by direct plunging into 100% of VS1

利部 聡・萬場光一・牧田登之

KAGABU Satoshi, MAMBA Kouichi and MAKITA Takashi

山口大学農学部家畜解剖学教室

Department of Veterinary Anatomy, Yamaguchi University

### 【目的】

ガラス化法による卵巣の凍結保存が可能であることは知られている<sup>1)</sup>。ガラス化法の特徴は、凍結過程が従来の方法に比べ簡単であることがあげられるが、この方法を用いてもなお最短60分を要する。本報告は、さらに簡単な凍結法を開発することを目的として100%VS1液への直接浸漬による凍結卵胞の生存性を調べたものである。

### 【方法】

実験に用いたのは、ウィスター・今道ラットである。ドナーとしたラットは6週齢、レシピエントとしたのはあらかじめ卵巣を除去しておいた12～15週齢のラットである。ペントバルビタール塩前麻酔・ジエチルエーテル後麻酔下で卵巣を取り出し、直ちに室温に暖めたPBI中で洗浄した。続いて氷冷した100%VS1液へ卵巣を入れ一定時間同液中に保持した。その後卵巣を100%VS1液とともにセラムチューブに入れ液化窒素に直接投入して凍結し7～10日間凍結保存後移植した。37℃の温湯中に入れ激しく攪拌して融解後氷冷した50%VS1液・25%VS1液・0%VS1液中にそれぞれ15分間保持して凍結保護剤を除去した。以上のように凍結・融解した卵巣をレシピエントの背部皮下に移植後、4日目に剖検・採材し常法によってパラフィン連続切片として観察した。凍結・融解・移植卵巣の生着の判定は、観察時の非閉鎖卵胞の存在によった。すなわち、①果粒層細胞に核濃縮が認められないこと、②果粒層細胞に分裂増殖像が認められるもの、③卵母細胞の核膜が崩壊していないことをもって

卵巣の生着とした。閉鎖卵胞、黄体など非閉鎖卵胞以外の構成物を観察対象からはずしたのは、本研究の目的が最終的には、卵母細胞の採取であるからである。なお、各実験区とも供試ラット数はそれぞれ10頭である。

### VS1液の組成

DMSO	20.0% <sup>w/v</sup>
アセトアミド	15.5% <sup>w/v</sup>
プロピレングリコール	10.0% <sup>w/v</sup>
ポリエチレングリコール	6.0% <sup>w/v</sup>

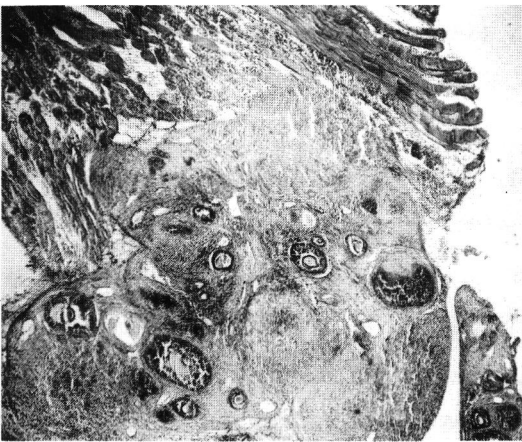
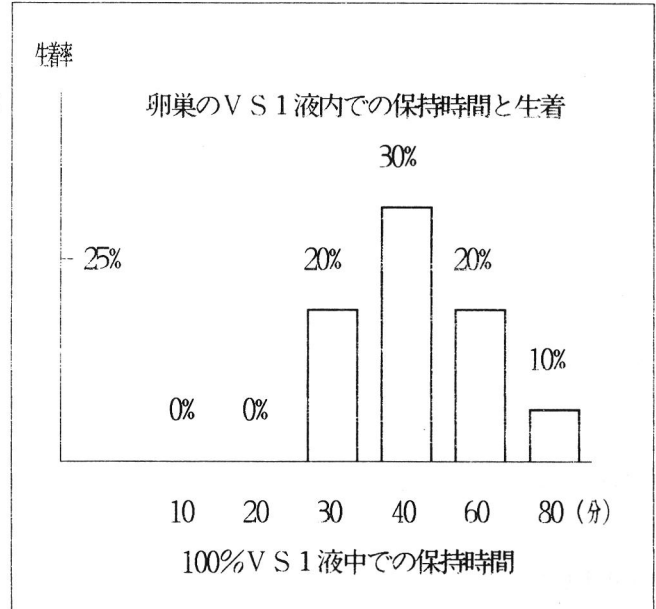
以上をPBIに溶かす

## 【結果】

移植した凍結・融解卵巣中に1つでも非閉鎖卵胞が存在していたものを生着卵巣とみなした。100% V S 1 液中に10~20分間保持したものでは、全例に生着が観察されなかったが、40~60分間保持区では概ね1/4に卵巣の生着が認められた。しかし保持時間がさらに長くなると生着率は、減少した。

## 【考察】

Rall & Fahy<sup>1)</sup> がマウス卵子で開発したガラス化法をラット卵巣の凍結保存に応用してみたが、わずかではあるものの卵巣が生着した。しかし生着したといっても最高で30%どまり、さらに生着卵胞数も最少1つであるので本方法は改良しなければならぬ点を多く残している。



凍結・融解卵巣の生着：100% V S 1 液中で40分間保持し移植後4日目に剖検・採材、生着卵胞とみなしたもの

## 【文献】

- 1) 利部 聡・牧田啓之・萬場光一：卵巣の簡易凍結保存法. 第105回日本獣医学会(1988)
- 2) Rall, W.F. & Fahy, G.M. : Ice-free cryopreservation of mouse embryos at  $-196^{\circ}\text{C}$  by vitrification. Nature, 313(1985)

# マウス初期胚発育に及ぼす酸化ストレスの評価

## The effects of oxidative stress on mouse embryo development

後藤康夫・野田洋一・成木勝彦・馬岡 陽・森 崇英

Yasuo GOTO, Yoichi NODA, Katsuhiko NARIMOTO, Yoh UMAOKA, Takahide MORI

京都大学医学部婦人科学産科学教室

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

**目的：**我々は、活性酸素が胚発育に及ぼす影響に着目し、 $O_2^-$ のscavengerであるsuperoxide dismutase(SOD)がマウス2-Cell blockを解除すること<sup>1)</sup>、またSOD添加低酸素下培養法が極めて高い胚盤胞率をもたらすこと<sup>2)</sup>を報告してきた。これらの事実は、胚をin vitro で取り扱う際には活性酸素からの胚の保護が重要であることを示していると考えられる。活性酸素によって障害を受けるターゲットを考えてみると、その可能性の一つに酸化を受け易いものとしてのタンパク質SH基があげられる。本研究では、タンパク質のSH基の酸化還元反応に関与するといわれる Thioredoxin (E.Coli)<sup>3)</sup>に着目し、そのマウス初期胚発育に及ぼす影響を検討するとともに、その作用時期を明らかにすることを目的とした。

**方法：**ICR系雌マウス4週齢に過排卵処理をおこない、同系雄と同居させた。hCG投与17時間後に回収した前核期胚を実験に供した。基本培養液は0.3%BSA添加BWW液、培養条件は37°C, 5%CO<sub>2</sub>, in airとした。＜実験1＞基本培養液にThioredoxinをそれぞれ20、200、2,000  $\mu$ g/mlの濃度で添加した培養液中で培養した。対照としては基本培養液で胚を培養した。＜実験2＞前核期胚を次の4群に分け培養した。Ⅰ：基本培養液にThioredoxinを200  $\mu$ g/mlの濃度で添加した液で培養を開始し、31時間後に別のThioredoxin添加液に移し培養を継続した群。Ⅱ：Thioredoxin添加液で培養を開始し、31時間後に基本培養液に移し培養を継続した群。Ⅲ：基本培養液で培養を開始し、31時間後にThioredoxin添加液で培養を継続した群。Ⅳ：基本培養液で培養を開始し、31時間後に別の基本培養液に移し培養を継続した群。なお、胚の移しかえの際にはBWW液で3回洗浄した。

**結果：**＜実験1＞培養開始120時間後におけるBlastocystへの発生率はThioredoxinを添加した場合、いずれも対照に比し有意に高値であった。Thioredoxin濃度が200  $\mu$ g/mlの場合に最高値を示した(73.9%)。(表1) ＜実験2＞培養開始96時間後におけるBlastocystへの発生率は、ⅠおよびⅡ群では、ⅢおよびⅣ群に比し有意に高値であった。しかし、Ⅰ群とⅡ群の間およびⅢ群とⅣ群の間には有意差はみとめなかった。(表2)

表1. Effects of Thioredoxin on mouse embryos

Thioredoxin	Embryos	Blastocysts (%)
20 $\mu$ g/ml	96	28 (29.2)**
200 $\mu$ g/ml	92	68 (73.9)**,#
2,000 $\mu$ g/ml	106	53 (50.0)**
0 (Control)	90	11 (12.2)

\*\*, #  $P < 0.01$ ,  $\chi^2$  test.

表2. Stages on which Thioredoxin acts

Group	Embryos	Blastocysts (%)
I群	102	58 (56.9)**
II群	90	54 (60.0)**
III群	82	6 (7.3)
IV群	96	6 (6.3)

\*\* $P < 0.01$ ,  $\chi^2$  test.

N.S. No significant difference,  $\chi^2$  test.

**考察:** 本研究によりThioredoxinがマウス2-Cell blockを解除し、高い胚盤胞率をもたらすことが示された。Thioredoxinの活性中心は、2個のCysteine残基に存在しており、酸化型では2個のCysteine残基はS-S結合している。酸化型Thioredoxinは、Thioredoxin Reductaseにより還元され還元型Thioredoxinとなり、還元型Thioredoxinはタンパク質のS-S結合を還元しSH基に変える<sup>3)</sup>。低酸素下、SOD添加およびThioredoxin添加培養は、いづれも酸化的ストレスから初期胚を保護するという観点で共通した考え方に基づいている。しかし、本実験結果から考えると、Thioredoxinの作用の仕方は他の二者と異なっていると思われる。即ち、Thioredoxinの作用時期は前核期から2-Cell (hCG投与後17から48時間) のみであり、2-Cell以降にも胚発育促進効果がみられる低酸素下SOD添加培養法<sup>4)</sup>と異なる。そこで、低酸素下、SOD添加およびThioredoxin添加培養の作用機序を考察してみると、前二者は胚内あるいは培養液中における活性酸素の消去系として機能するものと考えられ、一方、Thioredoxinは胚内に取り込まれて還元を受け、これがタンパク質のS-S結合を還元する働きをしているのであろう。Thioredoxinが還元する標的タンパクが何であるかは今後の検討を要する。

以上述べてきたように、in vitroで胚を取り扱う際には酸化的ストレスからの胚の保護が重要であり、低酸素下、SOD添加およびThioredoxin添加培養などにより胚発効率が改善されることが明らかとなった。なお、本研究は文部省重点領域研究(生殖系列: No.01640004, No.02222104)および科学研究費一般研究B (No.01480391) により補助を受けた。

#### 文献:

- 1) Noda Y, Matsumoto H, Umaoka Y, Tatsumi K, Kishi J, Mori T.: Molec Reprod Develop (in press), 1991.
- 2) Umaoka Y, Noda Y, Matsumoto H, Mori T: Jpn J Fertil Steril 35:285-292, 1990.
- 3) Holmgren A.: Thioredoxin. Ann Rev Biochem 54:237-271, 1985.
- 4) Umaoka Y, Noda Y, Mori T.: Jpn J Fertil Steril 35:469-474, 1990.

# ホロ型及びアポ型トランスフェリンのマウス初期胚発生に及ぼす影響

Effects of holo- and apo-transferrin on mouse pronuclear stage embryos

夏山 知・野田洋一・成木勝彦・馬岡 陽・森 崇英

Satoshi NATSUYAMA, Yoichi NODA, Katsuhiko NARIMORO, Yoh UMAOKA

Takahide MORI

京都大学医学部婦人科学産科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology,

Faculty of Medicine, Kyoto University

**目的：**体細胞培養における細胞増殖には増殖因子や金属イオン・脂肪酸の担体としての各種血清蛋白が必要であることが様々な細胞系で明らかにされている<sup>1,2)</sup>。しかし、初期胚、とくに前核期から卵割期における培養胚の発育における増殖因子の関与は否定的であり<sup>3)</sup>、また金属イオン・脂肪酸の担体蛋白質の意義についても明らかではない。今回、鉄イオンの担体蛋白質であるトランスフェリンに注目し、2cell blockを示すマウス(TUCK, outbred)前核期胚培養系を用いて、ホロ型及びアポ型トランスフェリンの初期胚発生に及ぼす影響を検討した。

**方法：**4週齢の雌マウスに過排卵処理(PMSG 5単位、hCG 5単位を48時間間隔で腹腔内投与)をした後、11-12週齢の同系雄マウスと交配させ、翌日陰栓を認めたものを実験に供した。hCG投与18時間後に頸椎脱臼法にて屠殺し、卵管膨大部より前核期胚をD-PBS中に回収し、0.1%hyaluronidase添加D-PBS中にて顆粒膜細胞を除去した後、D-PBSにて洗浄して培養に供した。4well multidishにホロ型トランスフェリンおよびアポ型トランスフェリンをそれぞれ3mg/ml添加したBWWの100  $\mu$ l spotを作成し、mineral oilで覆い、spot内に前核期胚を加え、37°C、5% CO<sub>2</sub>、in airにて培養した。対照として蛋白質無添加BWW培地および3mg/mlのBWWを添加した培地を用いた。胚の発育は位相差顕微鏡下で24時間ごとに観察した。

**結果：**ホロ型トランスフェリン添加群の2-cell率は蛋白無添加群・BSA添加群に比べて有意に低く(無添加:9.0.5%, BSA添加:88.2%, holo-transferrin添加:64.8%)、4-cell率もBSA添加群に比べ有意に低値であった(BSA添加:41.2%, holo-transferrin添加:9.2%)。一方、アポ型トランスフェリン添加群では蛋白無添加群胚・BSA添加群に比べて、4-cell率(無添加:14.3%, BSA添加:41.2%, apo-transferrin添加:83.6%)、morula率(無添加:2.3%, BSA添加:17.6%, apo-transferrin添加:45.4%)及び胚盤胞率(無添加:0%, BSA添加:3.9%, apo-transferrin添加:27.3%)が有意に高く、明かな胚発生促進効果が認められた。

**考察：**BSA無添加のBWW培地において、ホロ型トランスフェリンは前核期の胚発育促進効果を示さなかったのに対し、アポ型トランスフェリンは有意な2cell block解除効果を示した。我々はこれまで低酸素下培養<sup>4)</sup>やSOD添加培養<sup>5)</sup>によりマウス2-cell blockが解除されることを明かにし、酸化ストレスによる胚の障害が2-cell blockの成因である可能性を示してきた。活性酸素による細胞障害過程において $O_2^-$ と $H_2O_2$ から $OH\cdot$ を生じるFenton型Haber-Weiss反応が重要な役割を果たし、この反応には微量の $Fe^{2+}$ や $Cu^{2+}$ が必要であることから考えると、添加されたアポ型トランスフェリンは鉄イオンとキレートを形成することにより、この反応を阻害し、胚の障害を防いだものとする。しかし、この機序を明らかにするためには、培養液中の鉄イオンの測定を含めた更なる詳細な検討が必要である。この観点から今後さらに研究を進めて行く予定である。また、本研究は文部省重点領域研究（生殖系列：No.01640004, No.02222104）および科学研究費一般研究B（No.01480391）により補助を受けた。

表 初期胚培養におけるホロ型およびアポ型トランスフェリンの効果

Proteins (3mg/ml)	No.of Exps.	No. of Embryos	Day2 2-cell(%)	Day3 4-cell	Day4 Morula	Day5 Blastocyst
無添加	4	42	38(90.5)	6(14.3)	1( 2.3)	0
BSA	4	51	45(88.2)	21(41.2)**	9(17.6)*	2(3.9)
Holo-transferrin	4	54	35(64.8)***	5( 9.2)**	4( 7.4)	0
Apo-transferrin	4	55	53(96.4)	46(83.6)***	25(45.4)***	15(27.3)***

蛋白無添加群との $\chi^2$ 検定 (\*:P<0.05、\*\*:P<0.01)、BSA添加群との $\chi^2$ 検定 (\*\*:P<0.01)

#### 文献：

- 1) 山根 積 (1985). 細胞培養技術の歴史、"細胞培養技術" 福井三郎編、講談社、P.1.
- 2) 光木 浩司 源良 樹 (1985). 細胞培養の基本技術と大量細胞培養の問題点、"細胞培養技術" 福井三郎編、講談社、P.77.
- 3) Rappolee, D.A. et al. (1990). In:Early Embryo Development and Paracrine Relationships, Edited by S. Heyner, and L.M.Wiley. New York, Wiley-Liss, P.11.
- 4) Umacaka, Y. et al.: Jpn. J. Fertil. Steril., 35:285-292, 1990.
- 5) Noda, Y. et al.: Molec. Reprod. Develop., in press.

# ThioredoxinによるMouse 2-cell block解除効果

## Release of Mouse 2-Cell Block by Thioredoxin

夏山 知・野田洋一・成木勝彦・馬岡 陽・森 崇英

Satoshi NATSUYAMA, Yoichi NODA, Katsuhiko NARIMORO, Yoh UMAOKA

Takahide MORI

京都大学医学部婦人科学産科学教室

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

**目的:**我々はこれまでに低酸素下培養<sup>1)</sup>やsuperoxide dismutase (SOD)添加培養<sup>2)</sup>によりマウス2-cell blockが解除されることを明かにし、酸化ストレスによる胚障害が2-cell blockの成因である可能性を示してきた。thioredoxin<sup>3)</sup>はthiol-disulfide交換反応により酸化還元反応を仲介する酵素であり、酸化ストレスに対する防御機能が注目されている。今回、初期胚培養におけるthioredoxinの効果を明らかにすることを目的とし、2-cell blockを起こすマウス(Tuck)前核期胚を用い培養実験を行った。

**方法:**4週齢の雌マウスに過排卵処理(PMSG 5単位、hCG 5単位を48時間間隔で腹腔内投与)をした後、11-12週齢の同系雄マウスと交配させ、翌日腔栓を認めたものを実験に供した。hCG投与18時間後に頸椎脱臼法にて屠殺し、卵管膨大部より前核期胚をD-PBS中に回収し、0.1%hyaluronidase添加D-PBS中にて顆粒膜細胞を除去した後、D-PBSにて洗浄して培養に供した。BSA3mg/ml添加BWW培地にそれぞれ10、50、100、500、1000および5000  $\mu\text{g/ml}$ のthioredoxin (E.coli由来)を添加した。対照群はBSA添加BWW培地とした。胚の発育を位相差顕微鏡下にて24時間ごとに観察した。

**結果:**thioredoxin添加により、4細胞率以降に有意な胚発育促進効果が認められた。即ち、4-cell率は対照群で55.8%であったのに対し、50、100、500、1000、5000  $\mu\text{g/ml}$ の各濃度のthioredoxin添加群でそれぞれ76.3%、74.6%、84.2%、78.2%、80.7%と有意に上昇した。胚盤胞率は対照群で僅か3.8%であったのに対し、50  $\mu\text{g/ml}$ の濃度では37.3%と有意に上昇した。500  $\mu\text{g/ml}$ の濃度まで用量依存的に胚盤胞率の上昇がみられ、1000  $\mu\text{g/ml}$ の濃度以上では低下傾向を示した。

**考察:**初期胚培養において酸化ストレスからの胚の防御が重要であるとの見地から、我々はこれまで抗酸化物質の初期胚発育におよぼす影響を検討してきた。今回、thioredoxinが2-cell blockを解除することを初めて明らかにした。thioredoxinの胚発育促進効果は用量依存性であり、500  $\mu\text{g/ml}$ 前後で最大効果を示し、70.2%と

極めて高い胚盤胞率が得られた。thioredoxinはglutathionと同様に細胞内では還元状態で存在し、細胞が酸化ストレス下におかれた場合に形成される蛋白質の非生理的なdisulfide結合を解除すること、methionineの酸化によるmethionine sulphoxideを還元・修復すること<sup>4)</sup>、また様々な酵素の酸化による失活を回復させることなどが明らかにされている。2-cell blockは細胞周期のS期以降で停止すること<sup>5,6)</sup>から考えると、G2期からM期にいたる細胞周期制御<sup>7)</sup>や細胞分裂機構における酸化的障害が2-cell blockの成因であり、thioredoxinはこの過程の障害を回復する可能性が強く示唆される。投与したthioredoxinは酸化型であり、胚内に取り込まれた後、還元化されて胚発育促進効果を示したものとする。今回示された胚発育促進効果効果がthioredoxin moleculeそのものによりもたらされたものであるかどうかを、現在、抗体阻害実験・熱処理実験を行って検討中であり、今後、細胞周期や分裂機構の面も含め検討を続けていきたい。また、本研究は文部省重点領域研究（生殖系列：No.01640004, No.02222104）および科学研究費一般研究B（No.01480391）により補助を受けた。

表 Thioredoxin(Trx)の初期胚培養に及ぼす影響  $\chi^2$ 検定(\*P<0.05, \*\*P<0.01)

Experiments		Number of embryos examined	No.(%) of embryos developed to		
Condition	Trials		2-cell(D2)	4-cell(D3)	Blastocyst(D5)
Control	4	52	46(88.5)	29(55.8)	2(3.8)
Trx( $\mu$ g/ml)					
10	4	60	50(83.3)	31(51.7)	9(15.0)
50	4	59	52(88.1)	45(76.3)*	22(37.3)**
100	4	59	54(91.5)	44(74.6)*	35(59.3)**
500	4	57	49(86.0)	48(84.2)**	40(70.2)**
1000	4	55	46(83.6)	43(78.2)*	34(61.8)**
5000	4	57	52(91.2)	46(80.7)**	31(54.4)**

文献：1) Umaoka, Y. et al.: Jpn. J. Fertil. Steril., 35:285-292, 1990.

2) Noda, Y. et al.: Molec. Reprod. Devel., in press 1991.

3) Holmgren, A.: Annu. Rev. Biochem., 54:237-271, 1985.

4) Porque, P.G. et al.: J. Biol. Chem., 245:2371-2374, 1970.

5) Luthardt, F.W. et al.: Devel. Biol., 44:210-216, 1975.

6) Goddard, M.J. et al.: J. Embryol. Exp. Morph., 73:111-133, 1985.

7) Nurse, P.: Nature, 344:503-508, 1990.

# マウス胚の 2-cell block に及ぼす calmodulin の影響

## Effect of calmodulin on 2-cell block of mouse embryos

山田 薫・西 慶子・佐藤 嘉兵

Kaoru YAMADA, Keiko NISHI, Kahei SATO

日本大学農獣医学部動物細胞学教室

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

目的：哺乳動物の初期胚に種々の操作を加えて発生を人為的に制御しようとする試みは古くから行われているが、受精卵の発育分化調節因子は未だ明らかにされていない。マウス初期胚の培養技術は確立されているが、本実験使用の ddY 系を含め一般の系統の初期胚では着床前の全過程を体外で進行させることは困難である。その多くは、2細胞期で発生を停止してしまう 2-cell block によるものである。この原因は明らかにされていないが、培養条件の改善や培養液中への微量の EDTA 添加や培養液中の  $\text{Ca}^{2+}$  量の減少により 2-cell block が解除される事が知られていることから 2-cell block において卵細胞内での  $\text{Ca}^{2+}$  の介在が示唆されている。そこで本実験では、4つの  $\text{Ca}^{2+}$  結合部位をもつ結合蛋白質のひとつである calmodulin が 2-cell block に与える影響について検討を行った。

方法：実験には ddY 系成熟雌マウスを用いた、過排卵誘起のため PMSG 8IU、hCG 10IU を 48 時間間隔で腹腔内注射し、hCG 投与直後に同種の成熟雄マウスと同居、交配させた。hCG 投与後 24 時間に膣栓の認められたものより卵管を摘出し灌流により採卵した。採取した卵子を  $6 \mu\text{g/ml}$ 、 $6 \times 10^{-1} \mu\text{g/ml}$ 、 $6 \times 10^{-2} \mu\text{g/ml}$ 、 $6 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$  の calmodulin 添加培養液、 $\text{Ca}^{2+}$  量を 1/2 に減少させた培養液で培養を行った。なお  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を 1/2 に減少させた培養液は浸透圧を一定に保つために  $\text{CaCl}_2$  と  $\text{NaCl}$  を置換することにより調整した。その後、 $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$ -Air の条件下で培養し、4細胞期に達したものを標準培養液に移し換え、胞胚への発生能を調べた。

結果及び考察：calmodulin を添加していない標準培養液の場合、4細胞期への発生率 0% に対し、calmodulin を  $6 \mu\text{g/ml}$  添加した場合では 3.8%、 $6 \times 10^{-1} \mu\text{g/ml}$  では 30.4%、 $6 \times 10^{-2} \mu\text{g/ml}$  では 22.0%、 $6 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$  では 33.3% の 4細胞期への発生がみられた。また、その他 calmodulin 添加培養液で 4細胞期胚を標準培養液に移し換えたもののその先の発生は、 $6 \times 10^{-1} \mu\text{g/ml}$  では 5.9% が桑実胚に、 $6 \times 10^{-2} \mu\text{g/ml}$  では 15.4% が、 $6 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$  では 5.0% が胞胚まで発生した。

以上のことから calmodulin 添加培養液において 4細胞質期への発生に改善がみられ、

2cell block解除効果が明らかに示された。しかし, calmodulinを $6\mu\text{g/ml}$ 添加したものは, 4細胞期以降, 発生がみられないことから, 高濃度のcalmodulin添加培養液での培養は, その毒性により胚発生に悪影響を及ぼしたと考えられる。

Effect of calmodulin on the development in vitro of  
1-cell mouse embryos into blastocysts

Concentration of calmodulin ( $\mu\text{g/ml}$ )	No. of eggs	Developmental stage reached				
		2-cell	4-cell	8-cell	Morula	Blastocyst
0	45	28 (62.2)	0 (0.0)	-	-	-
$6 \times 10^{-3}$	60	50 (83.3)	20 (33.3)	4 (20.0)	2 (10.0)	1 (5.0)
$6 \times 10^{-2}$	59	49 (83.1)	13 (22.0)	5 (38.5)	2 (15.4)	2 (15.4)
$6 \times 10^{-1}$	56	49 (87.5)	17 (30.4)	2 (11.8)	1 (5.9)	0 (0.0)
6	53	34 (64.2)	2 (3.8)	0 (0.0)	-	-

Figures in parentheses represent percentage.

主要文献

笠井久隆・奥山典生(1981): カルモデュリンの構造と機能

カルモデュリン - $\text{Ca}^{2+}$ 受容蛋白質 (日高弘義・垣内史朗編) pp.8-18, 講談社, 東京

八木康一・矢沢道生(1988): カルモデュリンを介する作用発現機構

カルシウムイオンと細胞機能 (信沢孝一編), pp.2083-2101, 共立出版株式会社, 東京

# ハムスター卵胞卵子の体外成熟に およぼす二、三の薬物の影響

## Effects of Some Drugs on In Vitro Maturation of Hamster Follicular Oocytes

佐藤嘉兵、 金田秀貴、 横田秀夫、

Kahei SATO, Hideki KANETA, Hideo YOKOTA

日本大学農獣医学部 動物細胞学教室

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

目的：哺乳動物卵子は体外環境下で細胞核の変化から成熟が可能であることは周知である。しかしながら、体外で成熟した卵胞卵子を体外受精(IVF)を行うと精子頭部の膨化および雄性前核形成が阻害されることが研究の初期から知られてきた(Thibault, 1973)。その原因は精子頭部膨化因子あるいは雄性前核形成因子の生産が体外で成熟した卵胞卵子においては不十分である結果と推定されている(Yanagimachi, 1981)。以上のようなことから、卵子の成熟は核の成熟と細胞質の成熟に分けて考えられている。卵子の成熟に関して多くの検討が加えられてきたが、その詳細については不明な点が多い。特に卵子細胞質が生産すると見なされている受精に関与する生理活性物質の化学的本態は明らかにされていない。本研究ではハムスター卵胞卵子の成熟、特に受精後の精子頭部膨化および雄性前核形成能に及ぼすA<sub>2</sub>C、dithiothreitol(DTT)、Ca-ionophore A23187(A23187)処理の影響について検討を加えた。

方法：成熟した雌のgolden hamsterを用いた。性周期のDay 1にPMSG 30 IUを腹腔内に注射し、その52時間後にhCG 30 IUを投与した。hCG投与後0から15時間の各時間に卵巣を取り出して卵胞卵子を回収した。回収した卵胞卵子は鏡検した後一部は細い針を用いて透明帯を取り除いてzona-freeとした。Zona-intactおよびzona-free卵胞卵子を各薬物を添加した成熟用培養液のドロップ中に加え、これをミネラルオイルで覆って培養した。培養は卵胞卵子の採取時間から排卵するまでの相当時間(13時間)まで行った。培養終了後新鮮な培養液で洗浄してIVFに供した。IVFは次のように行った。成熟した雄の精巣上体尾部精子をmTALP培養液中でcapacitation誘起のために37℃、5%CO<sub>2</sub>-airの条件下で4時間培養を行い、この精子を成熟培養した卵胞卵子を含むmTALP液に加え

て媒精を行った。媒精後の卵子の観察はzona-intactでは5時間、zona-free卵子のでは3時間目に行った。尚、controlとしてPMSG-hCG処理ハムスター卵胞卵子を標準成熟培養液で培養したものを用いて実験を行った。受精の判定において受精あるいは精子頭部の発達段階基準として、1)卵子細胞質への接着、2)卵子細胞質内への侵入、3)精子頭部の膨化、4)雄性前核形成の4段階とした。

結果: Gonadotropin処理したハムスターの卵胞卵子における雄性前核形成能をIVFを行って調べた。その結果、zona-intact卵子ではhCG投与後0-9時間において雄性前核形成は見られず、ほとんどが膨化したのみであった。初めて前核形成が見られたのはhCG投与後10時間のものではあった。一方、zona-free卵子において雄性前核形成はhCG投与後9時間の卵子35.7%に初めて観察された。しかし、精子核の発達段階は膨化のステージにとどまった。次に、hCG投与後1-7時間の卵子にA<sub>2</sub>C, DTTおよびA23187感作させ卵胞卵子の雄性前核形成能におよぼす影響について調べた。A<sub>2</sub>C(0.1, 0.5, 1.0  $\mu$ g/ml)の存在下で培養された卵子では何れのグループにおいても雄性前核形成は認められなかった。僅かに精子頭部の膨化が認められたのに過ぎない。明らかに、controlの卵子に比べて精子頭部の膨化および前核形成能は劣った。また、DTT(50, 100, 150  $\mu$ g/ml)処理卵子においてhCG投与後3, 5, および7時間のものでは前核形成は認められなかった。一方、A23187処理を行った卵胞卵子においては処理時間によって結果が異なった。即ち10分間処理を行ってから標準培養液に戻して培養を行ったhCG投与5および7時間の卵子では雄性前核形成が認められ、controlの卵子のそれに比べて明らかに前核形成能の発現が促進された。

以上の結果から、A23187は体外で成熟培養を行ったハムスター卵胞卵子の受精後の精子頭部膨化および雄性前核形成に効果的であることが認められた。

#### 文献

Thibault, C.G. (1972) Final stage of mammalian oocyte maturation. In Oogenesis, pp 397-418, Park Press, Baltimore.

Yanagimachi, R. (1981) Mechanisms of fertilization in mammals. In Fertilization and Embryonic Development in Vitro. pp 81-182

# ウサギ精子の卵子への囲卵腔内注入 による受精について

## Fertilization of rabbit eggs by sperm injection into the perivitelline space

横田秀夫・赤星波・佐藤嘉兵

Hideo YOKOTA, Nami AKABOSI, Kahei SATO

日本大学農獣医学部動物細胞学教室

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

目的：精子を卵子内に注入することによって受精が成立することが知られている。精子注入には囲卵腔と細胞質とに注入する方法がある。しかし、卵子囲卵腔内に精子を注入した場合、受精率は極めて低い、そこで、本実験では、先体反応を誘起した不動化精子を、細胞質と囲卵腔の各部位に注入し、注入部位と注入法による受精率、発生率について検討を行なった。

方法：実験には日本白色種の成熟兔を用いた。過排卵誘起はPMSG75IUを耳静脈より投与し、その72時間後にhCG100IUを投与し、12-14時間後、卵管灌流法により採卵した。排卵卵子上に付着している卵丘細胞はヒアルロニターゼを用いて除去し、マイクロインジェクションまで37℃、5%CO<sub>2</sub>、95%Airの条件下で培養を行った。精子は射出精子を採精後1/10BSA m-TALPで2回洗浄を行い、swim up後1時間の前培養を行った。その後、先体反応を誘起するために50 μg/mlのLysophosphatidyl-Choline(LPC)で10-15分間感作させた後、m-TALP培養液で2回洗浄を行なった。その後swim upした精子に急冷処理を行い運動性を止めたものを圧電素子の急速変形を利用したマイクロマニピレーターを用いて、卵子に注入した。注入法は以下の方法で行った。1. 卵子細胞質に直接注入を行ったもの2. 卵子細胞質膜に1回接触して刺激を与えた後に囲卵腔に注入を行ったもの3. 卵子細胞膜に触れることなく囲卵腔内に注入したものの3法で行った。その後、注入胚を37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で培養し、24時間毎に培養液を交換し、観察した。

結果：受精率は、細胞質に注入したものでは42.0%、囲卵腔に注入し刺激を与えたものでは56.9%、囲卵腔に注入し刺激を与えなかったものでは3.1%であり、発生率はそれぞれ28.0%、56.1%、3.1%であった。

Fertilization of rabbit ova by sperm injection  
into the eggs

Injection manner	No. of ova injected	No. of ova survived(%)	No. of ova fertilized(%)	No. of ova developed(%)
* 1	50	50 (100.0)	21 (42.0)	14 (28.0)
* 2	40	32 (80.0)	1 (3.1)	1 (3.1)
* 3	51	50 (98.0)	29 (56.9)	29 (56.9)
* 4	22	22 (100.0)	0 (100.0)	0 (100.0)

\* 1 Sperm injected into the ooplasm

\* 2 Sperm were injected into the perivitelline space  
without stimulation to the cell emembrane.

\* 3 Sperm were injected into the perivitelline space with  
stimulation to the cell emembrane.

\* 4 Insertion of injection pipette whithout sperm  
into the ooplasm

考察：以上の事から不動化精子を囲卵腔に入れただけでは受精が殆ど起きないことが解る。  
しかし、注入時に卵子細胞膜をマイクロピペットで刺激すると受精が起こることから細胞  
膜になんらかの活性化を促すことにより不動化精子と卵子細胞膜との融合が効率的に起こ  
るのではないかと考えられる。

主要文献

1. Lacham, O., Trounson, A., Holden, C., Mann, J., and Sathananthan, H. (1989)

Fertilization and development of mouse eggs injected under the zona pellucida  
with single spermatozoa treated to induce the acrosome reaction.

J. Gamete Research 23:233-243

2. Corol L. Keefer, (1989) Fertilization by sperm injection in the Rabbit.

J. Gamete Research 22:59-69

豚屠場卵巣卵胞内卵子の無血清培地に  
おける成熟について  
— 2. インスリン添加の影響 —

In vitro maturation of porcine follicular oocytes cultured in serum free medium  
— 2 Effect of Insulin on oocytes maturation —

山内伸彦、平田昌弘、菅原七郎、正木淳二

Nobuhiko YAMAUCHI, Masahiro HIRATA, Shichirou SUGAWARA, Junji MASAKI

東北大学農学部畜産学科家畜繁殖学教室

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

＜目的＞インスリンは血清成分中にも含まれており、細胞のグルコースやアミノ酸の取込を促進し、ほとんどすべての培養細胞の増殖に不可欠である。また、外因性のインスリンが豚の卵胞の発育に影響することや、体外において顆粒層細胞のステロイド合成を促進することが報告されており、卵子に対する直接的な作用も無視できない。本研究では、先に演者らが報告した(第78回家畜繁殖学会)無血清培地Medium-Ⅱを用い、豚卵子の体外成熟に及ぼすインスリンの影響を検討することを目的とした。すなわち、培養時間を追って第二成熟分裂中期に達した卵子を調べ、核の成熟に対するインスリンの影響を検討した。また、卵細胞質に対するインスリンの影響を調べるため、媒精後の雄性前核形成および発生率を調べた。

＜方法＞卵胞内卵子は仙台市食肉屠場で採取した卵巣の、直径1～6mmの卵胞より吸引採取した。成熟培地には、対照区としてTCM199+10%FCS(199区)及びMedium-Ⅱ(M-Ⅱ区)を用い、Medium-Ⅱにインスリン5 $\mu$ g/mlを添加したものをインスリン添加区とした。それぞれの成熟培地には、PMSG 10IU/ml、hCG 10IU/ml、E<sub>2</sub> 1 $\mu$ g/mlを添加した。媒精には射出精液濃厚部を用い、pH7.8に調整したTCM199+10%FCSで2時間前培養した。受精培地にはTCM199+10%FCSに2mM Caffeinを加えたものを用い、媒精時の精子濃度は $2 \times 10^6$ とし、8時間後に発生培

地mBMC-IIに移した。実験1;成熟培養時間を30時間、36時間、42時間、48時間としそれぞれの培養時間後固定・染色し、培養時間と核の成熟の関係を調べた。実験2;成熟培養時間を42時間とし、媒精後11時間で固定・染色して雄性前核形成を調べた。実験3;成熟培養時間を42時間とし、媒精後48時間に均等2細胞卵および4細胞卵を調べ、発生率を検討した。得られたデータ間の有意差は $\chi^2$ 検定を用い、危険率5%で判定した。

＜結果＞実験1;インスリン添加区では成熟培養30時間で成熟率が199区、Medium-II区に比べ有意に高い値を示した。36時間ではMedium-II区との間に有意差が見られた。42時間、48時間では他の区と有意な差は見られなかった(Table)。実験2;インスリン添加区の雄性前核形成は1.8%であり、199区(33.9%)およびMedium-II区(11.8%)に比べ有意に低かった。実験3;発生率は199区で27.3%、Medium-II区で17.8%、インスリン添加区で18.7%と、対照区との間に有意差は見られなかった。

Table. Effect of Insulin on nuclear maturation of pig oocytes  
cultured in vitro at various incubation time

Culture medium	No. of oocytes reaching Metaphase-II/No. of oocytes examined (%)			
	Incubation time (hours)			
	30	36	42	48
199	46/171(26.9) <sup>a</sup>	130/194(67.0) <sup>a</sup>	116/160(72.5) <sup>a</sup>	152/183(83.1) <sup>a</sup>
Medium-II	69/174(39.7) <sup>b</sup>	97/178(54.5) <sup>b</sup>	110/182(60.4) <sup>b</sup>	123/155(79.4) <sup>a</sup>
+Insulin*	126/224(56.3) <sup>c</sup>	141/192(73.4) <sup>a</sup>	119/174(68.4) <sup>a,b</sup>	135/170(79.4) <sup>a</sup>

<sup>a, b, c</sup> In each incubation time, values without a common superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ).

\* Medium-II + Insulin 5  $\mu$ g/ml

＜考察＞卵胞内卵子を体外で成熟させ体外受精により正常に発生させるには、第二成熟分裂中期に達する核の成熟と同様に卵細胞質の成熟が必要である。体外での卵細胞質の成熟には、卵胞細胞の存在が必要であることが報告されている。本研究の結果、インスリンはあきらかに核の成熟を促進する作用が認められた。Medium-IIにおいて、卵胞細胞の膨化が見られなかったことを考えると、インスリンが卵子に対して直接的に作用したことが考えられる。しかし、媒精後の雄性前核形成や発生率が199区に比べて低かったことより、インスリンの卵細胞質の成熟に対する効果は見られなかった。

# 牛卵胞液および初期胚の線溶活性について

## Fibrinolytic Activity of Bovine Follicular Fluid and the Early Bovine Embryo

堀内俊孝・山田 學・建本秀樹

Toshitaka HORIUCHI, Manabu YAMADA, Hideki TATEMOTO

広島県立大学生物資源学部生物資源開発学科

Department of Bioresources, Hiroshima Prefectural University

【目的】プラスミノージェンアクチベーター(PA)は、酵素前駆体であるプラスミノージェンを活性化酵素であるプラスミンに転換させ、フィブリン分解作用で線溶活性を示す。線溶は、血液凝固塊の溶解のみならず、細胞移動、腫瘍の転移、組織の破壊や構築などの現象に関係している<sup>1)</sup>。また、生殖細胞系においては、精子形成時の細胞移動、排卵や着床などに関与していると言われていた<sup>1)</sup>。

初期胚におけるPAの存在はウシでは拡張胚盤胞期から脱出中胚盤胞期<sup>2)</sup>、ヒツジでは胚盤胞期から脱出胚盤胞期<sup>3)</sup>において、培養液中へのPAの放出とプラスミノージェン添加培養液でのプラスミンの生産によって確認された。また、培養液中へのプラスミノージェン添加によって胚の透明帯からの脱出率(マウス<sup>4)</sup>とヒツジ<sup>3)</sup>)や透明帯の溶解性が高められた(ヒツジ<sup>3)</sup>)。そして、子宮内液にプラスミノージェンがあること<sup>5)</sup>から胚の透明帯脱出過程におけるPAによる制御機序が考えられている。

最近、牛体外受精技術の発展に伴い、初期発育過程に従って牛胚の生理を研究することが容易になってきた。そのため、本研究は、牛卵胞液を含め、牛胚の発育時期に従い1細胞期から脱出胚盤胞期の卵細胞におけるPA活性の検出を行うと共に培養液中に放出されたPAの特徴を明らかにすることを目的とした。

【方法】屠場より得た牛卵巢の卵胞(直径1～5mm)から卵胞液と卵胞卵を採取した。卵丘細胞層が密に覆われた卵胞卵のみを選び、10%CS加Hepes-M199培地で空気下5%CO<sub>2</sub>、38.5℃の条件にて22～24時間成熟培養した。次いで、BSA-free 10mMカフェイン加Hepes-mTyrode液で洗浄した凍結牛精子を媒精し、5mMカフェインと10μg/mlヘパリン加Hepes-mTyrode液中で成熟卵を体外受精した。体外受精由来の卵子は、卵丘細胞層との共培養法によって1細胞期から胚盤胞期まで体外発生させた。PA分析用の培養液は、共培養法を用いず10%CS加Hepes-M199培地のみ(50μl)で約10個の胚を24時間培養し発生を記録したものとした。卵胞液と培養液中の線溶因子の検索は、Lysine-agaroseによるアフニティクロマトグラフィを用いた。卵子などの細胞についてのPA活性の測定はフィブリンスライド法、培養

液などの水溶成分の測定はフィブリン平板法で行った。培養液中に放出されたPAのZymographyは、Granelli-Piperno & Reich method (1978)に従って行った。

【結果】①卵胞液全体としては強力な抗プラスミン作用を示し、Lysine-agaroseへの親和性物質のうち、1M NaClで溶出した画分は抗ウロキナーゼ活性が強かった。0.1M酢酸で溶出した画分に弱いPA活性が認められた。

②未成熟卵胞卵は卵丘細胞が強いタンパク分解作用を示し、卵細胞のPA活性は検出できなかった。

③2細胞期から胚盤胞期までの卵細胞のPAの出現はフィブリンスライド法ではほとんどなかった。拡張胚盤胞期から急激にPAが放出され、脱出胚盤胞期においてもPA活性は認められた。

④拡張胚盤胞胚によって培養液中に放出されたPA活性は、4～8細胞期胚によるPA活性よりも有意に( $P<0.05$ )高かった(フィブリン平板法)。

⑤培養液のZymographyによって、拡張胚盤胞胚の放出したウシPAがヒトtPA(74K)に近い78Kの分子量であることを確認した。一方、対照区では(10%CS加M199)PA活性は検出されなかった。

【考察】以上から、未成熟卵胞中では抗プラスミン作用が支配的であり、受精卵では拡張胚盤胞期からPA活性が急激に増加すること、そして 培養液中にもPAが放出され、その分子量は約78Kであることを明らかにした。拡張胚盤胞期での活性の増加は、胚の透明帯からの脱出(ハッチング)過程へのPAの関与が考えられ、マウス胚では発生培地へのプラスミンやプラスミノゲンの添加によって透明帯からの脱出率が増加すること<sup>1)</sup>、ウシ胚ではプラスミノゲンの添加で脱出を開始する時期が早くなること<sup>2)</sup>が報告されている。しかし、胚の透明帯からの脱出の機序は不明なことも多くPAの意義についてもさらに詳細な検討が必要である。また、体外受精由来のウシ拡張胚盤胞胚には透明帯から脱出できないものもあり、発生培地へのPAなどの添加の効果は今後の検討課題である。

#### 【主要文献】

- 1) Hsueh AJW, Liu YX, Cajander SB and Ny T: Molecular mechanisms in the hormonal regulation of plasminogen activator activity in ovarian granulosa cells and cumulus-oocyte complexes. In Meiotic Inhibition: Molecular Control of Meiosis. Alan R Liss Inc, PP 227-257 (1988)
- 2) Menino Jr AM and Williams JS: Activation of plasminogen by the bovine embryo. Biol Reprod 36:1289-1295 (1987)
- 3) Menino Jr AM, Dyk AR, Gardiner CS, Grobner MA, Kaaekuahiwi MA and Williams JS: The effects of plasminogen on in vitro ovine embryo development. Biol Reprod 36: 1289-1295 (1989)
- 4) Menino Jr AM and O'Claray JL: Enhancement of hatching and trophoblastic outgrowth by mouse embryos cultured in Whitten's medium containing plasma and plasminogen. J Reprod Fert 77:159-167 (1986)
- 5) Fazleas AT, Geisert RD, Bazer FW and Roberts RM: Relationship between release of plasminogen activator and estrogen by blastocysts and secretion of plasmin inhibitor by uterine endometrium in the pregnant pig. Biol Reprod 29:225-238 (1983)

# ヒト卵巣における superoxide dismutase の発現 —卵および卵胞成熟との関連の観点から—

Immunohistochemical expression of superoxide dismutase in human ovarian function

塩谷雅英・野田洋一・成木勝彦・馬岡 陽・森 崇英

Masahide SHIOTANI, Yoichi NODA, Katsuhiko NARIMOTO, Yoh UMAOKA, Takahide MORI

京都大学医学部婦人科学産科学教室

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

**目的：**我々は、これまでに活性酸素の消去酵素であるsuperoxide dismutase(SOD)を培養系に添加することにより、マウス初期胚発育が著しく促進することを明らかにし<sup>1)</sup>、初期胚培養において酸化ストレスから胚を保護することの重要性を指摘してきた。このSODは、生体内において活性酸素によって惹起される細胞・組織障害の防御因子として働くのみならず、感染・炎症の防御や細胞の分化にも関与することが知られている。しかし、ヒト生殖過程における役割については十分に解明されていない。そこで、我々は、女性生殖器官におけるSODの生理的役割を、特に卵および卵胞成熟との関連の観点から、明らかにすることを目的とし、ヒト卵巣におけるSOD活性の各月経周期における局在の変動を免疫組織化学的に検討した。また、ヒト体外受精施行時に得られた成熟卵胞の卵胞液中のSOD濃度をELISA法にて測定した。

**方法：**子宮全摘兼付属器摘除術で得られた子宮内膜にてNoyes の分類に基づき組織学的に月経周期を確定した後、卵巣を免疫組織標本に供した。また、卵巣茎捻転にて摘除された卵胞膜腫および妊娠8週の卵巣も免疫組織標本に供した。recombinant human CuZn型SOD (r-hSOD)を家兎に免疫し、得られた抗血清から精製した免疫グロブリンを、第一抗体として免疫組織染色(ABC法)に用いた。発色基質としてはamino-ethyl-carbazolを用いた。ヒト体外受精の卵回収の際に得られた成熟卵胞の卵胞液は、溶血していないものに限り、ELISA法にてSOD濃度を、colorimetric法にて蛋白濃度を測定した。

**結果：**胚芽上皮、白膜、外卵胞膜の各細胞層には月経周期を通じて殆どSODの局在はみられなかった。卵胞腔形成前に弱い活性が認められるのみであった内卵胞膜細胞は卵胞腔形成開始と共に強い活性を示したが、顆粒膜細胞には殆ど局在は認められなかった。卵胞発育過程で認められたSODの発現傾向は黄体形成過程においても見られ、やはり顆粒膜黄体細胞に比べ卵胞膜黄体細胞に強い活性が認められた。また、原始卵胞の卵母細胞および卵胞膜腫にも強いSOD活性が認められた。溶血が認められなかった成熟卵胞の卵胞液中SOD濃度は $7.77 \pm 3$ 。

62 ng/mlであり、これを蛋白当りに換算すると $0.22 \pm 0.19$  ng/mg of proteinであった。

**考察：**本研究により、我々はヒト卵巣におけるSODの局在を初めて明らかにした。卵胞発育過程において内卵胞膜細胞に強いSOD活性が認められたことは、同細胞のSODが内卵胞膜細胞層に密に存在する毛細血管網から惹起される活性酸素からの周辺組織の障害の防御に重要な役割を担っていることを示唆すると共に、blood-follicular barrierとして活性酸素の卵胞腔への拡散防御、即ち、卵胞内における活性酸素からの卵の保護に重要な役割を担っている可能性をも示唆するものとする。本研究により、成熟卵胞の卵胞液中に血清とほぼ同程度のSOD濃度が検出されたこと、および原始卵胞の卵母細胞に強いSODの局在が認められたことは、卵胞内でも活性酸素からの卵の防御機構の存在することを裏付けるものとする。我々は、低酸素下<sup>2)</sup>・SOD添加<sup>3)</sup>・thioredoxin添加<sup>4)</sup>胚培養により各種は乳類初期胚発育が著名に促進されることを明かにし、初期胚培養において酸化ストレスからの胚の保護の重要性を指摘してきたが、受精前の卵の発育過程においても酸化ストレスからの胚の保護が重要であることが示唆される。また、卵胞成熟過程における内卵胞膜細胞、顆粒膜・卵胞膜黄体細胞、および卵胞膜腫にSODの局在が認められたことは、上記細胞がいずれもsteroid産生細胞であること、および、progesteron形成にはNADHがNAD<sup>+</sup>に酸化される必要があり、この過程が活性アスコルビン酸によって著名に促進されることから、SODが特に $\Delta 4$  pathwayを介してのsteroidの産生に深く関与していることを示唆するものとする。卵巣の他に、我々は、これまでにヒト子宮<sup>5)</sup>・卵管<sup>6)</sup>におけるSODの局在を検討し、以下の3点を明らかにしてきた。①卵管では、月経全周期を通じて間質細胞に比べ上皮細胞に強いSOD活性が認められ、その活性は纖毛細胞で強い傾向を示すこと。②子宮では月経全周期を通じて粘膜・腺上皮細胞に強い活性が認められ、特に、分泌期前期～中期の腺上皮細胞の核上・核下空胞や腺腔内物質にも活性が観察されること。そして、間質細胞は偽脱落膜化と共に強い活性を示すようになり、妊娠脱落膜細胞においてもその活性は著明であること。③子宮頸部上皮の予備細胞に強い活性が認められること。以上の子宮・卵管におけるSODの局在およびその変動から、①SODは女性生殖器において感染・炎症の際に発生する $O_2^-$ による組織障害の防御因子として働いていること、②SODは卵管・子宮内で酸化ストレスからの胚の保護に重要な役割を担っていること、③子宮内膜においてはprogesteroneがSODの発現に関与し、SODは臨床的に脱落膜化の指標となりうること、更に、④子宮頸部の予備細胞に強いSOD活性が認められたことより、SODが細胞の分化にも関与していること、以上の可能性が強く示唆されている。以上、女性生殖器におけるSODの発現の部位、程度、或は、時期などは複雑な様相を呈しており、今後更に検討を加えていく予定である。なお、本研究は文部省重点領域研究(生殖系列: No.01640004, No.02222104) および科学研究費一般研究B (No.01480391) により補助を受けた。

**文献：**1) Noda, Y. et al.: Acta Obst. Gynaec. Jpn., 41:751, 1989.

2) Quinn, P. et al.: J. Exp. Zool., 206:73, 1978.

3) Noda, Y. et al.: Molec. Reprod. Develop., in press 1991.

4) Goto, Y. et al.: Biol. Reprod., under submitting.

5) Narimoto, K. et al.: Acta Histochem. Cytochem., 23:487, 1990.

6) Narimoto, K. et al.: Acta Histochem. Cytochem., 24:85, 1991.

# 体外受精—胚移植 (1990)

## Results of IVF-ET (1990)

小林善宗・本田育子・井上正人・宗 完子・藤井明和

Yoshimune KOBAYASHI, Ikuko HONDA, Masato INOUE,

Hiroko SOU, 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.

目的方法：臨床不妊治療として IVF-ET はすでに確立した観があるが、その成績向上の努力がなお必要である。当科の1990年度の IVF-ET 成績を分析し、1988—89年度の成績と比較し最近の傾向を検討した<sup>1) 2)</sup>。

結果：1990年度の成績を述べる。対象の年令・不妊期間に変化はなく（表1）、件数は382回と増加したが、臨床的妊娠数は99で、対 ET 妊娠率は25.9%と低下した（表2）。過排卵法別では GnRHa-HMG-hCG が大半を占め、その妊娠率は27.7%とやや低下した。CC-HMG-hCG では著明な妊娠率の低下がみられた（表3）。受精に関しては変化がなかった（表4）。移植では IVF 後3日目移植（8～16細胞期胚移植）を導入し38.3%の妊娠率がえられたものの、1日目移植（前核期移植）で著明に妊娠率が低下した（表5）。主な不妊原因別妊娠率では、その傾向に変化はなかった

	1988年度	1989年度	1990年度
表1. 対 象			
患者数 (ET 周期)	157名 (175)	256名 (319)	299名 (382)
原発性不妊	79名	128名	152名
続発性不妊	78名	128名	147名
平均年令	33.6±3.6才	33.8±3.9才	33.9±3.6才
平均不妊期間	8.7±3.4年	8.4±3.7年	8.3±3.5年
			(M.±S.D.)

表2. IVF-ET の成績			
妊娠患者数	48名	99名	95名
妊 娠 数	48	104	99
対患者妊娠率	30.6% (48/157)	38.7% (99/256)	31.8% (95/299)
原発性不妊	35.4% (28/79)	34.4% (44/128)	28.3% (43/152)
続発性不妊	25.6% (20/78)	43.0% (55/128)	35.4% (52/147)
対周期妊娠率	27.4% (48/175)	32.6% (104/319)	25.9% (99/382)

表3. 過排卵法別妊娠率 (対周期)			
CC-hCG	(0)	0% (0/1)	(0)
CC-HMG-hCG	31.3% (10/32)	41.4% (12/29)	6.9% (2/29)
HMG-hCG	50.0% (7/14)	0% (0/2)	0% (0/3)
GnRHa-HMG-hCG	24.0% (31/129)	31.8% (92/289)	27.7% (97/350)

CC:clomiphene  
GnRHa:GnRHagonist

表4. 採取卵子数、受精卵数、胚数			
採取卵子数	7.4±4.3	7.8±4.9	7.8±4.2
採取成熟卵子数	5.6±3.6	6.9±3.7	7.4±4.0
受精卵数	5.9±3.8	5.9±3.4	6.2±3.7

が、全体にやや低下した(表6, 7)。年齢別妊娠率では、年齢の増加にともない妊娠率が低下する傾向に変わりにはなかった(表8)。妊娠の予後は、妊娠12週未満の初期流産率に差はなかったが、その後の継続率は上昇し(表9)、結果として予想分娩率は上昇傾向を示した(表10)。

考察: 1990年度 IVF-ET もすべて外来ペースで行ったが、妊娠率は低下したが予想分娩率は上昇傾向にあり、12週以後の流産減少がその理由であろう。さらに多胎妊娠率の上昇(36.4%)が継続率の上昇に結びついたものと考えられる<sup>3)</sup>。新たに導入した3日目移植(8~16細胞期移植)でも良好な妊娠がえられ、移植の幅広い選択の可能性が示唆され、外来ペースの IVF-ET にとって極めて有用といえよう。その他に、当科における新しい治療の試みとして、免疫治療や子宮動脈血流改善がなされており、子宮内着床環境改善の観点から IVF-ET 治療成績向上が期待される<sup>4)</sup>。

## 文献

- 1) 小林善宗, 他(1990), 体外受精-胚移植(1988-1989). 哺乳卵研誌 7: 51
- 2) 小林善宗, 他(1991), 体外受精-胚移植の成績(1988-1989年度). 日本受精着床学会雑誌 8: (in press)
- 3) 小林善宗, 他(1991), 経腔超音波走査法による体外受精-胚移植妊卵消失率の検討. 日超医論文集 58: (in press)
- 4) 田村かおり, 他(1991), 子宮動脈血流波形分析後の体外受精-胚移植(IVF-ET)成績. 日超医論文集 58: (in press)

正常受精卵数	4.1±3.0	4.3±2.9	4.7±3.1
胚数	4.7±3.2	5.1±3.1	5.4±3.5
正常胚数	2.3±1.7	2.7±2.3	2.7±2.4

(M.±S.D.)

表5. 移植法別妊娠率(対周期)

1日目移植(前核期)	32.2% (29/90)	29.4% (68/231)	13.9% (20/144)
2日目移植(2-4細胞期)	22.6% (19/84)	40.9% (36/88)	31.9% (61/191)
前核期+胚(2-4細胞期)	0% (0/1)	(0)	(0)
3日目移植(8-16細胞期)	(0)	(0)	38.3% (18/47)

表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)	33.3% (53/159)
子宮内膜症	42.6% (20/47)	35.1% (27/77)	31.1% (28/90)
卵管内精子輸送障害*	16.7% (1/6)	42.1% (8/19)	31.8% (7/22)
原因不明	30.8% (4/13)	40.9% (9/22)	25.0% (7/28)

\*免疫性不妊を含む

表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)	27.1% (55/203)
子宮内膜症	40.0% (20/50)	31.5% (28/89)	26.4% (29/110)
卵管内精子輸送障害*	16.7% (1/6)	40.9% (9/22)	25.9% (7/27)
原因不明	28.6% (4/14)	34.6% (9/26)	19.0% (8/42)

\*免疫性不妊を含む

表8. 年齢別妊娠率(対周期)

~24才	0	33.3% (1/3)	(0)
25~29才	40.7% (11/27)	41.5% (17/41)	30.2% (16/53)
30~34才	24.1% (19/79)	37.6% (53/141)	28.7% (45/157)
35~39才	28.1% (18/64)	27.4% (32/117)	25.5% (37/145)
40~才	0% (0/5)	5.9% (1/17)	3.7% (1/27)

表9. 妊娠の予後(1991年2月現在)

妊娠	48	104	99
胎児心拍確認	36 (75.0%)	66* (63.5%)	74* (74.7%)
初期流産	9 (18.8%)	27 (26.0%)	24 (24.2%)
子宮外妊娠	3 (6.3%)	12* (11.5%)	9* (9.1%)
流産総数	17 (35.4%)	38 (36.5%)	25 (25.3%)
多胎	12 (25.0%)	20* (19.2%)	36* (36.4%)
分娩	28 (58.3%)	55* (52.9%)	35 (67.7%)
ongoing			32*
出生児	39	77	59
新生児死亡	1 (胎児水腫)	2 (胎児水腫) 極小未熟児	0
健児	38	75	59

\*内外同時妊娠 計3例を含む

表10. 分娩率

対周期	16.0% (28/175)	17.2% (55/319)	17.5% (67/382)*
対患者	17.8% (28/157)	21.5% (55/256)	22.4% (67/299)*

\* 予想値

# 哺乳動物卵子学会会則

## 第1章 総 則

(名 称)

第1条 本会は、哺乳動物卵子学会と称する。

(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。

## 第2章 目的および事業

(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) 学術集会の開催
- (2) 学会誌の発行
- (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

## 第3章 会 員

(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、所定の入会申込書に必要事項を記入し、入会金および年会費を添えて事務局に申し込むものとする。

(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

#### 第4章 役員

(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 25名以内  
監 事 2名  
評議会 若干名  
幹 事 若干名

第10条 会長は、本会を代表し、会務を総括する。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. 評議員は、評議員会を組織し、重要事項を審議する。
5. 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) 評議員は理事会の推薦により、総会の議を経て選出される。
- (4) 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。

#### 第5章 会議

(理事会)

第13条 理事会は、年1回会長が招集する。また、会長が必要と認めた時は、臨時に理事会を招集することができる。

2. 理事会は定数の $\frac{1}{2}$ 以上をもって成立し、決議は、出席者の過半数をもって決する。

(評議会)

第14条 評議員会は会長が招集し、評議員の $\frac{1}{2}$ 以上の者が出席しなければ、議事を開き決議することができない。但し、委任状

をもって出席とみなす。

2. 評議員会の議事は、出席評議員数の過半数をもって決する。
3. 評議員会の議長は、会長とする。

(総 会)

第15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。但し、委任状をもって出席とみなす。

第16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

第7章 学術集会

(学会長選任)

第17条 学会長は理事会にて選出され、評議員会、総会により決定される。また、学会長の任期は1年とする。

(学術集会の運営)

第18条 学術講演会は学会長が主催する。

第7章 会 務

(会 計)

第17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、学会への移行に伴い平成3年4月1日から施行する。

## 哺乳動物卵子学会誌投稿規定

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

### 雑誌の場合

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

### 単行本の場合

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

〒252

神奈川県藤沢市亀井野 1866

日本大学農獣医学部獣医生理学教室内

TEL 0466-81-6241 内線 332

哺乳動物卵子学会編集委員会

## 編 集 後 記

4年連続の暖冬も今季は平年の気温となり桜の開花も平年通りのようであります  
本会誌も学会に移行して最初の哺乳動物卵子学会誌となります。なお、巻号は研究会誌を踏襲するとのことから8巻1号となります。また、本誌も学術会議に登録されましたことから投稿論文も多くなり、今回は、原著論文7編と第32回哺乳動物卵子学会の特別講演および一般演題33題の要旨を掲載いたしました。

現在、8巻2号の掲載論文を受付けておりますのでご投稿下さいますよう

(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

### 哺乳動物卵子学会誌 Journal of Mammalian Ova Research

第 8 巻 第 1 号

Vol. 8

No. 1

平成3年3月25日 印刷

平成3年4月1日 発行

( 会 員 頒 布 )

発行者 哺乳動物卵子学会  
代 表 豊 田 裕

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

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

## 公開講演会成功裡に開催さる

平成3年2月 日本学術会議広報委員会

日本学術会議は、例年どおり、平成2年度においても、主催の公開講演会を3回開催しました。今回の日本学術会議だよりでは、その講演会に加えて、本会議の国際的活動や最近公表された「委員会報告」などについてお知らせします。

## 平成2年度日本学術会議主催公開講演会

本会議は、本会議の会員が、学術の成果について広く市民と語り合う機会として、時宜にかなったテーマを選定して、毎年、公開講演会を開催している。本年度は、次の3回の講演会を開催したが、いずれも成功裡に終了した。

## I 公開講演会「高度技術と市民生活」

標記講演会は、去る平成2年10月13日（土）13時30分～17時に、兵庫県加東郡社町の社町福祉センターホールで、約250人の聴講者を得て開催された。各演題と講師は、①「高齢化社会と高度技術」原沢道美（第7部会員、東京通信病院院長）、②「消費生活と高度技術」正田彬（第2部会員、上智大学教授）、③「地域振興と人間主導型高度技術」竹内啓（第3部会員、東京大学教授）であった。

## II 公開講演会「資源エネルギーと地球環境に関する展望」

標記講演会は、去る平成2年10月30日（火）13時～17時に、本会議講堂で、約330人の聴講者を得て開催された。各演題と講師は、①「人間と環境」大島康行（第4部会員、早稲田大学教授）、②「エネルギーと環境」石井吉徳（第5部会員、東京大学教授）、③「エネルギーと経済問題」則武保夫（第3部会員、立正大学教授）、④「エネルギーとCO<sub>2</sub>対策」上之園親佐（第5部会員、摂南大学教授）であった。

## III 公開講演会「人間は21世紀を生きられるか」

標記講演会は、去る平成3年2月19日（火）13時30分～17時に、本会議講堂で約200人の聴講者を得て開催された。各演題と講師は、①「科学・技術・政策」杉本大一郎（第4部会員、東京大学教授）、②「科学と人間－生存のための条件づくり」下山瑛二（第2部会員、大東文化大学教授）、③「人間の適応能力とリスク」土屋健三郎（第7部会員、産業医科大学長）であった。

いずれの講演会も、時期にあった、関心の呼ぶ企画であったため、外くの聴講者が来場する盛会となり、また、各講師の講演後の質疑応答では、聴講者から活発な質問や意見の開陳がなされ、まさに市民との対話の感があり、極めて有意義であった。

なお、これらの講演会については、後日、「日学双書」として、（財）日本学術協力財団から出版される予定である。

## 平成2年度二国間学術交流事業

本会議では、二国間学術交流事業として、毎年2つの代表団を外国に派遣し、各訪問国の科学者等と学術上の諸問題について意見交換を行って、相互理解の促進を図る事業を行っている。

この事業は、昭和58年度から実施されており、これまで、アメリカ、マレーシア、西ドイツ、インドネシア、スウェーデン、タイ、フランス、大韓民国、連合王国、シンガポール、チェコスロヴァキア、ポーランド、カナダ、イタリア、スイス及びインドの16か国に代表団を派遣してきた。

平成2年度には、①9月11日から22日まで、中華人民共和国へ、渡辺格副会長以下4名の会員等から成る代表団を、②9月17日から27日まで、オーストラリア及びニュー・ジーランドへ、大石泰彦副会長以下5名の会員等から成る代表団をそれぞれ派遣した。

中華人民共和国派遣代表団は、中国科学院、中国社会科学院、中国医学科学院、北京大学、西安交通大学、復旦大学など約20機関を訪問し、中華人民共和国の学術や今後の交流の推進策などについて会談、意見交換を行った。中華人民共和国側からは、すでに、日本の多くの大学、研究機関と交流を行っているが、さらに交流を拡大したいとの期待が表明され、両国間の今後のより積極的な交流・協力をめぐる活発な意見の交換が行われた。

オーストラリア及びニュー・ジーランド派遣代表団は、オーストラリアでは、オーストラリア科学アカデミー、オーストラリア国立大学、シドニー大学、連邦科学・産業研究機構など、ニュー・ジーランドでは、ニュー・ジーランド王立協会、マッセイ大学、ヴィクトリア大学、科学技術研究機構など、両国合わせて20を越える諸機関を訪問し、それぞれの国の学術、今後の交流の可能性などについて、会談、意見交換を行った。特に、両国では近年、国家、国民に実際に役立つ技術の発展を目指した科学技術の大きな改革が進められており、これらの問題等について、熱心に意見の交換が行われた。

今回の成果は、代表団派遣時だけのものではなく、今後のわが国の学術の国際交流・協力の進展に大きく役立つものと期待される。

## 平成3年(1991年)度共同主催国際会議

本会議は、国際的な活活の一環として、毎年、日本で開催される学術関係国際会議を関係学術研究団体と共同主催してきている。平成3年(1991年)度には、次の6件の国際会議を開催する。

### ■第21回国際農業経済学会議

開催期間 平成3年8月22日～29日  
開催場所 京王プラザホテル(東京都新宿区)  
参加者数 国外550人、国内950人、計1,500人  
共催団体 日本農業経済学会外4学会

### ■国際医用物理・生体工学会議(第16回国際医用生体工学会議・第9回国際医学物理学会議)

開催期間 平成3年7月7日～12日  
開催場所 国立京都国際会館(京都市)  
参加者数 国外1,000人、国内1,500人、計2,500人  
共催団体 (社)日本エム・イー学会、日本医学物理学会

### ■国際純正・応用化学連合1991国際分析科学会議

開催期間 平成3年8月25日～31日  
開催場所 日本コンベンションセンター(千葉市)  
参加者数 国外500人、国内1,000人、計1,500人  
共催団体 (社)日本分析化学会

### ■第22回国際シミュレーション&ゲーミング学会総会

開催期間 平成3年7月15日～19日  
開催場所 立命館大学、国立京都国際会館(京都市)  
参加者数 国外170人、国内300人、計470人  
共催団体 日本シミュレーション&ゲーミング学会

### ■一般対論に関する第6回マーセルグロスマン会議

開催期間 平成3年6月23日～29日  
開催場所 国立京都国際会館(京都市)  
参加者数 国外380人、国内170人、計550人  
共催団体 (社)日本物理学会

### ■第22回国際動物行動学会議

開催期間 平成3年8月22日～29日  
開催場所 大谷大学(京都市)  
参加者数 国外400人、国内400人、計800人  
共催団体 日本動物行動学会

## 経営学研究連絡委員会報告—経営学教育改善のために—(要旨)

(平成2年11月26日 第763回運営審議会承認)

企業環境の激変、就中技術革新、高度情報化、国際化等々の急進展に伴って、経営学教育は、大きく見直され、かつ新たな体系化と一層の内容の充実の必要性に迫られている。すなわち、学術的分野の広がり、国際化や情報化の急進展は、経営学の外延的拡大を要請し、また経営管理の高度化、複雑化および戦略的視点の重要性増加は、斯学の多面的な内容の充実強化を要求している。本報告は、かかる状況下において経営学教育の現状分析を行い、かつ(1)教育体系(とくにカリキュラム)の再編成と(2)教育方式の新たな在り方を探り、もって経営学に対する社会的ニーズへの即応と経営学教育の総合的な体系化への試みを展開したものである。とくに教育する側、される側両面での人材育成を強く念頭に置いて経営学教育改善の方途を示すとともに、大学院教育へのつながりを意識しながら将来への展望を示唆しようとしたものである。

## 統計学研究連絡委員会報告—統計学研究教育体制の整備のための具体的方策について(要旨)

(平成2年12月21日 第764回運営審議会承認)

現今、高度情報化の進展による情報資源の多激な蓄積にともない、統計的情報処理を適切に行える人材に対する社会的需要が著しく高まっている。現在米国では60を超える大学に統計学科が存在するのに対し、我が国では統計学関連の大学院専攻はただ一つあるのみである。最近の学術研究における、調査、実験、観測等の活動の急速な増大を考慮するとき、データ有効利用の学としての統計学の研究教育体制の不備は、我が国の学術研究の将来に對し、国際的に見て著しく不利な状況を生み出しつつある。

本報告では、統計学を一つの専門分野として狭く捉える従来の考え方を避け、本来学際的な性格を持つ統計学研究の実態に即して、諸科学との関連をより重視する統計科学の概念を確立し、広範な関連分野の研究者の協力により統計科学研究所あるいは専攻等を設立することの推進を提案する。この提案を具体化することにより、国際的に見ても先進的な統計学研究教育体制を実現することが可能になるものと期待される。

## 実験動物研究連絡委員会報告—動物実験を支援する人材育成について—(要旨)

(平成2年12月21日 第764回運営審議会承認)

医学、生物学領域において、動物を用いた実験研究が先導的な形で寄与し、社会に貢献してきたことの意義は大きい。遺伝子・分子・細胞の各レベルにおける研究成果を総合して個体の生物機能・生理現象を理解し、病的現象に適切な対応を計るために、個体レベルの研究、すなわち、動物実験による研究の必要性はますます増加し、多種類かつ高品質の動物が精細な計画・技術のもとで実験に供されるようになった。以上の観点から動物実験を取り囲む現状を詳しく検討した結果、動物実験の高度化・多様化に対応できる、専門的知識と技術を習得した技術者の数が著しく不足していることを強く認識するに至った。

本報告は、このような現状に対する改善の方向を明らかにするとともに、バイオサイエンス研究支援体制を一層整備するための方策として、特に動物実験技術者の教育機関の設立を中心に、技術の審査・認定制度の確立、技術者の採用制度の検討、身分・処遇保障等についての将来展望を示唆するものである。

## 日学双書の刊行案内

日本学術会議主催公開講演会の記録をもとに編集された次の日学双書が刊行されました。

・日学双書No.10「くらしと学問の近未来」

〔定価〕1,000円(消費税込み、送料210円)

※問い合わせ先:

(財)日本学術協力財団(〒106 東京都港区西麻布3-24-2、交通安全教育センタービル内、TEL 03-3403-9788)

御意見・お問い合わせ等がありましたら、下記までお寄せください。

〒106 東京都港区六本木7-22-34

日本学術会議広報委員会 電話03(3403)6291

日本薬局方 注射用胎盤性性腺刺激ホルモン

動物  
専用

**ブペローゲン®**

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

日本薬局方 注射用血清性性腺刺激ホルモン

動物  
専用

**ピーメックス®**

1,000単位

販売元



**三共株式会社**

東京都中央区銀座2-7-12

製造元



**三共ゾーキ株式会社**

東京都品川区広町1-4-4

## あなたの研究に役立つ

### 供給品目

- |    |   |    |    |   |   |   |   |
|----|---|----|----|---|---|---|---|
| ・ラ | ツ | ト  | ・ハ | ム | ス | タ | ー |
| ・マ | ウ | ス  | ・ネ |   |   |   | コ |
| ・ウ | サ | ギ  | ・サ |   |   |   | ル |
| ・モ | ル | モ  | ・固 | 型 | 飼 | 料 | 各 |
|    |   | ット |    |   | 種 |   |   |

## (株)埼玉実験動物供給所

〒345 埼玉県北葛飾郡杉戸町清地3-9-12

TEL (0480) 34-3691 (代)

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

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



## 【効能・効果】

間脳性（視床下部性）無月経，下垂体性無月経の排卵誘発

## 【用法・用量】

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

## 【包装】

パーゴナル注 75：10管  
パーゴナル注150：10管



帝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・プレグナジオール分泌，頸管粘液，基礎体温等）を詳細に検査し，子宮性無月経の患者には投与しないこと。
    - ウ．原発性卵巣不全による尿中性腺刺激ホルモン分泌の高い患者，副腎・甲状腺機能の異常による無月経患者，頭蓋内に病変（下垂体腫瘍等）を有する患者，及び無排卵症以外の不妊患者には投与しないこと。
  - 2) 本療法の卵巣過剰刺激による副作用を避けるため，投与前及び治療期間中は毎日内診を行い，特に次の点に留意し，異常が認められた場合には，直ちに投与を中止すること。
    - ア．患者の自覚症状（特に下腹部痛）の有無
    - イ．卵巣腫大の有無
    - ウ．基礎体温の異常上昇の有無（毎日測定させること）。
    - エ．頸管粘液量とその性状
  - 3) 卵巣過剰刺激の結果としての多胎妊娠の可能性があるため，その旨をあらかじめ患者に説明すること。
  - 4) 妊娠初期の不注意な投与を避けるため，投与前少なくとも1ヵ月間は基礎体温を記録させること。
  - 5) 産婦人科・内分泌専門医師の管理のもとに投与すること。
2. 次の場合には投与しないこと
- 1) 卵巣腫瘍及び多くの卵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) 多くの卵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

## アトリン®

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F S H 剤です。
  - F S H 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。
  - H C G 又は、P M S G で無効或いは不的確な繁殖障害牛にも有効です。

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

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

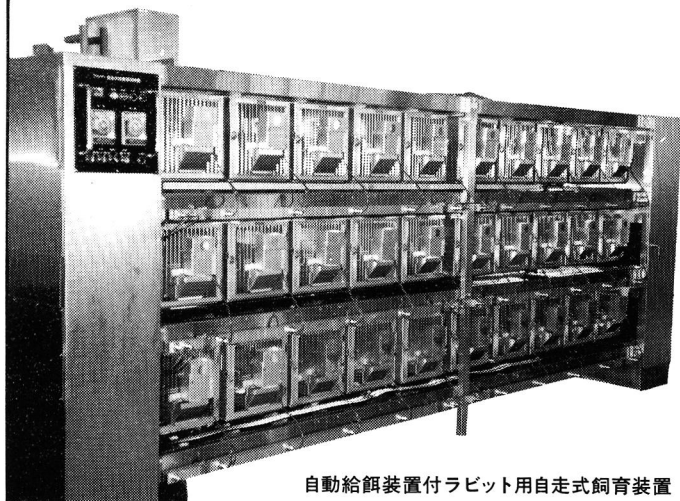


デンカ製薬株式会社

神奈川県川崎市川崎区中瀬3-19-11  
☎(044)266-0400 〒210

## 給餌の自動化を実現いたしました!!

自動給餌装置は各ケージに1台ずつ取付けるカートリッジタイプの本体とそれらを一括自動制御するシステムから成立っています。

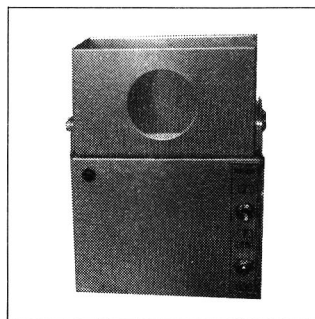


自動給餌装置付ラビット用自走式飼育装置

MRF-03 ラット・マウス用・DF-01 犬用  
もあります。詳細はカタログ御請求下さい。

## 自動給餌装置

RF-01 ラビット用



### 特 徴

- 希望時間に一定量の給餌が出来、正確な給餌量の為エサ代及び人件費の節約。
- 連続6日間の給餌可能であり、休日の飼育管理の手間の節約。
- 従来のケージにも簡単に取付け出来ます。
- 安全性を考慮完全防水型に設計されております。
- 当社の誇る自動制御システムによりコントロールし、取扱いは非常に簡単です。
- 本体はアルミ製で軽量コンパクトです。



岡崎産業株式会社

本社 〒104 東京都中央区八丁堀4丁目4-3号  
電話 東京 03 (3552) 4561 番

