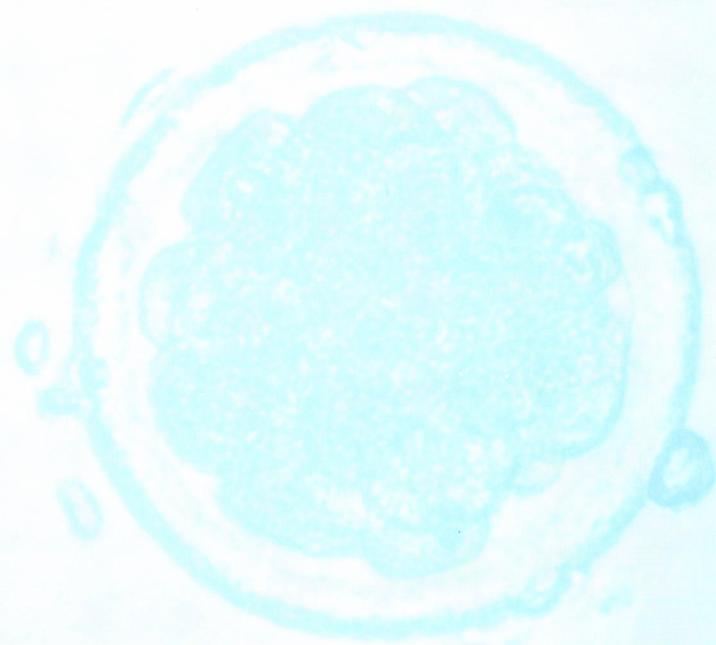


哺乳卵子學誌

J. Mamm. Ova Res.

哺乳動物卵子學誌

Journal of Mammalian Ova Research



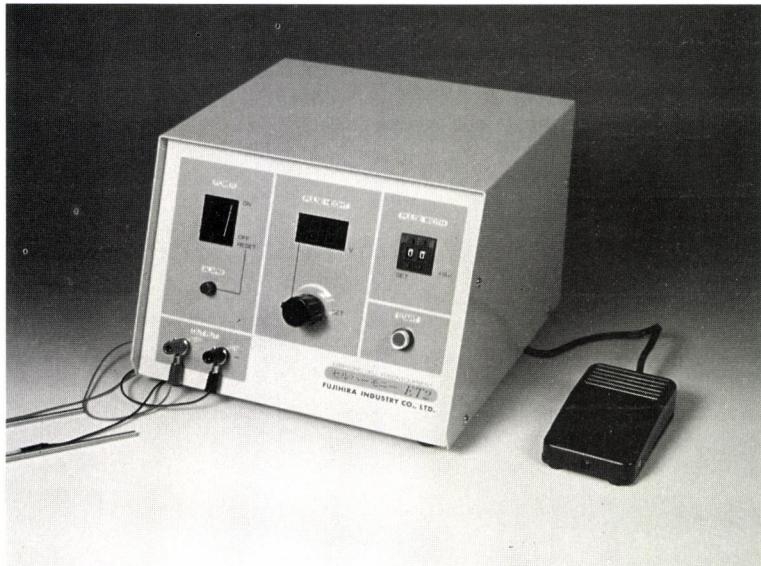
哺乳動物卵子學會

Japanese Society of
Mammalian Ova Research

Vol. 8 No. 2

October 1991

胚細胞融合装置 セルハーモニーET2



低電圧パルスで確実に融合させますので、融合確率は高く、発生率も良好です。

【仕様】

□□パルス電圧：3～50V
□□パルス幅：10～300μS
□□パルス許容電流：3 A
電 源：AC100V 50/60Hz
寸 法：233×250×173
(W×D×H)
重 量：約6 kg
付属品：電極(1対),
ケーブル, ホルダー,
フットスイッチ
別 売：電極 他

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ax(03)3812-3663

◆牛の繁殖障害の
分野に新しい可能性！



タケダのすぐれた合成技術が生んだ
LH放出ホルモン製剤

動物用医薬品

コンセラール®注射液

牛の卵胞のう腫、排卵障害、
卵巣静止の治療、排卵促進に

(要指示)

製造発売元
武田薬品工業株式会社

提携
帝国臓器製薬株式会社

第33回 哺乳動物卵子学会開催のお知らせ

第33回 哺乳動物卵子学会

大会長 広井正彦

下記により第33回哺乳動物卵子学会および総会を開催致します。多数の会員のご参加をお願い致します。

○日 時：平成4年5月16日（土）13:00～17日（日）15:00まで

○場 所：上山温泉 月岡ホテル

山形県上山市新湯1-33

T E L 0236-72-1212

○一般講演：前回の大会と同様に講演内容をオフセット印刷し、哺乳動物卵子学会誌第9巻 第1号に講演要旨として掲載致します。各演題は2ページにおまとめ頂きます。

発表時間は1題につき10分、討論5分を予定します。

なお、演題多数の場合は会場の都合などで一部示説発表をお願いすることもありますのでご了承下さい。

○演題申込：締切 平成4年1月31日必着

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

講演原稿の締め切りは平成4年2月28日（厳守）とさせて頂きます。

〒252 神奈川県藤沢市亀井野1866

日本大学農獣医学部獣医生理学研究室

遠藤克宛

T E L 0466-81-6241 内332

○役員会

理事会 5月16日（土） 12：00～13：00 月岡ホテル内
評議員会 5月17日（土） 12：00～13：00 月岡ホテル内

○総 会 5月17日（日） 13：00～13：30 月岡ホテル内

○懇親会 5月16日（土） 18：00～20：00 月岡ホテル内

○宿泊関係

宿泊は、月岡ホテル内に多数確保しておりますので、各自
『学会出席のため』として、直接 月岡ホテルに電話で
お申し込み下さい。

月岡ホテル 上山温泉（上山市新湯 1-33）

Tel : 0236-72-1212

○学会事務局：〒990-23 山形県飯田西2-2-2

山形大学医学部産婦人科教室内

第33会 哺乳動物卵子学会事務局

大会長 広井 正彦

（総会幹事 斎藤 英和）

哺乳動物卵子学会誌

第8卷 第2号

平成3年10月

目 次

原 著

胚盤胞形成過程のマウス胚細胞膜におけるカルシウムの分析電顕的検出（英文） 四谷伊公子、新村末雄、石田一夫	121
卵丘除去マウス卵子の体外受精に影響する要因について（英文） 板垣佳明、豊田 裕	126
5系統の近交系マウスにおける系統内および系統間の体外受精について 横山峯介、長谷川孝徳	135
低浸透圧培養液をもちいたラット初期胚の体外発育に及ぼすリン酸塩およびグルコース除去の影響 橋詰良一、伊藤雅夫	140
HMGによるマウスの過排卵誘起 種市衣里子、木村 新、伊藤雅夫、橋詰良一、石島芳郎	149
牛の体外成熟・体外受精卵発生に及ぼす卵巣の38℃短期保存の影響 安部茂樹、長谷川清寿、川平 実	155
性腺刺激ホルモン投与による黒毛和種雌牛の過剰排卵反応と血液性状の関係 松岡一仁、阪田昭次、水原孝之、鈴木達行	164
卵管共培養におけるマウス初期胚発生のtumor necrosis factorによる制御；子宮内膜症の不妊機序の関連（英文） 武谷雄二、郭 宗明、水野正彦	175

Journal of Mammalian Ova Research

Vol.8 No.2

October 1991

Contents

Originals

Analytical electron microscopic detection of calcium on the cell membrane of mouse embryos in the course of blastocyst formation.

YOTSUTANI,I., S.NIIMURA, & K.ISHIDA ----- 121

Factors affecting fertilization in vitro of mouse eggs after removal of cumulus oophorus.

ITAGAKI,Y. & Y.TOYODA ----- 126

In vitro fertilization within and among five inbred strains of mice.

YOKOYAMA,M. & T.HASEGAWA ----- 135

Effects of the removal of phosphate and glucose on in vitro development of rat eggs under the low osmotic pressure medium.

HASHIZUME,R. & M.ITO ----- 140

Induction of superovulation in mice using HMG.

TANEICHI,I., A.KIMURA, M.ITO, R.HASHIZUME & Y.ISHIJIMA -- 149

Effect of short -term preservation of ovaries at 38°C on the development of bovine follicular oocytes matured and fertilized in vitro.

ABE,S., K.HASEGAWA & M.KAWAHIRA ----- 155

Relationship between superovulatory response and blood profiles in japanese black cows with FSH treatment.

MATSUOKA,K., S.SAKATA, T.MIZUHARA & T.SUZUKI-- 164

Tumor necrosis factor inhibits the development of mouse embryos Co-cultured with oviducts.: possible relevance to infertility associated with endometriosis.

TAKETANI,Y.T.M.KUO & M.MIZUNO ----- 175

Analytical Electron Microscopic Detection of Calcium on the Cell Membrane of Mouse Embryos in the Course of Blastocyst Formation

Ikuko YOTSUTANI*, Sueo NIIMURA and Kazuo ISHIDA

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

Abstract: Electron probe X-ray microanalysis of calcium was performed on mouse embryos from the 8-cell to blastocyst stages. In the spectra obtained by the analysis, no peak of calcium was found on the cell membrane of any blastomere in uncompacted 8- and 16-cell embryos. In compacted 8- and 16-cell embryos, however, calcium peak was detected on the cell membranes of flattened outer blastomeres facing perivitellin space and on the cell membranes where the ends of two flattened outer blastomeres met. In blastocysts, calcium peak was found on the cell membranes of trophoblast cells and inner-cell-mass cells.

Introduction

In mouse embryos during blastocyst formation, kinds of junctional complexes are formed between each group of two blastomeres, among which, a series of tight junctions between each group of two outer blastomeres induce flattening of the outer blastomeres either at the 8-cell or 16-cell stage, and consequently compaction of the embryos occurs¹⁻⁴⁾. When mouse embryos are cultured in a calcium-free medium, however, no junctional complexes are formed, and therefore, neither transformation into flattened blastomeres nor simultaneous compaction occur, and, most of all, embryos can not develop into blastocysts^{2,5-7)}. These findings strongly suggest that calcium plays an important role in the formation of junctional complexes and consequently of blastocysts.

Niimura and Ishida (1982)⁸⁾ performed an analytical electron microscopic examination of calcium in the early development of mouse embryos, but did not especially observe that in compacted embryos, which therefore left the localization of calcium in compacted embryos unknown.

In the present investigation, then, an electron probe X-ray microanalysis of calcium was performed on the cell membranes of blastomeres in uncompacted 8- and 16-cell mouse embryos, of flattened outer blastomeres and round inner ones in compacted 8- and 16-cell embryos, of trophoblast cells and inner-cell-mass cells in blastocysts.

Materials and Methods

Twelve female mature mice of the ICR strain were kept and fed normally in a room at 24 °C, lit 14 hours a day, from 4 a.m. till 6 p.m. They were superovulated with 5 i.u. PMSG (Teikoku Hormone Manufacturing Co. Ltd., Tokyo, Japan), and 48 hours later with 5 i.u. hCG (Teikoku Hormone Manufacturing Co. Ltd.), and then were mated with ICR males of proven fertility. Embryos at the 8-cell, 16-cell and blastocyst stages were collected from the oviducts or uteri respectively 67, 80 and 96 hours after hCG injection. They were fixed in a 0.1 M cacodylate buffer solution (pH 7.4) containing 4 % glutaraldehyde and 2 % paraformaldehyde at 4 °C for 2 hours. Rinsed 3 times, overnight, in a 0.1 M cacodylate buffer solution (pH 7.4), the embryos were dehydrated in a series of graded acetone, embedded in Epon 812, and cut at a thickness of 0.1 μm with a JUM-7 ultramicrotome.

Electron probe X-ray microanalyses were performed on the sections thus prepared, using an AN-10000 (Link Analytical Ltd., Halifax, England) connected with a JEM-2000 EXII. Analytical conditions were 200 kV in accelerated electric pressure and 2-5 × 10⁻¹⁰ A in electric current.

The analyses were done on the cell membranes facing perivitellin space, intercellular space and blastocoel, and on the cell membranes adhering to each other.

Results

Sixty-seven hours after hCG injection, all the embryos observed were at the 8-cell stage, the blastomeres of which were round in shape; compaction had not occurred in these embryos. Eighty hours after hCG injection, there still were some uncompacted 8-cell embryos, aside from 16-cell embryos which had round blastomeres only, 8-cell and 16-cell embryos having both flattened outer blastomeres and round inner ones; and compaction had occurred in the last two types. Ninety-six hours after hCG injection, all the embryos were at the blastocyst stage.

In the spectra obtained by electron probe X-ray microanalyses, no peak of calcium was detected on the cell membrane of any blastomere in uncompacted 8- and 16-cell embryos (Fig. 1). In compacted 8- and 16-cell embryos, however, calcium peak was detected on the cell membranes of flattened outer blastomeres facing perivitellin space and on the cell membranes where two blastomeres were touching each other (Fig. 2), though no peak was found on the cell membranes of round inner blastomeres. In blastocysts, calcium peak was detected on the cell membranes of trophoblast cells and inner-cell-mass cells at following spots; where two trophoblast cells abutted (Fig. 3), where two inner-cell-mass cells abutted, where a trophoblast cell abutted an inner-cell-mass cell, where trophoblast cells faced perivitellin space, and where trophoblast cells or inner-cell-mass cells faced blastocoel or intercellular space.

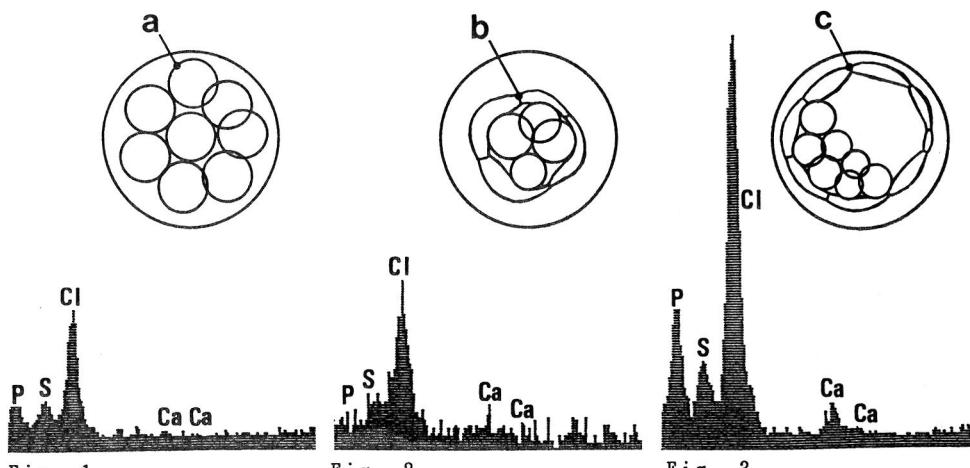


Fig. 1.

Fig. 2.

Fig. 3.

All the figures are spectra obtained by electron probe X-ray microanalyses on the cell membranes of mouse embryos. Fig. 1. Calcium peak is absent in the spectrum at one point(a) where a round blastomere faces perivitellin space in an uncompacted 8-cell embryo. Fig. 2. Calcium peak is present in the spectrum at one point(b) where the ends of two flattened blastomeres adhere in a compacted 16-cell embryo. Fig. 3. Calcium peak is present in the spectrum at one point(c) where two trophoblast cells adhere in a blastocyst.

Discussion

Niimura and Ishida (1982)⁸⁾ applied electron probe X-ray microanalysis for the detection of calcium in the early development of mouse embryos, using an ORTEC EEDS II connected with a TEMSCAN-100 CX, and reported on the presence of calcium on the cell membranes of embryos at earlier developmental stages, but not in their nuclei, cytoplasm, zonae pellucidae and perivitellin space, while in blastocysts, calcium was found only on trophoblast cell membranes facing zona pellucida and inner-cell-mass cells. In the present investigation, the authors used an AN-10000 connected with a JEM-2000 FXII to detect calcium on the cell membranes of mouse embryos in the course of blastocyst formation, and obtained the details as reported in the "results". The fact that we got more detailed information is due to the excellence of the instruments used in these experiments.

Calcium-dependent cell-cell adhesion molecules such as cadherin participate in the adhesion between cells including blastomeres⁹⁻¹⁶⁾, and calcium plays some role in the activation of cell-cell adhesion molecules⁹⁻¹⁶⁾. When mouse embryos in the early stages of development are cultured in a calcium-free medium, compaction does not occur since junctional complexes are not formed between blastomeres in such embryos^{2, 7)}, and this must mean cell-cell adhesion molecules are not functioning¹⁰⁾. Vestweber et al. (1987)¹⁷⁾ who detected cadherin in mouse embryos stated cadherin first appears on the cell membranes of late 2-cell embryos, and that in compacted embryos and blastocysts, cadherin

is localized on the cell membranes where two blastomeres adhere; they also observed that it is not functioning before compaction, under which condition blastomeres begin to adhere to each other. In the present investigation, calcium was not found on the cell membranes of uncompacted embryos, whereas it always existed on the cell membranes of compacted embryos and blastocysts, corresponding with the results of cadherin. We may conclude, then, that calcium plays some role in the activation of cadherin.

References

- 1) Lewis, W. A. and Wright, E. S. (1935) On the early development of the mouse egg. *Contr. Embryol. Carnegie Inst.*, 25, 115-143.
- 2) Ducibella, T. and Anderson, E. (1975) Cell shape and membrane changes in the eight-cell mouse embryo : Prerequisites for morphogenesis of the blastocyst. *Dev. Biol.*, 47, 45-58.
- 3) Smith, L. J. (1956) A morphological and histochemical investigation of a preimplantation lethal (t^{12}) in the house mouse. *J. Exp. Zool.*, 132, 51-83.
- 4) Calarco, P. G. and Brown, E. H. (1969) An ultrastructural and cytological study of preimplantation development of the mouse. *J. Exp. Zool.*, 171, 253-284.
- 5) Wales, R. G. (1970) Effects of ions on the development of the preimplantation mouse embryo in vitro. *Aust. J. Biol. Sci.*, 23, 421-429.
- 6) Whitten, W. K. (1971) Nutrient requirements for the culture of preimplantation embryos in vitro. *Advan. Biosci.*, 6, 129-139.
- 7) Pratt, H. P. M., Ziomek, C. A., Reeve, W. J. D. and Johnson, M. H. (1982) Compaction of the mouse embryo: an analysis of its components. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 70, 113-132.
- 8) Niimura, S. and Ishida, K. (1982) Analytical electron microscopic studies of calcium in mouse embryos during blastocyst formation. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 53, 289-292.
- 9) Boller, K., Vestweber, D. and Kemler, R. (1985) Cell adhesion molecule uvomorulin is localized in the intermediate junctions of adult intestinal epithelial cells. *J. Cell Biol.*, 100, 327-332.
- 10) Gumbiner, B. and Simmons, K. (1986) A functional assay for proteins involved in establishing an epithelial occluding barrier: Identification of a uvomorulin-like polypeptide. *J. Cell Biol.*, 102, 457-468.
- 11) Gumbiner, B., Stevenson, B. and Grimaldi, A. (1988) The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex. *J. Cell Biol.*, 107, 1575-1587.
- 12) Hyafil, F., Morello, D., Babinet, C. and Jacob, F. (1980) A cell surface glycoprotein involved in the compaction of embryonal carcinoma cells and cleavage stage embryos. *Cell*, 21, 927-934.
- 13) Hyafil, F., Babinet, C. and Jacob, F. (1981) Cell-cell interactions in early embryogenesis: A molecular approach to the role of calcium. *Cell*, 26, 447-454.
- 14) Richa, J., Damsky, C. H., Buck, C. A., Knowles, B. B. and Solter, D. (1985) Cell surface glycoproteins mediate

- compaction, trophoblast attachment, and endoderm formation during early mouse development. Dev. Biol., 108, 513-521.
- 15) Shirayoshi, Y., Okada, T. S. and Takeichi, M. (1983) The calcium dependent cell-cell adhesion system regulates inner cell mass formation and cell surface polarization in early mouse development. Cell, 35, 631-638.
- 16) Takeichi, M. (1988) The cadherin : cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. Development, 102, 693-655.
- 17) Vestweber, D., Goosler, A., Boller, K. and Kemler, R. (1987) Expression and distribution of cell adhesion molecule uvomorulin in mouse preimplantation embryos. Dev. Biol., 124, 451-456.

胚盤胞形成過程のマウス胚細胞膜における

カルシウムの分析電顕的検出

四谷伊公子*・新村末雄・石田一夫

*新潟大学大学院自然科学研究科, 新潟大学農学部, 新潟市 950-21

X線微小部微量元素分析法を用いて、8細胞期から胚盤胞期までのマウス胚の細胞膜についてカルシウム(Ca)の検出を試みた。

コンパクションを起こしていない8および16細胞期胚において、Caは球形割球の細胞膜のどの部位にも検出されなかった。コンパクションを起こした8および16細胞期胚において、Caは球形割球の細胞膜ではどの部位にも認められなかつたが、扁平割球の細胞膜では卵黄周囲腔に面する部位と扁平割球同士が接する部位に検出された。胚盤胞において、Caは栄養膜細胞同士、内細胞塊細胞同士、栄養膜細胞と内細胞塊細胞の細胞膜がそれぞれ接する部位、栄養膜細胞と内細胞塊細胞の細胞膜が細胞間隙と胚盤胞腔に面する部位、および栄養膜細胞の細胞膜が卵黄周囲腔に面する部位に検出された。

Factors affecting fertilization in vitro of mouse eggs after removal of cumulus oophorus

Yoshiaki Itagaki¹ and Yutaka Toyoda²

*Central Research Institute¹, Itoham Foods Inc.,
Moriya-machi, Ibaraki 302-01; Institute of Medical
Science², University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo 108*

Abstract Cumulus oophorus was removed from freshly superovulated eggs of Jcl:ICR mature mice with hyaluronidases under various conditions and the cumulus-free eggs were inseminated with epididymal spermatozoa preincubated for 1.5-2h. Cumulus removal caused reduced fertilization rates to varying degrees depending on the experimental conditions. Relatively high fertilization rates were only attained either by dissolving the cumulus with very low concentrations of hyaluronidase (hyaluronate lyase) or by increasing the calcium concentration in the fertilization medium to 3.42mM. Possible involvement of cumulus factor(s) assisting fertilization is discussed.

Introduction

In mice, as in most mammalian species so far investigated, the capacitation of spermatozoa with subsequent fertilization in vitro has been performed in a single system¹⁾; freshly ovulated eggs surrounded by cumulus oophorus can be fertilized in a defined medium based on Krebs-Ringer or Tyrode solution supplemented with glucose, pyruvate and serum albumin²⁻⁶⁾. Although it has been demonstrated that the presence of an intact cumulus oophorus around the eggs is not an absolute necessity for fertilization, its removal has been reported to cause an erratic or reduced fertilization rate⁷⁻¹¹⁾. This may have been caused by the loss of some cumulus component(s) responsible for successful interaction between spermatozoa and eggs or by changes in the properties of the zona pellucida during the process of denudation, as suggested in studies using other mammalian species¹²⁻¹⁵⁾.

In the present study, effects of various factors, including the type and concentrations of hyaluronidases, supplementation with hyaluronic acid, and

increased concentrations of calcium in the fertilization medium, were investigated in order to find the optimum conditions for the fertilization of cumulus-free mouse eggs in vitro.

Materials and Methods

Medium

The basic medium used throughout this study was the same as described by Toyoda et al¹⁾ which is referred to as TYH in this paper. In a series of experiments in which the calcium concentration in the fertilization medium was doubled to 3.42mM or tripled to 5.13mM of that of the basic medium(1.71mM), these media are referred to as 2xCaTYH and 3xCaTYH, respectively. Each medium was prepared from fresh ultra-pure water (18 megaohm), gassed by bubbling CO₂ for 2-3min, divided into 10ml aliquots in polypropylene tubes and stored at -20°C until use. On the day before the experiment, the media were thawed by allowing them to stand at 37°C, regassed with CO₂ briefly, and 4mg/ml bovine serum albumin (Fraction V, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Tokyo) was added just prior to sterilization through a 0.22μm filter sterilizer. In an experiment in which hyaluronic acid (from bovine trachea, sodium salt, Sigma Chemical Co., St. Louis MO) was used, it was also added to TYH just prior to filter sterilization.

The 0.4ml (for sperm preincubation) or 0.2ml (for fertilization) drop of medium in a plastic culture dish (Corning 35mm Non-treated polystyrene dish, Iwaki Glass, Tokyo) was overlaid with 5-6ml of mineral oil (Squibb & Sons, Inc., Princeton NJ) and pre-equilibrated overnight at 37°C under 5% CO₂ in air.

Collection of spermatozoa and capacitation

Spermatozoa were obtained from the cauda epididymidis of 3-7months old Jcl:ICR male mice. The epidymal duct was slit open with a pair of fine scissors and a small portion of exuded content was directly introduced into TYH under mineral oil. Sperm suspension was preincubated for 1.5-2h at 37°C under 5% CO₂ in air.

Collection of eggs and removal of cumulus oophorus

Mature, 2-5months-old, Jcl:ICR female mice were induced to superovulate by an i.p. injection of 5iu eCG (Peamex, Sankyo Zoki Co., Tokyo), followed 48h later by an i.p. injection of hCG (Puberogen, Sankyo Zoki Co., Tokyo). The mice were killed by cervical dislocation at 15.5-16.0h after the hCG injection. The oviducts were removed and were placed in the mineral oil that covered a drop of TYH containing hyaluronidase. Eggs surrounded with cumulus oophorus were released into the medium by puncturing the swollen ampullae. The oviducts were discarded. The eggs were transferred into fresh TYH as soon as cumulus cells

were dispersed, washed three times in TYH (0.4ml/wash for 3min), and randomly allotted to each fertilization dish. In the control group, the eggs surrounded with cumulus were directly introduced into the fertilization medium.

Two kinds of hyaluronidases were used in this study. Unless otherwise stated, bovine testicular hyaluronidase (hyaluronoglucosaminidase) (Type IV-S, Sigma Chemical Co., St. Louis MO) was used at a concentration of 150u/ml. In one experiment, hyaluronidase (hyaluronate lyase) from Streptococcus dysgalactiae (Hyaluronidase SD, Seikagaku Kokyo Co., Tokyo) was used at various concentrations.

In vitro fertilization and examination of eggs

Immediately after introduction of cumulus-free eggs into the fertilization medium, 5ul of preincubated sperm suspension was added to the medium to yield a final sperm concentration of 200-350 cells/ul.

At 5-7h after insemination, eggs were examined carefully for the development of male and female pronuclei under an inverted microscope and examined again for the development to the 2-cell stage 24-26h after insemination. Observation at both stages gave the same results, except for a few parthenogenetically activated eggs which divided to the 2-cell stage. In these cases, the assessment of fertilization was based on the observation at the pronuclear stage.

Statistical analysis

Student's t-test and chi-square test were used for the significance of differences. The probability less than 0.05 was considered significant.

Results

Effect of removal of cumulus oophorus before and after insemination

As shown in Table 1, removal of the cumulus before insemination, that is the in vitro fertilization of cumulus-free eggs, significantly reduced the fertilization rate (41.9% vs 92.6%), while no effects were observed when the eggs were subjected to the same treatment with hyaluronidase at 1h after insemination (97.4%).

Effect of washing on the fertilizability of cumulus-free eggs

In order to find out the cause of the reduced fertilization rate, the cumulus-free eggs were inseminated at each step of washing after hyaluronidase treatment. The results presented in Table 2 clearly show that the decrease in fertilization rate had already occurred at the first washing and continued further during the subsequent second and third washings.

Table 1. Effect of cumulus removal before or after insemination

Cumulus removal	No. of eggs examined	No. (%) of eggs fertilized
Before	167	70 (41.9) ^a
After	156	152 (97.4) ^b
None(control)	162	150 (92.6) ^b

^{a, b} Significantly different at p .05

Table 2. Effect of washing on fertilization of cumulus-free eggs

No. of washing	No. of eggs examined	No. (%) of eggs fertilized
1	52	33 (63.5) ^a
2	48	26 (54.2) ^{a, b}
3	61	22 (36.1) ^b

^{a, b} Significantly different at p .05

Table 3. Effect of cumulus-removal with hyaluronidase(hyaluronate lyase) on fertilization

Treatment with hyaluronidase Conc. (u/ml)	Time (min)	No. of eggs examined	No. (%) of eggs fertilized
0.01	45-60	55	45 (81.8) ^a
0.05	15-30	58	44 (75.9) ^a
	45	50	33 (66.0) ^{a, b}
	60	45	24 (53.3) ^b
0.1	10	66	16 (24.2) ^c

^{a, b, c} Significantly different at p .05.

Table 4. Effect of hyaluronic acid on fertilization of cumulus-free eggs

Conc. of hyaluronic acid (mg/ml) Pretreatment ¹⁾	Fertilization ²⁾	No. of eggs examined	No. (%) of eggs fertilized
1	-	62	35 (49.2) ^a
5	-	52	20 (38.5) ^a
-	1	19	9 (47.4) ^a
-	5	20	6 (30.0) ^a
-	-	22	10 (45.5) ^a

^a No significant differences between groups.

Table 5. Effect of elevated concentrations of calcium on fertilization of cumulus-free and cumulus-enclosed eggs

Cumulus	Conc. of calcium (mM)	No. of eggs examined	No. (%) of eggs fertilized
-	1.71	69	39 (56.5) ^b
	3.42	76	64 (84.2) ^a
	5.13	60	24 (40.0) ^b
+	1.71	83	74 (89.2) ^a
	3.42	95	88 (92.6) ^a
	5.13	87	76 (87.4) ^a

^{a, b} Significantly different at p .05.

Effect of mild treatment with hyaluronidase (hyaluronate lyase) on fertilization

In an attempt to remove the cumulus cells with minimum loss of fertilizability, low concentrations of hyaluronidase (hyaluronate lyase) were employed in dissolving the cumulus matrix. This type of enzyme was chosen because the preparation was of high purity, without detectable contamination of glycosidases and proteases.

As shown in Table 3, cumulus-free eggs were found to have retained a high level of fertilizability (81.8% of fertilization rate) when treated with the lowest concentration of the enzyme (0.01u/ml), although it took 45–60min to dissolve the cumulus matrix. Treatment with a higher concentration (0.05u/ml) for a shorter period (15–30min) also resulted in a fertilization rate (75.9%) not significantly different from that obtained by treatment with the lowest concentration of the enzyme, but the rate was decreased gradually as the exposure time was increased to 45 and 60min (66.0% and 53.3%). Treatment with the highest concentration of the enzyme(0.1u/ml) caused rapid dispersal of cumulus cells within 10min but a marked decrease in fertilization rate (24.2%) was observed when the resulting cumulus-free eggs were inseminated.

Effect of supplementation with hyaluronic acid on fertilization of cumulus-free eggs

The results presented in Table 4 show that neither pretreatment of cumulus-free eggs with hyaluronic acid nor addition of hyaluronic acid to the fertilization medium exerted any beneficial effects on the fertilization of these eggs.

Effect of increased concentration of calcium in the fertilization medium on fertilization of cumulus-free and cumulus-enclosed (control) eggs

In this experiment, cumulus-free or cumulus-enclosed eggs were fertilized in the media with different concentrations of Ca (1.71, 3.42 and 5.13mM), by using the same sperm suspension preincubated for 1.5–2h in standard medium (1.71mM Ca). The results are presented in Table 5. A significantly higher fertilization rate (84.2%) was achieved in the fertilization medium with 3.42mM CaCl_2 (2xTYH) as compared to that in the standard medium (56.5%) when the cumulus-free eggs were used for fertilization, while further increasing the Ca concentration to 5.13mM (3xTYH) resulted in a significant decrease in the fertilization rate (40.0%). On the other hand, high fertilization rates (87.4–92.9%) were obtained

in all of these three kinds of media when the cumulus-enclosed, intact eggs were used. Sperm motility looked more vigorous in 2xCaTYH than in TYH by subjective observation, although no quantitative measurement was performed. Sperm became immotile within 1h in 3xCaTYH.

Discussion

Throughout this study, removal of cumulus oophorus caused reduced fertilization rates, to varying degrees depending on the procedures for denudation and the condition for in vitro fertilization (IVF). This confirms the previous reports ⁷⁻¹¹⁾. In an early study on mouse IVF, Fukuda et al ⁷⁾ observed that the fertilization rate of cumulus-free eggs tended to vary among each experiment, although the mean percentage was not significantly different between cumulus-free (71.3%) and cumulus-intact (84.7%) eggs. Miyamoto & Chang ⁸⁾ also showed that the removal of follicular cells decreased the fertilization rate from 85% to 63%. Gwatkin et al ¹¹⁾ reported that washed epididymal sperm preincubated without cumulus cells could not fertilize the cumulus-free eggs at all, but washed sperm with cumulus cells could do so. Pavlok and McLaren ⁹⁾ showed that the presence of cumulus did not increase the fertilization rate when oviduct fluid was present, while absence of both cumulus and oviduct fluid resulted in a extremely poor fertilization rate (6.6%). All of these data have suggested that the beneficial effects of cumulus oophorus become more evident under the unfavorable condition of the IVF, but the exact nature of these factor(s) and/or condition remains unclear.

At least two factors are now considered important in achieving the high fertilization rate after removal of cumulus oophorus; one is the procedure for denudation with hyaluronidase and another is the Ca concentration in the fertilization medium.

It is known that the egg zona pellucida contains sperm receptors and their integrity is of utmost importance in the initiation of successful fertilization ¹⁶⁾. Murine zona pellucida contains a glycoprotein, ZP3, which serves not only as a primary sperm receptor but also as a acrosome reaction-inducer of the binding spermatozoa. A variety of evidence has suggested that the sperm receptor activity depends on its O-linked oligosaccharides and the acrosome reaction-inducing ability depends on its polypeptide chain as well. It is also known that ZP2, another glycoprotein serving as a secondary sperm receptor, and ZP3 are modified following either fertilization or parthenogenetic activation, resulting in the loss of sperm receptor and acrosome reaction-inducing

activities and hardening (decreased solubility) of the zona pellucida¹⁷⁾.

It might be argued that the decreased fertilization rates following cumulus removal could have been due to the modification of sperm receptors caused by contaminating enzymes. This is not likely, however, because (a) decrease in fertilization occurred even when a highly purified preparation of hyaluronidase (hyaluronate lyase) was used for denudation and (b) the decrease had already occurred during the short period of washing. We are inclined to consider that some co-factor(s) for efficient interaction between sperm and zona pellucida was lost during the process of cumulus removal.

Large molecular weight glycoconjugates are present within the follicular fluid as well as within the cumulus matrix¹⁸⁾, but their role in fertilization remains unclear¹⁷⁾. From the present study, at least hyaluronic acid is not the likely candidate for 'co-factor' for fertilization because its supplementation to the denuded eggs did not improve the fertilization, although its possible involvement can not be ruled out, in view of the recent finding that it stimulates protein kinase activity in cultured cells¹⁹⁾. In bovine IVF studies, it has been shown that the glycosaminoglycans stimulate capacitation and/or acrosome reaction and the order of potency is heparin, chondroitin sulfate, and hyaluronic acid²⁰⁾. Tesarik et al¹⁴⁾ have suggested that cumulus cells contribute a 'softening factor(s)' to the zona pellucida, thus antagonizing the effect of 'hardening factor(s)' secreted by the human oocytes.

As far as the authors are aware, there has been no report on the effect of calcium concentration on the IVF of cumulus-free mouse eggs, although the effect has been investigated by using cumulus-enclosed, intact eggs^{21, 22)}. Miyamoto and Ishibashi²¹⁾ and Fraser²²⁾ have shown that the optimum concentration of calcium in the fertilization medium was 1.7mM and 1.8mM, respectively. According to Roblero et al²³⁾, the calcium concentration in the mouse oviduct fluid was 1.62mM in ampullar portion and 1.48mM in isthmic portion. These values are very close to that in our standard medium, TYH (1.71mM). Nevertheless, the present study indicates clearly that the elevated calcium concentration (3.42mM) affords better microenvironment for the fertilization of denuded eggs. It is highly probable that the optimum composition of the medium might be different between cumulus-enclosed and cumulus-free eggs.

This work is supported by a grant-in-aid for scientific research (02454091) and a grant upon priority area "germ line" (03207103) from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan.

References

- 1) Toyoda, Y., Yokoyama, M. and Hosi, T. (1971). Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro. II. Effects of in vitro preincubation of spermatozoa on time of sperm penetration of mouse eggs in vitro. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 16, 152-157.
- 2) Miyamoto, H. and Chang, M.C. (1973) The importance of serum albumin and metabolic intermediates for capacitation of spermatozoa and fertilization of mouse eggs in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 32, 193-205.
- 3) Hoppe, P. C. and Whitten, W. K. (1974). An albumin requirement for fertilization of mouse eggs in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 39, 433-436.
- 4) Hoppe, P. C. (1976). Glucose requirement for mouse sperm capacitaion in vitro. *Biol. Reprod.*, 8, 420-426.
- 5) Okamoto, M. and Toyoda, Y. (1980). Effects of glucose and pyruvate on the sperm penetration and fertilization of mouse eggs in vitro. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 51, 171-177.
- 6) Fraser, L. R. and Quinn, P. C. (1981). A glycolytic product is obligatory for initiation of the sperm acrosome reaction and whiplash motility required for fertilization in the mouse. *J. Reprod. Fert.*, 61, 25-35.
- 7) Fukuda, Y., Okada, O. and Toyoda, Y. (1972). Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro. III. Fertilization of denuded eggs by capacitated spermatozoa. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 18, 73-77.
- 8) Miyamoto, H. and Chang, M. C. (1972). Fertilization in vitro of hamster and mouse eggs after the removal of follicular cells. *J. Reprod. Fert.*, 30, 309-312.
- 9) Pavlok, A. and McLaren, A. (1972). The role of cumulus cells and the zona pellucida in fertilization of mouse eggs in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 29, 91-97.
- 10) Hoppe, P. C. and Whitten, W. K. (1974). Maturation of mouse sperm in vitro. *J. Exp. Zool.*, 188, 133-136.
- 11) Gwatkin, R. B. L., Anderson, O. F. and Williams, D. T. (1974). Capacitation of mouse spermatozoa in vitro: Involvement of epididymal secretions and cumulus components. *J. Reprod. Fert.*, 41, 253-256.
- 12) Talbot, P. and DiCarlantonio, G. (1984). The oocyte-cumulus complex: ultrastructure of the extracellular matrix in hamster and mice. *Gamete Res.* 10, 127-135.
- 13) Tesarik, J. (1985). Comparison of acrosome reaction-inducing activities of human cumulus oophorus, follicular fluid and ionophore A23187 in human sperm populations of proven fertilizing ability in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 74, 383-388.
- 14) Tesarik, J., Pilka, L. and Travnik, P. (1988). Zona pellucida resistance to sperm penetration before the completion of human oocyte maturation. *J. Reprod. Fert.*, 83, 487-495.
- 15) Thomas, P. and Meizel, S. (1989). An influx of extracellular calcium is required for initiation of the human sperm acrosome reaction induced by human follicular fluid. *Gamete Res.*, 20, 397-411.
- 16) Wassarman, P. M. (1988). Zona pellucida glycoproteins. *Ann. Rev. Biochem.*, 57, 415-442.
- 17) Bleil, J. D. (1991). Sperm receptors of mammalian eggs. In *Elements of Mammalian Fertilization*, Vol 1. edited by Wassarman P. M., CRC Press, Boston, P133-152.
- 18) Eppig, J. J. (1979). FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. *Nature* 281, 483-484.
- 19) Turley, E. A. (1989). Hyaluronic acid stimulates protein kinase activity in intact cells and in an isolated protein complex. *J. Biol. Chem.*, 264, 8951-8955.
- 20) Parrish, J. J., Susko-Parrish, J., Winer, M. A. and First, N. L. (1988). Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.*, 38, 1181-1180.
- 21) Miyamoto, H. and Ishibashi, T. (1975). The role of calcium ions in fertilization of mouse and rat eggs in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 45, 523-526.
- 22) Fraser, L. R. (1987). Minimum and maximum extracellular Ca^{2+} requirements during mouse sperm capacitation and fertilization in vitro. *J. Reprod. Fert.* 81, 77-89.
- 23) Roblero, L., Biggers, J. D. and Lechene, C. P. (1976). Electron probe analysis of the elemental microenvironment of oviducal mouse embryos. *J. Reprod. Fert.* 46, 431-434.

卵丘除去マウス卵子の体外受精に影響する要因について

板垣 佳明¹⁾・豊田 裕²⁾

(伊藤ハム中央研究所¹⁾、茨城県北相馬郡守谷町 302-01、東京大学医科学研究所
獣医学研究部²⁾、東京都 108)

卵丘除去マウス卵子の体外受精における受精率低下の原因を知る目的で、種々の条件下に
Jc1 : ICR 系マウスの過排卵卵子・卵丘複合体の卵丘細胞をヒアルロニダーゼで除去し、1.5-2 時間前培養した同系統の精巣上体精子を用いて体外受精を行った。その結果、卵丘除去マウス卵子の受精能は裸化処理後の卵子洗浄の過程で既に低下し、高い受精率を得るためにには、非常に低い濃度のヒアルロニダーゼ (hyaluronate lyase) で穏やかに裸化処理を行うことが必要であることが知られた。また、通常の処理で得られた卵丘除去卵子の受精率を改善するために、受精培地のカルシウム濃度を二倍 (3.42 mM) に高めることが有効であることが見出された。ヒアルロン酸の添加は無効であった。

5 系統の近交系マウスにおける系統内および 系統間の体外受精について

In vitro fertilization within and among five inbred strains of mice.

横山峯介・長谷川孝徳

Minesuke YOKOYAMA and Takanori HASEGAWA

財団法人・実験動物中央研究所

Central Institute for Experimental Animals

Kawasaki 216

Abstract: In this study, we examined the rates of *in vitro* fertilization within and among five inbred strains (BALB/cA, C3H/HeJ, C57BL/6J, DDD, NC) of mice. The rates of fertilization was significantly low when C3H/HeJ eggs were inseminated with BALB/cA spermatozoa (68%), but other combinations resulted in high fertilization rates (88-100%). The rates of polyspermic eggs were different among various combinations of strains, being low with spermatozoa from BALB/cA and C57BL/6J, as compared with spermatozoa from C3H/HeJ and NC; and low with eggs from C57BL/6J, but high with eggs from BALB/cA, DDD and NC.

緒 言

マウス卵の体外受精は、1968年 Whittingham¹⁾により交尾メスの子宮から採取した精子を用いて、また、1969年 Iwamatsu and Chang²⁾によりオスの精巣上体尾部から直接採取した精子を用いて確実な成功例が報告されて以来、受精現象や卵と精子の相互作用を調べる研究手法としてのみならず、交尾行動をとることのできない繁殖不能なミュータント系の子孫を得る方法として利用されてきた^{3, 4)}。さらに近年は、受精卵や初期胚に種々の操作を施す発生工学の研究のための材料を効率的に得る方法としても応用されている⁴⁾。

本実験では、各種系統マウスの繁殖生理学的な特性を知るとともに、その有効利用をはかる目的の一環として、5 系統の近交系マウスの系統内および系統間で体外受精を行い、

その受精率を調べた。

材料および方法

動物：当研究所で維持・生産されたBALB/cA, C3H/HeJ, C57BL/6J, DDDおよびNCの5系統の近交系マウスを使用した。なおメスは2-4ヶ月齢で、オスは3-6ヶ月齢で実験に供した。

飼育条件：動物室は6時点灯・20時消灯の14時間明:10時間暗とし、温度 $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度50-60%に調整した。動物の飼育はプラスチック製ケージで、床敷はチップを用いた。飼料は固形飼料（日本クレア:CA-1）を、水は水道水を自由摂取させた。

培養液：豊田ら⁵⁾によって報告されたTYH液を用いた。使用に際しては、0.4mlをプラスチックシャーレ(35 × 15mm)に分注して上面をパラフィンオイルで被い、一晩炭酸ガス培養装置内(37°C ; 5%炭酸ガス, 95%空気)に静置し、温度と気相を平衡とした。

体外受精：体外受精は、豊田ら^{5, 6)}の方法に準じて行った。卵はメスマウスに4.0iuのPMSGとhCGを48時間間隔で腹腔内注射し、hCG注射後16-17時間に卵管膨大部より採取して培養液中に導入した。精子は精巣上体尾部から採取し、培養液に懸濁して1時間インキュベートした後に媒精に供した。媒精は卵を含む0.4mlの培養液に5-10μlの精子液を加えて行った。受精の場の最終精子濃度は、元の精子液濃度と加えた精子液量から $100-300/\mu\text{l}$ と推定される。媒精を行ったシャーレは直ちに炭酸ガス培養装置内に戻し、4-6時間培養した。

検査：媒精後4-6時間にシャーレを取り出し、卵は0.1%ヒアルロニダーゼ処理で裸化した後に、ホールマウント標本として位相差顕微鏡下で観察した。また、必要に応じてホルマリン固定をしてラクモイド染色を行い、生標本では観察が不可能な卵の染色体や侵入精子の頭部の変化を再び検査した。判定基準としては、精子が卵の透明帯を通過したすべてのものを精子侵入卵とし、卵細胞質内に精子の侵入の認められたものを受精卵とした。さらに、細胞質内に2個以上の精子が認められたものを多精子受精卵とした。

統計処理：精子侵入率と受精率は χ^2 -検定を行い、有意差を求めた。

結果および考察

各系統マウスの系統内および系統間の体外受精成績は、Table 1に示すとおりである。精子侵入率についてみると、系統内では88.1-100%、系統間では86.0-100%の範囲であった。すなわち、系統内ではC57BL/6J精子とC57BL/6J卵との組み合わせで88.1%、また、系

系統間ではBALB/cA 精子とC3H/HeJ 卵との組み合わせで86.0% と、それぞれ最も低い値であったが、他の組み合わせとの間には有意な差はみられなかった。

受精率については、系統内では88.1-100% と、精子侵入率と同様に有意な差はみられなかった。しかし、系統間におけるBALB/cA 精子とC3H/HeJ 卵との組み合わせでは68.0% と低い値が得られた。この値は、BALB/cA 精子と他の4 系統の卵、ならびにC3H/HeJ 卵と他の4 系統の精子との組み合わせで得られた成績(87.5-99.1%)と比較すると有意に低いものであった($P < 0.05$)。受精率の低かった原因としては、卵細胞質内への精子侵入が不成立に終わったこと、あるいは精子の侵入時期の遅れによることなどが考えられる。本実験では、媒精後4-6 時間に、卵の染色体と侵入精子の頭部の変化、ならびに雌雄前核の形成を調べたが、BALB/cA 精子とC3H/HeJ 卵との組み合わせで得られた受精卵には、精子が侵入して間もない、染色体が第2成熟分裂の後期～終期で頭部膨大化精子を持つものが29.4% (30/102)の値で認められた。また、BALB/cA の系統内の組み合わせでも25.0%(28/112)と高い値であったが、その他の組み合わせではすべて0-5%の範囲であり、前核期の受精卵が大多数を占めた。このことから、BALB/cA 精子とC3H/HeJ 卵との組み合わせでみられた低い受精率は、精子侵入時期の遅延による可能性が推察された。しかし、BALB/cA 精子でもC57BL/6J, DDDならびにNC卵との組み合わせでは、受精卵の95%以上のものが前核期であり、精子侵入時期の遅れはとくに認められなかった。

各組み合わせにおける多精子受精率は、Table 1 に示すとおりである。それぞれの系統の組み合わせによって差がみられ、BALB/cA とC57BL/6Jの精子を用いた組み合わせでは低く、C3H/HeJ とNCでは高い多精子受精率であった。また、C57BL/6Jの卵を用いた組み合わせでは低かったが、BALB/cA, DDDならびにNCでは高い値であった。

Parkening とChang⁷⁾ は、マウスの体外受精率には系統差があり、C3H, CD-1(outbred)ならびに交雑F1の精子は高いが、C57BL/6 精子は有意に低いことを報告している。また、守田ら⁸⁾ は、4 系統の近交系と2 系統のアウトブレッドを用いて体外受精を行い、受精率と受精卵の初期発生速度に系統差のあることを報告しているが、これによれば C57BLは他の系統に比べて受精率が低く、初期発生速度も遅い。しかし、本実験ではC57BL/6J精子の受精率がとくに低いという結果は得られなかった。これについては現時点では明確ではないが、使用した動物が異なることや実験の実施条件の違いなどが考えられる。

以上のごとく、本実験で用いた5 系統の近交系マウスの系統内および系統間の体外受精率は、ごく一部の組み合わせを除けば、非常に高いことが知られた。また、多精子受精率

Table 1. *In vitro* fertilization of mouse eggs with epididymal spermatozoa from different strains of mice.

<u>Gametes</u>		No. of eggs	No. of penetrated examined	No. of fertilized eggs (%)	No. of polyspermic eggs (%)	※
Sperm	Eggs					
BALB/cA	BALB/cA	116	115(99.1)	112(96.6)	5 (4.5)	
	C3H/HeJ	150	129(86.0)	102(68.0)	3 (2.9)	
	C57BL/6J	101	98(97.0)	96(95.0)	0 (0)	
	DDD	137	133(97.1)	126(92.0)	2 (1.6)	
	NC	118	117(99.2)	111(94.1)	4 (3.6)	
C3H/HeJ	BALB/cA	120	120(100.0)	118(98.3)	16 (13.6)	
	C3H/HeJ	112	111(99.1)	111(99.1)	12 (10.8)	
	C57BL/6J	102	102(100.0)	102(100.0)	5 (4.9)	
	DDD	118	118(100.0)	118(100.0)	15 (12.7)	
	NC	105	105(100.0)	105(100.0)	23 (21.9)	
C57BL/6J	BALB/cA	104	104(100.0)	104(100.0)	6 (5.8)	
	C3H/HeJ	120	109(90.8)	105(87.5)	5 (4.8)	
	C57BL/6J	126	111(88.1)	111(88.1)	1 (0.9)	
	DDD	108	108(100.0)	108(100.0)	11 (10.2)	
	NC	113	109(96.5)	109(96.5)	7 (6.4)	
DDD	BALB/cA	126	124(98.4)	124(98.4)	21 (16.9)	
	C3H/HeJ	121	115(95.0)	115(95.0)	9 (7.8)	
	C57BL/6J	97	95(97.9)	95(97.9)	7 (7.4)	
	DDD	115	108(93.9)	106(92.2)	5 (4.7)	
	NC	118	118(100.0)	117(99.2)	18 (15.4)	
NC	BALB/cA	128	117(91.4)	116(90.6)	20 (17.2)	
	C3H/HeJ	120	118(98.3)	118(98.3)	12 (10.2)	
	C57BL/6J	122	121(99.2)	121(99.2)	5 (4.1)	
	DDD	108	106(98.1)	105(97.2)	23 (21.9)	
	NC	107	107(100.0)	107(100.0)	21 (19.6)	

※ Percentage was polyspermy to fertilized eggs.

には、使用する精子ならびに卵により、明らかな系統差のあることも認められた。

謝 辞

本論文を作成するにあたり有益なご助言と御校閲をいただいた東京大学医科学研究所 豊田 裕教授に感謝いたします。本研究の一部は、文部省科学研究費・一般研究(A)No. 01440089によって行われた。

文 献

- 1) Whittingham, D. G. : Fertilization of mouse eggs *in vitro*. Nature. 220, 592. 1968.
- 2) Iwamatsu, T. and Chang, M. C. : *In vitro* fertilization of mouse eggs in the presence of bovine follicular fluid. Nature. 224, 919. 1969.
- 3) 鈴木宏志、新谷参郎、富樫 守、宮井達也、岡本道生 : 肥満性糖尿病(db/db)マウスの体外受精と産仔への発生能. 家畜繁殖誌. 33, 96. 1987.
- 4) 横山峯介、勝木元也、野村達次 : トランスジェニックマウスの研究を支える周辺技術. 実験医学. 6, 246. 1988.
- 5) 豊田 裕、横山峯介、星 冬四郎 : マウス卵子の体外受精に関する研究. I, 精巢上体精子による受精成績. 家畜繁殖誌. 16, 147. 1972.
- 6) 豊田 裕、横山峯介、星 冬四郎 : マウス卵子の体外受精に関する研究. II, 精子侵入時期に及ぼす精子体外培養の効果. 家畜繁殖誌. 16, 152. 1972.
- 7) Parkening, T. A. and Chang, M. C. : Strain differences in the *in vitro* fertilizing capacity of mouse spermatozoa as tested in various media. Biol Reprod. 15, 647. 1976.
- 8) 守田光代、丹羽皓二、入谷 明 : マウス体外受精卵の初期発生速度に関する系統間比較. 日本畜産学会第66回大会講演要旨集. P58. 1977.

低浸透圧培養液をもちいたラット初期胚の
体外発育に及ぼすリン酸塩および
グルコース除去の影響

Effects of the removal of phosphate and glucose on in vitro development
of rat eggs under the low osmotic pressure medium

橋 詰 良 一 伊 藤 雅 夫*

Ryoichi HASHIZUME and Masao ITO *

東京農業大学生物産業学部生物工学研究室

* 日本大学医学部衛生学教室

Laboratory of Biotechnology, Faculty of Bioindustry,
Tokyo University of Agriculture.

*Laboratory of Hygiene, Faculty of Medicine,
Nihon University.

Abstract: Four-cell and two-cell rat eggs were cultured under the low osmotic pressure medium at 190mOsM in the absence of phosphate and glucose(P.G. free medium). The results were compared with the data obtained with the medium at 308mOsM, 190mOsM in the presence of phosphate and glucose(190mOsM medium), and the P.G. free medium supplemented with EDTA (EDTA medium). To make a comparison with the rat, two-cell mouse eggs were cultured with the same medium. The results obtained were as follows.

1) Four-cell eggs grew into blastocyst in the 190mOsM medium, P.G. free medium and EDTA medium. The maximam growth rate into blastocyst was obtained with the P.G. free medium ; 71.3 %. Furthermore, two-cell eggs also grew into blastocyst in the P.G. free medium and

EDTA medium. These results indicated that "in vitro rat two~four-cell block" can be overcome with the medium at 190mOsM in the absence of phosphate and glucose.

2) As for mice, the highest growth rate from two-cell eggs into blastocyst was obtained with the 308mOsM medium. No growth into hatching blastocyst was observed in the P.G. free medium. This indicated that there was a difference in optimum condition for in vitro development of eggs between rats and mice.

3) In order to test the ability of cultured rat eggs to continue normal development, blastocyst grown from the two-cell stage in vitro were transferred to recipient female. Two-cell eggs cultured with the P.G. free medium were found to have the ability of normal development.

緒言

哺乳動物胚の培養は、Whitten¹⁾ が牛アルブミンを添加した培養液を用いてマウス8-細胞期胚を胚盤胞まで発育させて以来、多くの研究がなされてきており、マウス胚においては1-細胞期から連続して胚盤胞まで高率に発育させることができ²⁾、さらに、その胚を移植して正常な産仔を得ることができる³⁾。しかし、マウス以外の実験動物においては、ウサギを除いて、いまだ培養法は確立されておらず、特に各種実験に汎用されているラットの初期胚培養は8-細胞期以前からは困難であるとされている⁴⁻⁶⁾。すなわち、ラット胚は1-細胞期から培養すると2~4-細胞期で発育停止(2~4-cell block)が起き、胚盤胞まで発育させることはできない。そのため従来までの培養は8-細胞期以降からに限られており⁷⁻¹⁰⁾、8-細胞期以前の初期胚培養法の確立が早急に望まれているのが現状である。

最近、岸ら¹¹⁾ は前核期卵を胚盤胞に発育させたと報告しているが、その発育率は20.1%と低く、また、いまだ生存産仔を得ていない。著者らは従来からラット胚に起きる2~4-cell blockの問題について検討しており、培養液の浸透圧を極端に低張(190mOsM) にすることにより最高約48% の4-細胞期胚を胚盤胞に発育させ、偽妊娠雌への移植により生存産仔を得ることができた¹²⁻¹³⁾。

本報告は、培養成績の改善を目的に、従来の低浸透圧培養液からさらに、リン酸塩とグルコースを除いて2-および4-細胞期胚の培養を検討したものである。

材料および方法

本実験には当研究室で自家繁殖したSD系の成熟未経産雌ラットを用い、臍スマア検査により正しい性周期を示した動物のみ抽出し実験に供した。培養に用いた胚は全て自然排卵由來のもので、発情前

期のスメア像を示した動物を交配し、翌朝膣栓の有無により交尾を確認した。交尾確認日をday 1とし、day 2の18時～19時に2細胞期胚、day 3の18時～19時に4細胞期胚をそれぞれ卵管から採取し

Table 1. Composition of media used to culture rat eggs

Component	Concentration(g/l)
NaCl	Varied ¹⁾
KCl	0.356
CaCl ₂ · 4H ₂ O	0.311
KH ₂ PO ₄	0.162(Removed) ²⁾
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.294
NaHCO ₃	2.106
B.S.A.	3.000
Glucose	1.000(Removed) ²⁾
Na-Pyruvate	0.028
Na-Lactate	2.802

- 1) The NaCl levels used to give calculated osmolarities of 190 and 308mOsM were 1.904 and 5.353g/l, respectively.
 2) When phosphate and glucose were removed from the basic medium, the NaCl levels used to adjust calculated osmolarities of 190mOsM were 2.120g/l.

た。培養液はBiggers¹⁴⁾の液を修正したものを基本とし、NaCl量を増減して308 および190mOsM 浸透圧液を作成した。また、培養液中のリン酸塩(KH₂PO₄)とグルコースを除去した190 mOsM液(P.G. 除去液)および同液にEDTAを添加した液を作成した(Table 1)。それぞれの培養液は調整したのち濾過

滅菌し、あらかじめ培養気相内で平衡にした後プラスチックベトリ皿(35 × 10mm)に0.1 mlずつ分取し、その上を流動パラフィンで覆って使用した。培養気相はCO₂ 5%, 空気95% とし、湿度約100%, 温度37°Cで、2細胞期胚は95～96時間、4細胞期胚は62～63時間培養した。培養後、2細胞期から胚盤胞に発育した胚を一部偽妊娠雌子宮(day 4)に移植し胚の正常性を調べた。なお、前記培養液でCF #1系マウスの2細胞期胚も培養し、ラットの成績と比較検討した。

結果

308, 190mOsM, P.G.除去液およびEDTA 添加液を用いて4細胞期胚を培養した結果は、Table 2 およびFig. 1 に示した。胚盤胞への発育は血清とほぼ等張の308mOsM では全く認められず、極端に低張にした190mOsM 液で前報とほぼ同様の発育率(約40%)が得られた。さらに、同液からリン酸塩とグルコースを除いたP.G.除去液では、より大幅な発育率の改善が認められ、約71% の胚が胚盤胞に発育し、190mOsM 液との間に統計的な有意差が認められた。また、EDTA添加液でも約63% の胚が胚盤胞に発育し、有意な增加が認められたが、P.G.除去液との間に差は認められなかった。

一方、2細胞期胚を308, 190mOsM, P.G.除去液およびEDTA 添加液で培養した成績はTable 3 およびFig. 2 に示した。2細胞期胚は4細胞期胚の培養とは異なり、胚盤胞の発育は、190mOsM 液でも認められなかった。しかし、P.G.除去液およびEDTA 添加液でそれぞれ15.3および24.1% の胚が胚盤胞に発育し、培養液からリン酸塩とグルコースを除くことにより、いわゆる2-cell blockを乗り越えることが出来た。なお、EDTA添加液とP.G.除去液との間に統計的な有意差は認められなかつたが、一段階以上発育を認めた胚(発育胚率、56.9%) および胚盤胞まで発育した胚の割合はいずれもEDTA添

Table 2. In vitro culture of rat four-cell eggs in various medium

Medium	No. of eggs cultured	No. of eggs developed to				Total	No. of ¹⁾ eggs degen. ⁷⁾		
		8-cell	morula	Blastocyst	Total				
308 mOsM	33	3(9.1)				3(9.1)	30(90.9)		
190 mOsM	74	2(2.7)	15(20.3)	2(2.7)	15(20.3)	12(16.2)	29(39.2)	46(62.2)	28(37.8)
190 mOsM P.G. free ²⁾	188	4(2.1)	30(16.0)	11(5.9)	39(20.7)	84(44.7)	134(71.3)	168(89.4)	20(10.6)
190 mOsM P.G. free EDTA ³⁾	46	10(21.7)	3(6.5)	9(19.6)	17(37.0)	29(63.0)	39(84.8)	7(15.2)	

1) Including intact 4-cell eggs 2) P: KH₂PO₄ G: Glucose 3) EDTA: 100 μm

4) Ear.bla.: Early blastocyst 5) Bla.: Blastocyst 6) Ex.bla.: Expanded blastocyst

7) degen.: degeneration Eggs were cultured for 63 hr.

*: Compared with the 190 mOsM medium, significantly different (P < 0.05).

**: Compared with the 190 mOsM medium, significantly different (P < 0.01).

Compared with the P.G. free medium, the EDTA medium were not significantly different.

Table 3. In vitro culture of rat two-cell eggs in various medium

Medium	No. of eggs cultured	No. of eggs developed to				Total	No. of ¹⁾ eggs degen. ⁷⁾			
		3-4cell	8-cell	morula	Blastocyst					
308 mOsM	44	2(4.5)				2(4.5)	42(95.5)			
190 mOsM	110	51(46.4)				51(46.4)	59(53.6)			
190 mOsM P.G. free ²⁾	236	29(12.3)	7(3.0)	30(12.7)	11(4.7)	18(7.6)	7(3.0)	36(15.3)	102(43.2)	134(56.8)
190 mOsM P.G. free EDTA ³⁾	58	9(15.5)	1(1.7)	9(15.5)	2(3.4)	7(12.1)	5(8.6)	14(24.1)	33(56.9)	25(43.1)

1) Including intact 2-cell eggs 2) P: KH₂PO₄ G: Glucose 3) EDTA: 200 μm 4) Ear.bla.: Early blastocyst

5) Bla.: Blastocyst 6) Ex.bla.: Expanded blastocyst 7) degen.: degeneration

Eggs were cultured for 96 hr.

Compared with the P.G. free medium, the EDTA medium were not significantly different.

加液で高かった。

Table 4 にはラット胚と比較するため、マウス2-細胞期胚を308, 190mOsMおよびP.G.除去液で培養した成績を示した。Table から明らかのように、ラット胚とは全く逆の発育傾向が認められ、胚盤胞への発育は308mOsMで100%と高く、190mOsMおよびP.G.除去液では50%と有意に低かった。また、脱

出胚盤胞はP.G.除去液では全く認められず、培養液からのリン酸塩とグルコースの除去はマウス胚の

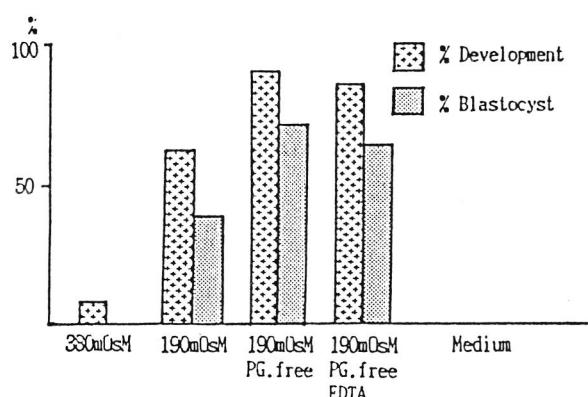


Fig.1 In vitro culture of rat four-cell eggs

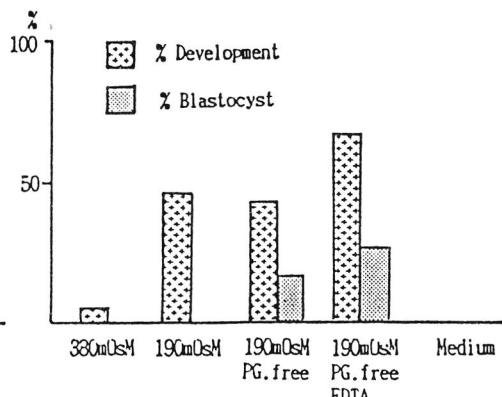


Fig.2 In vitro culture of rat two-cell eggs

Table 4. In vitro culture of mouse two-cell eggs in various medium

Medium	No. of eggs cultured	No. of eggs developed to Blastocyst				No. of ¹⁾ eggs degen. ⁷⁾
		Ear.bla. ³⁾	Bla. ⁴⁾	Ex.bla. ⁵⁾	Hat.bla. ⁶⁾	
308 mOsM	36			36(100)	36(100)	
190 mOsM	20		6(30.0)	4(20.0)**	10(50.0)**	10(50.0)
190 mOsM P.G. free ²⁾	60	2(3.3)	10(16.7)	18(30.0)		30(50.0)** 30(50.0)

1) Including intact 2-cell eggs 2) P: KH₂PO₄, G: Glucose

3) Ear.bla.: Early blastocyst 4) Bla.: Blastocyst

5) Ex.bla.: Expanded blastocyst 6) Hat. bla.: Hatching blastocyst

7) degen.: degeneration Eggs were cultured for 72 hr.

**: Compared with the 308 mOsM medium, significantly different ($P < 0.01$).

発育に不適当であることが示された。

Table 5 には P.G. 除去液で2-細胞期胚から胚盤胞まで発育させた胚を偽妊娠雌へ移植した成績を示した。移植した胚数に対する生存仔の割合は20.7%と低く正常性に問題を残したが、前報の4-細胞期胚の培養につづき、2-細胞期胚の培養からも低率ながら生存仔の出産に成功した。

Table 5. Viability of blastocyst developed from two-cell eggs cultured with the medium at 190mOsM in the absence of phosphate and glucose

No of recip. ¹⁾	% of preg. fe. ²⁾	No of bl. trans. ³⁾	No of implants	% of implants	No of live fe. ⁴⁾	Viability (%)
4	75.0	29	7	24.1	6	20.7

1) recipient 2) pregnant females 3) blastocyst transferred

4) live fetuses

考察

哺乳動物胚の培養はマウスを中心に研究が進められ、現状ではマウス胚の培養法はほぼ確立したとも言えよう。しかし、単純な化学組成の培養液で1-細胞期から胚盤胞まで体外培養できるマウスはむしろ特殊な存在であり、マウス以外の動物ではそれぞれ種特異的な培養法が検討されている^{9), 15)}。浸透圧条件については、Table 2, 3および4から明らかなように、マウスにおいては308mOsMが、ラットにおいては190mOsMが最も胚盤胞への発育率が高く、両種が全く逆の浸透圧条件を至適とすることが示される。すなわち、著者らが従来から行っている低浸透圧培養は、ラットのこのような種特異性を考慮して開発したものであり、前報¹³⁾では低浸透圧培養液を用いて4-細胞期胚を47.8% 胚盤胞に発育させた。本実験ではさらに同液からリン酸塩とグルコースを除去することにより71.1% の4-細胞期胚を胚盤胞に発育させることができ、さらに、2-細胞期胚も24.1% 胚盤胞に発育させることができた。従来、報告されているラット胚の培養成績では、高率に胚盤胞まで発育させ得るStageは初期8-細胞期からであり⁴⁻⁶⁾、それらの報告と比べると本実験の成績は極めて良好で画期的なものと言える。また、2-細胞期から胚盤胞に発育した胚を移植した結果、移植胚数に対する生存仔の割合は20.7%と低く総体的には胚盤胞の正常性にいまだ問題があるものと考えられたが、前報¹³⁾の4-細胞期胚の培養につづき、2-細胞期胚の培養からも低率ながら生存仔が得られる事がわかった(Table 5)。

低浸透圧が発育に有効に働く機序については今のところ不明であるが、胚は低浸透圧液に暴露されると直ちに膨化を始め、約1~2分で割球の判別が不可能なまでに膨満する。その後、約30分前後ではほぼ正常形態に回復するが、著者らはこの一過性に起きる胚の極度の膨化が胚細胞の活性化をうながし発育を促進するものと推察している。しかし、本実験で用いた培養液は血清や卵管液の浸透圧¹⁶⁾と比べるとやはり極端に低張であり、胚の発育環境としてはむしろ異常であろう。Whitten¹⁷⁾は培養気相中の酸素分圧が、また、Bavister ら¹⁸⁾は培養液中のpHが至適浸透圧を変化させる事を報告しており、著者らは今後、浸透圧とこれらの因子との相互作用を考慮して、さらに慎重に浸透圧条件を検討してゆく所存である。

リン酸塩とグルコースが初期胚培養に発育抑制作用をもつことは、ハムスターを使って詳細に研究されている。すなわち、Schini ら¹⁹⁾はハムスター2-細胞期胚の発育Blockは、培養液中のリン酸塩とグルコースが誘発しているとし、両成分を除くことにより25~75% の2-細胞期胚が8-細胞期および桑実胚に発育したとしている。Seshagiri ら²⁰⁻²¹⁾も同様の結果をハムスター8-細胞期胚の培養で報告しており、8-細胞期胚は2-細胞期胚と比べてリン酸塩の抑制作用に鈍感であるとしている。マウスにおいては、Chatot ら²²⁾は、1-細胞期胚の培養にグルコースは発育抑制作用を持つとしているが、8-細胞期以降ではグルコースは有効に利用されることが報告されている²³⁾。ラットにおいては、2-

および4-細胞期胚の発育にリン酸塩とグルコースが発育抑制的に働いていることは明らかであり、培養液から両成分を除去することにより大幅な発育率の改善が認められた (Table 2~3)。しかし、Zhang ら⁸⁾は8-細胞期胚の培養にはリン酸塩とグルコースは抑制作用を持たないことを報告しており、両成分の作用発現には動物種や胚の発育Stage により特異性があるものと考えられる。

リン酸塩とグルコースが胚発育をBlock する機序についてはいまだ明らかではないが、Schini ら¹⁹⁾およびSeshagiri ら²⁰⁻²¹⁾はリン酸塩が解糖系酵素を賦活化することや、グルコースが解糖系を刺激することなどから解糖作用が促進され、その結果としてミトコンドリアの呼吸代謝が抑制されて胚の発育抑制が起きるものと推察している。解糖作用の亢進がミトコンドリアの呼吸を阻害する現象は、培養腫瘍細胞で古くから報告されているが²⁴⁾、胚においてその発現を実証するためには、解糖系酵素の活性度合や胚の酸素取り込み量測定等のより詳細な検討が必要となろう。

文献

- 1) Whitten, W.K. (1956). Culture of tubal mouse ova. *Nature*, 177, 96.
- 2) Abramczuk, J., Solter, D. and Koprowski, H. (1977). The beneficial effect of EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium. *Dev. Biol.*, 61, 378-383.
- 3) Suzuki, H. and Toyoda, Y. (1986). Normal young from in vitro fertilized mouse embryos developed in a medium supplemented with EDTA and transferred to pseudopregnant recipients. *J. Mamm. Ova Res.*, 3, 78-85.
- 4) Folstad, L., Bennet, J.P. and Dorfman, R.I. (1969). The in vitro culture of rat ova. *J. Reprod. Fert.*, 18, 145-146.
- 5) Mayer, J.F.Jr and Fritz, H.I. (1974). The culture of preimplantation embryos and the production of allophenic rats. *J. Reprod. Fert.*, 39, 1-9.
- 6) Wada, K., Horiuchi, T., Sugawara, S. and Masaki, J. (1981). Culture of rat eggs in vitro. *Tohoku J. Agr. Res.*, 32, 101-109.
- 7) 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, 506-5011.
- 8) Horiuchi, T., Ohta, M., Kojima, M., Takahasi, 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.

- 9) Zhang, X. and Armstrong, D.T. (1990). Presence of amino acids and insulin in a chemically defined medium improved development of 8-cell rat embryo in vitro and subsequent implantation in vivo. *Biol. Reprod.*, 42, 662-668.
- 10) 松本浩道, 菅原七郎, 正木淳二 (1991). 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— 哺乳卵学誌, 8, 21-26.
- 11) 岸淳二, 野田洋一, 成本勝彦, 馬岡 陽, 森 崇英 (1991). 各種培養条件下でのラット前核期胚発育の検討 第32回哺乳卵学会講演要旨, 73.
- 12) 橋詰良一, 伊藤雅夫 (1984). ラット、ハムスター及びマウス初期胚の体外発育におよぼす浸透圧の影響 哺乳卵研誌, 1, 69-70.
- 13) 伊藤雅夫, 橋詰良一, 種市衣里子, 丸瑠璃子 (1986). ラット初期胚の体外培養における浸透圧および Na^+/K^+ 比の影響 哺乳卵研誌, 3, 128-133.
- 14) Biggers, J.D., Whitten, W.K. and Whittingham, D.G. (1970). The culture of mouse embryos in vitro. In *Methods of mammalian embryology*. (Edited by J.C. Daniel), W.H. Freeman and Company, San Francisco, 86-116.
- 15) Bavister, B.D., Barnett, D.K. and Mckicsnan, S.H. (1991). Hypotaurine stimulates in vitro development of early one-cell hamster embryos to the morula/blastocyst stage. *Biol. Reprod.*, 44, Supplement, 1, 155.
- 16) Stambaugh, R., Noriega, C. and Mastroianni, D.Jr. (1969). Bicarbonate ion; the corona cell dispersing factor of rabbit tubal fluid. *J. Reprod. Fert.*, 18, 51-58.
- 17) Whitten, W.K. (1970). Nutrient requirements for the culture of preimplantation embryo in vitro. *Advances in the Biosciences*, 6, 129-141.
- 18) Bavister, B.D., Leibfried, M.L. and Lieberman, G. (1983). Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. *Biol. Reprod.*, 28, 235-247.
- 19) Schini, S.A. and Bavister, B.D. (1988). Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. *Biol. Reprod.*, 38, 1183-1192.
- 20) Sheshagiri, P.B. and Bavister, B.D. (1989). Glucose inhibits development of hamster 8-cell embryos in vitro. *Biol. Reprod.*, 40, 599-606.
- 21) Sheshagiri, P.B. and Bavister, B.D. (1989). Phosphate is required for inhibition by glucose of development of hamster 8-cell embryos in vitro. *Biol. Reprod.*, 40, 607-

614.

- 22) Chatot, C.L., Ziomek, C.A., Bavister, B.D., Lewis, J.L. and Torres, I. (1989). An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J. Reprod. Fert.* 86, 679-688.
- 23) Brinster, R.L. (1967). Carbon dioxide production from glucose by the preimplantation mouse embryo. *Exp. Cell Res.* 47, 271-277.
- 24) Crabtree, H.G. (1929). Observation on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem. J.*, 23, 536-545.

HMGによるマウスの過排卵誘起

Induction of Superovulation in mice using HMG.

種市衣里子・木村 新・伊藤雅夫・橋詰良一*・石島芳郎*

Iriko TANEICHI, Arata KIMURA, Masao ITO, *Ryoichi HASHIZUME,

and *Yoshiro ISHIJIMA

日本大学医学部衛生学教室, *東京農業大学生物産業学部

Department of Hygiene, School of Medicine, Nihon University,

*Faculty of Bioindustry, Tokyo University of Agriculture.

Abstract : The optimum doses of human menopausal gonadotropin (HMG) and optimum time of HMG administration at the estrous cycle for superovulatory response in CF#1 mice were examined. Female mice, regardless the stage of their estrous cycle, were given subcutaneously of 1, 5, 10 and 15IU of HMG followed by 5IU hCG 48hr later. Furthermore, the female mice at proestrus, estrus, metestrus, diestrus-I and diestrus-II of the estrous cycle were given 10IU HMG followed by 5IU hCG 48hr later. Maximum superovulatory response were obtained in the group receiving 10IU HMG at diestrus-II of the estrous cycle.

緒 言

マウスの過排卵誘起は、すでにFSH（卵胞刺激ホルモン）の給源としてPMSG（妊娠馬血清性性腺刺激ホルモン）を投与して、ついでLH（黄体形成ホルモン）の給源としてhCG（ヒト総毛性性腺刺激ホルモン）を投与する方法が確立している⁶⁾。そのためか、マウスでは他の性腺刺激ホルモンでの過排卵誘起の検討はほとんどなされていない。過排卵誘起法を研究用卵子の生産に活用するには有効な代替のホルモンがあると便利である。

近年、PMSGに代わるFSHの給源としてヒトの誘起排卵に多用されているHMG（閉経期婦人尿性性腺刺激ホルモン）がウシ^{11, 12)}、ウサギ¹³⁾、ラット⁵⁾の過排卵誘起に用いられ、PMSGに比べて安定した排卵反応が得られることが報告されている。

本実験では、マウスの過排卵誘起にHMGが有効かどうか検討した。

材料および方法

実験には、日本大学医学部衛生学教室が閉鎖集団で維持しているCF #1系マウスの成熟未経産雌（2～3カ月齢）を用いた。飼料は特殊繁殖用（CMF、オリエンタル酵母）を用い、水とともに不斷に給与した。飼育環境は室温 $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ とし、照明は朝6時から夕方6時までの12時間とした。

実験は次の3つに分けて行った。

1) HMG（ヒュメゴン、オルガノン社）の適量を決定するため、1、5、10および15IUのHMGをマウスの発情周期を考慮せずに、17:00に皮下注射し、48時間後にhCG（動物医薬品検査所標準品）5IUを皮下注射して直ちに交配した。翌朝、臍スマア中の精子の有無により交尾を確認し、hCG投与後48時間に屠殺開腹して卵管内卵子を灌流した。

2) HMGの発情周期における投与適期を調べるため、発情周期が5日のマウスを抽出し、HMG 10IU（実験1の結果から）を、発情前期（I期）、発情期（III期）、発情後期（IV期）、発情休止期-I（V-1期）、発情休止期-II（V-2期）の5時期に投与した。いずれの場合も、HMG投与後48時間にhCG 5IUを投与・交配し、48時間後に屠殺開腹して卵管内卵子を灌流した。

3) 発情周期のV-2期（実験2の結果から）にHMG 10IUを投与し、48時間後にhCGを投与・交配して、hCG後48時間に採取した2細胞期胚の正常性を、体外培養法を用いて胚盤胞への発生率で調べた。培養液はBiggerら(1971)の液¹⁾を基本とし、浸透圧を270 mOsmに調整したものを用いた。培養手順はBrinster(1963)の方法²⁾に従い、CO₂ 5%、空気95%の気相下で72時間培養した。なお、HMGとの比較のために、PMSG 5IU投与後、48時間にhCGを5IU投与して得られた2細胞期胚、ならびに自然排卵で得られた2細胞期胚を同様の方法で培養した。

結果および考察

1) HMGの有効投与量

HMGを発情周期を考慮せずに、1、5、10および15IU投与し、48時間後にhCG 5IUを投与して、交尾および排卵反応を調べた結果、Table 1に示す成績が得られた。

Table 1から明らかなように、HMGの各投与量で、それぞれ、80、60、40および80%の交尾率が得られ、投与量の増加と交尾率には一定の傾向がないことが示された。この処理で得られた交尾率は80%を除いては、従来のCF #1系マウスに対するPMSG-hCG処理に比べて低率であった^{3, 4, 8, 9)}。排卵陽性率は、HMG 5IU投与以上すべて100%を示した。

平均排卵数は、各投与量で、それぞれ12.5、17.3、24.0および20.0個で、10IUまでは投与量の増加

につれて直線的に高くなり、15IUで若干の低下が認められた。こうした投与量によって排卵数が増加し、ある一定量を限度に低下する傾向は、従来のPMSG-hCG処理と同様であった¹⁰⁾。HMG 10IUで得られた平均排卵数24.0個は、従来のPMSG 5IU-hCG 5IU処理でのCF #1系マウスより得られる排卵数を上回った^{7, 8)}。

一方、異常卵出現率は、それぞれ、7.9、16.2、25.0および14.2%で、最も排卵反応の高い10IU投与が高い傾向を示した。一般にPMSG-hCGの適量処理では異常卵出現率は10%前後⁹⁾とされていることからみると、今回のHMG 5～15IUの異常卵の率は高率であった。もっともPMSG処理でも系統によっては高率の場合も報告されている¹⁵⁾。

この投与量反応において、交尾率や異常卵出現率がPMSG処理に比べて高かったのは、発情周期が考慮されていないことが一因とみられた。

Table 1 Effect of HMG at different dose level on copulatory and ovulatory response of mice.

HMG dose (IU)	No. of females used	% of females mating	% of females ovulated	Mean no. of ova ovulated ± S.E.	% of abnormal ova
1	5	80	80	12.5 ± 5.9	7.9
5	5	60	100	17.3 ± 3.3	16.2
10	5	40	100	24.0 ± 15.6	25.0
15	5	80	100	20.0 ± 9.8	14.2

5IU hCG injected at 48hr after HMG.

2) 発情周期におけるHMGの投与適期

この実験では、排卵数の最も高かったHMG 10IU-hCG 5IUを用いて、発情周期における投与適期を検討した。その結果はTable 2に示されるとおりである。

膣スメア像により発情周期をI、III、IV、V-1およびV-2期の5時期に分けてHMGを投与した結果、交尾率は、それぞれ、0、28.6、40.0、66.7および100 %で、V-2期に投与することにより改善が認められた。投与時期により交尾率が改善されることはPMSG投与の場合にも知られているが、この場合はIV期が有効とされている¹⁴⁾。また排卵陽性率は、V-1およびV-2期の投与で100 %を示

Table 2 Effect of treated times of HMG at estrous cycle on copulatory and ovulatory response of mice.

Times of HMG injection at estrous cycle	No. of females used	% of females mating	% of females ovulated	Mean no. of ova ovulated ± S.E.	% of abnormal ova
I	6	0	50	3.5 ± 2.5	42.9
III	7	28.6	57.1	20.0 ± 9.7	0.9
IV	5	40.0	80	26.5 ± 13.5	9.4
V 1	3	66.7	100	27.0 ± 18.4	6.3
V 2	5	100	100	30.6 ± 2.9	0.7

10IU HMG followed 5IU hCG 48hr later.

した。平均排卵数は、IV、V-1およびV-2期に投与した場合に、26.5、27.0および30.6個と上記実験を上回る成績であり、V-2期の投与で最も高い成績が得られた。また、異常卵出現率は、I期を除いて著しく改善され、とくに最高の排卵数を得たV-2期の投与が低率であった。これらの結果は、従来のPMSG-hCG処理より優れた成績であった。

このようにHMG-hCG処理の場合は、処理時期が適切であればPMSG処理に優る方法であることが判明した。その反面、投与時期のチェックが厳密に要求されるので、活用に際してはPMSG処理より煩雑なのが欠点として挙げられる。

3) HMG処理由来胚の正常性

HMGによる過排卵誘起卵の正常性を体外培養法を用いて検討した。その結果は、Table 3に示されるように、HMG投与により得られた2細胞期胚の胚盤胞への発生率は90.3%と高く、比較のために同時に培養したPMSG処理胚の発生率よりもいくぶん高く、自然排卵胚と遜色ない発生率が得られた。したがって、HMGにより過排卵誘起された胚は体外発育においては自然排卵胚と何ら変わりないものと思われた。このことからも、HMGによる過排卵法はPMSGに優る有効な方法であることが伺えた。

Table 3 Comparison of development of mouse 2-cell embryo induced HMG-hCG and PMS-hCG treatment after 72hr in culture.

Treatment	ova	No. (%) of ova developed to						
		cultured	Degene-	2~8	Morula	Early	Blasto-	Total
		rated	cell		blasto.	cyst	Blasto.	blasto.
HMG-hCG	265	5(1.9)	11(4.1)	10(3.8)	9(3.4)	41(15.5)	189(71.3)	239(90.2)
PMS-hCG	208	25(12.0)	0(0)	5(2.4)	35(16.8)	97(46.6)	46(22.1)	178(85.6)
Control*	122	8(6.6)	2(1.6)	1(1.8)	18(14.8)	46(37.7)	47(38.5)	111(91.0)

* Spontaneous ovulation.

文 献

- 1) Bigger, J. D., Whitten, W. K. and Whittingham, D. G. (1971). Methods in mammalian embryology (ed. by Daniel, J. C. Jr.), W. H. Freeman and Company, San Francisco, p.87.
- 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) Edwards, G. S., Wilson, E. D. and Fowler, R. E. (1963). Genetic and hormonal influence on ovulation and implantation in adult mice treated with gonadotrophins. *J. Endocrin.*, 26, 389-399.
- 4) Fowler, R. E. and Edwards, R. G. (1957). Induction of superovulation and pregnancy in mature mice by gonadotrophins. *J. Endocrin.*, 15, 374-384.
- 5) 橋詰良一, 伊藤雅夫, 丸瑠璃子, 小澤英世(1990). HMGによるラットの過排卵誘起. 日不妊会誌, 35, 434-437.
- 6) 石島芳郎(1985). 実験動物における誘起排卵の諸問題. 受精・着床 '84, 191-198.
- 7) 石島芳郎, 佐久間勇次(1977). 性腺刺激ホルモンによるマウスの反復過排卵誘起, 日不妊会誌, 23, 59-63.
- 8) Ishijima, Y. and Watanabe, A. (1970). Effect of estradiol on superovulation in adult mice. *Jour. Agri. Sci., Tokyo Nogyo Daigaku*, 15, 17-22.
- 9) 石島芳郎, 近藤 正, 平林 忠(1969). マウスの産子数増進に関する研究II. PMS注射後交配までの間隔が過剰妊娠に及ぼす影響. 東農大農学集報, 14, 179-182.

- 10) 伊藤雅夫, 横尾芳夫, 関 秀雄, 萩島 浩, 野入五男, 石川明芳(1976). 過排卵処置マウスにおけるPMSおよびHCGの投与量と排卵数の関係. 日大医誌, 35, 117-124.
- 11) Lauria, A., Oliva, O., Genazzani, A. R., Cremonesi, F., Crotti, S. and Barbetti, M. (1982). Improved method to induce superovulation in cattle using human menopausal gonadotrophin(HMG). Theriogenology, 18, 357-364.
- 12) Lauria, A., Genazzani, A. R., Oliva, O., Inaudi, P., Cremonesi, F., Monittola, C. and Aureli, G. (1982). Clinical and endocrinological investigation on superovulation induced in heifer by human menopausal gonadotrophin. J. Reprod. Fert., 66, 219-225.
- 13) 小野寺政一, 石島芳郎(1983). HMGによる家兔の過排卵誘起. 東獣畜誌, 31, 157-161.
- 14) 小野寺政一, 福田正浩, 石島芳郎(1986). マウスの過剰妊娠に及ぼすPMSGの投与時期の影響. 日不妊会誌, 31, 143-145.
- 15) 横山峯介, 日置恭司(1990). 過排卵処理した各種系統マウスの交尾率と正常胚の回収について. 哺乳卵研誌, 7, 89-94.

牛の体外成熟・体外受精卵発生に及ぼす
卵巣の38℃短期保存の影響

Effect of Short-term Preservation of Ovaries at 38°C on the Development
of Bovine Follicular Oocytes Matured and Fertilized in vitro

安部茂樹・長谷川清寿・川平 実

Shigeki Abe, Kiyotoshi Hasegawa and Minoru Kawahira

島根県立畜産試験場 出雲市古志町3775

Shimane Prefectural Institute of Animal Industry, 3775 Koshicho Izumoshi

Abstract: Effect of short-term preservation of ovaries on the development of bovine oocytes matured and fertilized in-vitro was investigated. Bovine follicular oocytes were collected from ovaries that had been preserved in physiological saline for 2.5, 5 and 8h at 38°C. Oocytes surrounded with a compact layer of cumulus cells were cultured for 20-24h, and then inseminated with frozen-thawed spermatozoa capacitated with heparin. At 72h after insemination, oocytes were separated from the cumulus cells but retained in the same culture dish and further cultured up to 8-12 days after insemination.

The proportion of embryos cleaved were significantly higher with oocytes from ovaries preserved for 2.5 and 5h(66%, 266/388 and 62%, 194/313, respectively,) than with those of ovaries preserved for 8h (21.9%, 42/194), ($p<0.01$). Similarly the proportion of embryos developed to blastocysts were significantly higher with embryos from ovaries preserved for 2.5 and 5h (19.9%, 51/256 and 24.7% 48/194, respectively,) than with those of ovaries preserved for 8h (2.4%, 1/42), ($p<0.05$).

Fresh(8) and frozen-thawed(7) blastocysts obtained from ovaries preserved for 5h were transferred nonsurgically to 4(fresh) and 3(frozen-thawed) recipients. Two of the 4 and one of the 3 recipients became pregnant. One live calf was born from a female received fresh embryos.

These results indicate that oocytes from ovaries preserved for 5h at 38°C have the developmental capacity to become calves.

KEY WORDS:Bovine,Oocytes,Fertilization,Preservation,Ovary.

緒 言

牛の完全体外培養系による体外受精(Kaji-hara et al., 1987; Goto et al., 1988; Fukuda., 1990)には、卵巣内にある卵胞卵子を用いるが、この卵胞卵子は、卵巣を摘出後直ちに採取し、培養するのが理想的である (Sato et al., 1977)。しかしながら、摘出卵巣は食肉処理場から実験室までは、35~38°Cの生理食塩水中に入れ輸送している。このため、卵胞卵子採取までには、食肉処理場から実験室まで距離があればかなりの時間を必要とする。

卵子の短期保存に関しては、実験動物 (Chang, 1952; Sherman et al., 1959) および家畜 (Fukui et al., 1984; Aoyagi et al., 1986) で報告されているが、卵巣の短期保存に関しての報告は少なく (Sato et al., 1977; Fukui et al., 1982)、また、卵巣摘出後から卵胞卵子採取までの経過時間による体外受精の報告も少ない (Shioya et al., 1988)。

本実験では、38°Cでの短期間卵巣の保存が完全体外培養系による体外受精における分割率および胚盤胞への発生率に及ぼす影響について検討を試みた。また、得られた新鮮胚および凍結胚の受胎性についても調べた。

材料および方法

1 卵巣内卵胞卵子の採取

屠殺後摘出した卵巣は、抗生物質 (ペニシリン 100U/ml、ストレプトマイシン 100μg/ml、明治製薬) を添加した 38~39°C の生理食塩水を満たした魔法瓶に収容し輸送した。

卵胞卵子の採取は、20G の針を付けた 5ml 容量の注射筒にあらかじめ 0.5ml 修正 PBS を吸入し、ついで 5mm 以下の小卵胞から吸引した。供試卵胞卵子には、採取後の形態検査で卵丘細胞層の緊密なものを選別し用いた。また、供試卵胞卵子は卵巣摘出から採取までの保存時間により、2.5 時間区、5 時間区および 8 時間区の 3 区に区分した。

2 卵胞卵子の成熟培養

吸引採取から媒精までの体外成熟培養液は、仔牛血清 (CS:GIBCO 社) を 10%、ペニシリン 100IU/ml およびストレプトマイシン 0.1mg/ml を添加した 25mM HEPES 緩衝 TCM-199 (Earle 塩:GIBCO) を用いた。選別した卵胞卵子の成熟培養は、流動パラフィン (Mineraloil:SQUIBB) で覆った培養液中に入れ、39°C、5% 炭酸ガス、95% 空気の条件下で 20~24 時間培養した。

成熟培養 20~24 時間後の成熟検査は、一部の卵子を抜き取り、ホールマウント標本を作成後、酢酸オルセインで染色し、位相差顕微鏡で検査した。

3 精子処理

媒精には、島根県が繁養する黒毛和種凍結精液を用いた。精子は 35°C の微温湯中で融解後、牛アルブミン無添加修正タイロード液 (B0 液、Brackett et al., 1975) に 10mM カフェイン (Caffeine-Na-benzoate, C-4144; Sigma) を添加したもの (Caf-B0 液) で 2 回遠沈 (500×g, 5 分) 洗浄した。洗浄精子は、Caf-B0 液で $3.5 \sim 4.0 \times 10^7/ml$ の濃度に調整し、これを精子懸濁液とした。次いで、精子懸濁液は牛血清アルブミンを 20 mg/ml およびヘパ

リン (ノボインダストリーA/S、Parrish et al., 1985) を $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加した修正タイロード液 (BSA-BO液) で等量希釈した後、流動パラフィン下で $100\mu\text{l}$ 小滴にし、 39°C 、5%炭酸ガス、95%空気の条件下で15分間培養し、受精培地とした。

4 媒精、発生培養および分割検査

媒精は、成熟培養20~24時間後に卵子を30~50個ずつ受精培地に移しかえることにより行なった。媒精卵子は6時間後に発生培養液（組成は成熟培養液と同じ）中に移した。一部の卵子を媒精9~10時間後に抜き取り、成熟検査と同様にホールマウント標本を作成後、酢酸オルセインで染色し、位相差顕微鏡で精子の侵入状況を検査した。

発生培養は、一連の成熟培養において卵丘細胞の付着を認め、発生培養液に交換したディッシュ内で行ない、発生培養液の交換は、媒精後72時間から48時間間隔で行なった。

分割検査は、媒精72時間後に卵丘細胞層を除去して行ない、2~4細胞、5~7細胞および8細胞以上の3つに区分した。

5 受胎性の確認

供試新鮮胚の移植時期は、媒精後8日目に得られた胚盤胞および拡張胚盤胞期とした。移植方法は発情後7日目の受胎牛の双角に1個ずつ2個非外科的に行なった。移植液は、20%仔牛血清加修正PBSを用いた。また、移植胚と同時に胚盤胞まで発育した胚は同一ディッシュ内で培養を継続した。供試胚の凍結・融解は、鈴木ら（1983；1984）の方法に準じて行ない、媒精後8日目に得られた胚盤胞および拡張胚盤胞を用いた。良質の胚盤胞および拡張胚盤胞は、10%グリセリンを添加した20%仔牛血清を含むPBSに室温で15分間浸漬し、 0.25ml のストロー内に20%仔牛血清を含む0.25M sucrose液と胚を空気層で区分し吸引した。凍結は、プログラムフリーザ（R-204 プラナー社）で室温から -5°C までを毎分 -1°C 、 -5°C で植氷後5分間保持し、以後は -30°C まで毎分 -0.3°C で冷却し、10分間保持した後、液体窒素中に投入した。凍結した胚は、7~60日間液体窒素中で保存した。移植は、新鮮胚と同様に発情後7日目の受胎牛の双角に1個または2個ずつ、計2個~3個非外科的に行なった。

妊娠診断は、新鮮胚および凍結胚移植後50日目に超音波画像診断装置を用いて行なった。

6 統計処理

成熟率、受精率、分割率および胚への発生率の有意差の検定は、 χ^2 検定法により行なった。

結 果

成熟培養20~24時間後の第2成熟分裂中期の卵の割合は、卵巣保存時間により差が認められ、8時間区28.6%（14/49）は2.5時間区59.6%（31/52）および5時間区56.3%（27/48）に比べ低率であった（ $P<0.01$ ）が、変性細胞ではこれとは逆に、8時間区30.6%（15/49）は2.5時間区3.8%（2/52）および5時間区14.5%（7/48）に比べ高率であった（ $P<0.01$ ）。（Table 1）

媒精後9~10時間で抜き取り検査した受精率は、卵巣保存時間が2.5および5時間区で93.1%（67/72）および90.8%（59/65）であり、有意差は無かったが、8時間区では52.9%（27/51）と低率（ $P<0.01$ ）であった。（Table 2）

Table 1 In vitro maturation of bovine oocytes collected from ovaries preserved at 38°C

Duration of preservation (h)	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes at stage of*				No. (%) of oocytes degenerated
		M I	A - I	T - I	M II	
2.5	52	5 (9.6)	2 (3.8)	6 (11.5)	37 ^a (71.2)	2 ^a (3.8)
5	48	7 (14.5)	4 (8.3)	3 (6.3)	27 ^a (56.3)	7 ^a (14.5)
8	49	9 (18.4)	8 (16.3)	3 (6.1)	14 ^b (28.6)	15 ^b (30.6)

*M I :metaphase I ,A - I :anaphase I ,T - I :terophase I ,M II :metaphase II .

^{a,b} Numbers with different superscripts are significantly different ($p < 0.01$).Table 2 In vitro fertilization of in vitro matured bovine oocytes obtained from ovaries preserved at 38°C for various periods¹⁾

Duration of preservation (h)	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes penetrated			No. (%) of oocytes degenerated
		Total	mono- spermic	poly- spermic	
2.5	72	67 ^a (93.1)	53 ^a (73.6)	14 ^a (19.4)	1 ^a (1.4)
5	65	59 ^a (90.8)	47 ^a (72.3)	12 ^a (18.5)	3 ^a (4.6)
8	51	27 ^c (52.9)	8 ^c (15.7)	19 ^b (37.3)	21 ^c (41.2)

¹⁾Oocytes were matured for 20-24h and then fertilized in vitro.Numbers with different superscripts are significantly different (a,c: $p < 0.01$,a,b: $p < 0.05$).

Table 3 In vitro development of in vitro matured and fertilized bovine follicular oocytes obtained from ovaries preserved at 38°C for various periods

Duration of preservation (h)	No. of trials	No. of oocytes inseminated	No. (%) * of eggs cleaved	No. (%) of embryos at 2-cell	No. (%) 5-cell	No. (%) 8-cell < 7-cell
2.5	9	388	256 ^a (66.0)	100 ^a (39.1)	98 (38.3)	58 (22.7)
5	5	313	194 ^a (62.0)	65 ^a (33.5)	68 (35.1)	61 (31.4)
8	5	192	42 ^b (21.9)	25 ^b (59.5)	11 (26.2)	6 (14.3)

*Percentage of oocytes examined.

**Percentage of oocytes cleaved.

a, bNumbers with different superscripts are significantly different ($p<0.01$).

Table 4 Effect of preservation of ovaries at 38°C on in vitro development of in vitro matured and fertilized bovine oocytes to blastocyst

Duration of preservation (h)	No. of trials	No. of embryos	No. (%) of embryos developed to blastocyst
2.5	9	256	51 ^a (19.9)
5	5	194	48 ^a (24.7)
8	5	42	1 ^b (2.4)

a, bNumbers with different superscripts are significantly different ($p<0.01$).

卵巢保存時間と媒精72時間後の2細胞以上への分割率の関係はTable 3に示した。各時間区での分割率は、2.5時間区で66.0% (256/388)、5時間区で62.0% (194/313)そして8時間区では21.9% (42/192)であり、8時間区での値が低率 ($P<0.01$)であった。分割胚の内2~4細胞胚の割合は(2~4細胞胚/分割胚総数)、2.5および5時間区で39.1 (100/256) ~33.5% (65/194)とほぼ同様であったが、8時間区では59.5% (25/42)であり、8時間区での値が高率 ($P<0.01$)であった。

卵巢保存時間と媒精後7~10日目に胚盤胞へ発生した発生率との関係はTable 4に示した。胚盤胞への発生率は2.5および5時間区では19.9% (51/256)および24.7% (48/194)、8時間区では2.4% (1/42)で分割率の場合と同様に、8時間区と2.5および5時間区の値には有意差 ($P<0.05$)が認められた。

Table 5 Results of transfer of blastocysts derived from bovine oocytes matured, fertilized and cultured in vitro¹⁾

Source of embryos	Recipient No.	Age* of embryos	Pregnancy	
Fresh	1	7, 7	- , -	Return to estrus on day 20
	2	8, 8	- , +	Live calf (37Kg female day 287)
	3	8, 8	- , +	Stillbirth (22Kg male day 295)
	4	7, 7	- , -	Return to estrus on day 21
Frozen-thawed	1	8, 8	- , -	Return to estrus on day 21
	2	8, 8	- , -	Return to estrus on day 22
	3	7, 8, 8	+ , -	Continue to be pregnant

*Day of in vitro insemination = day 0. An embryo was transferred to each uterine horn on Day.

¹⁾Embryos were derived from ovaries preserved at 38°C for 5h.

5時間区において発生した胚の受胎成績はTable 5に示した。発生した8個の胚盤胞は、新鮮胚とし4頭の受胎牛にそれぞれ2胚頸管経由法で移植し、2頭が受胎、1頭から正常な産子を得た。一方、凍結胚18個は、融解後発生培養と同様のディッシュ内で短期間(3~4時間)培養したところ、7個の胚で形態的に生存性が確認できた。この7個の胚を受胎牛1頭あたり2~3個頸管経由法で移植し、1頭が受胎した。

考 察

摘出した卵巢の保存時間は、2.5および5時間区の胚盤胞への発生率から、5時間までは影響は無く、また、5時間区で得た新鮮胚および凍結胚は正常な受胎性があることも確認できた。

卵巢摘出から卵胞卵子の採取までの経過時間が卵子の体外受精後の発生能に及ぼす影響について、Shioyaら (1988) は、採卵を卵巢摘出直後の屠場採卵区と3時間後の実験室採卵区とを比較し、体外成熟および体外受精後の2細胞期以上の胚発生率は屠場採卵区が優れていたが、媒精60時間後に8細胞期以上に発育した胚を家兎卵管に移植したところ胚盤胞への発生率には差が認められなかつたとし、輸送温度の低下および卵巢自体の死後変化の少ない時点で卵子を自然成熟できる環境におくことが、卵子の成熟やその後の2細胞期への発生に好ましいと報告している。本試験の成績でも同様に、卵巢摘出から5時間以内の2.5および5時間区との間の分割率および胚盤胞への発生率には有意な差を認めなかつた。また、体外受精初期胚を卵丘細胞と共に培養した場合の胚盤胞への発生率について、Gotoら (1988) は15.1%およびFukudaら (1990) は9.0%と報告している。本試験の2.5および5時間区の胚盤胞への発生率は、これらの報告とほぼ同様な値であり、卵巢の短期保存は、摘出後5時間までは胚盤胞への発生率には影響は無いものと思われた。さらに、5時間区で得た新鮮胚および凍結胚の受胎性も確認することができた。

未成熟卵子の成熟時間について、Shioyaら (1988) は、15~20時間までの各時間ごとの成熟分裂を確認し、20時間で第2成熟分裂中期の卵子が67%と順調であったことから、体外成熟時間は22時間あれば充分であると報告している。同様にKajiharaら (1987) は、成熟時間を20、22および24時間の3区について比較し、2~4細胞期への発生率は22および24時間区が高率であるが、8細胞期から桑実胚以上の発育率は3区とも差がなく、胚盤胞への発育率は20時間区が24時間区に比べ高率であったとし、これは初期胚の発生で8細胞胚のほとんどが桑実胚に発育することによるとしている。本試験の成熟率の高率であった2.5および5時間区の成績でも同様の傾向が認められ、分割検査時に8細胞期以上の発育を示した胚は両区ともほとんどが胚盤胞に発育した。

一方、卵巢摘出から卵子の成熟培養開始までを8時間とした8時間区においては、2.5および5時間区に比べ分割率および胚盤胞への発生率が有意に低率であった。このことは、卵巢の保存時間が長くなれば第2成熟分裂中期の卵の割合が低下し、退行卵が多くなること (Sato et al., 1977; Fukui et al., 1982) 、媒精70時間後の均等8分割胚の90%は各割球に1核を有し正常であるが、2~4細胞胚ではその率は低下し、2細胞期胚の少なくとも25%が多精子受精であり2~4細胞期胚以後の発生率が低下する (Minamihashi et al., 1986) と報告されていることから、本試験の8時間区の成熟検査においても第2成熟分裂中期への成熟率が低率であったこと、受精検査では2.5および5時間区に比べ多精子受精の割合が高かったことおよび分割検査においても2~4細胞胚への発生率に比べ8細胞胚以上の発生率が極めて低率であったことによると思われた。

従って、本試験条件下での屠畜雌牛の卵巢から卵胞卵子採取までの許容時間は、分割率および胚盤胞への発生率とともに良好な成績を得た、卵巢摘出後5時間までは可能と思われた。

謝　　辞

稿を終えるにあたり、本論文の御指導および御校閲を賜わった東京大学医科学研究所 豊田 裕教授に深謝致します。また、卵巣採取に御協力いただいた島根県食肉公社および島根県食肉衛生検査所の職員の方々に感謝します。

References

- 1) 青柳敬人、岩住安晃、和地秀一、古館 誠、藤井勝巳、福井 豊、小野 斎 (1986) : 牛の胚ならびに卵胞内卵子の非凍結低温下での短期保存について. 家畜繁殖誌, 32, 138-142
- 2) Brackett, B.G., Oliphant, G. (1975) : Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. Biol. Reprod., 12: 260-274
- 3) Chang, M.C. (1952) : Fertilizability of rabbit ova and the effects of temperatures in vitro on their subsequent fertilization and activation in vivo. J. Exp. Zool., 121: 351-381
- 4) Fukuda, Y., Ichikawa, K., Naito, K., Toyoda, Y. (1990) : Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized and cultured with cumulus cells in vitro up to the blastocyst stage. Biol. Reprod., 42: 114-119
- 5) Fukui, Y., Miyamoto, A., Ono, H. (1982) : In vitro maturation of bovine follicular oocytes stored at various temperatures before culture. Jpn. J. Fertil. Sterili., 27: 514-519
- 6) Fukui, Y., Terawaki, Y., Ono, H. (1984) : Lowered maturation rates of bovine follicular oocytes cultured in vitro after one day storage. Res. Bull. Obihiro Univ., 14: 75-80
- 7) Goto, K., Kajihara, Y., Kosaka, S., Koba, M., Nakanishi, Y., Ogawa, K. (1988) : Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from in vitro fertilization of in vitro matured follicular oocytes. J. Reprod. Fert., 83: 753-758
- 8) 梶原 豊、後藤和文、小坂昭三、中西喜彦、小川清彦 (1987) : 牛卵胞卵子の体外受精および体外培養によるふ化. 家畜繁殖誌, 33: 173-180
- 9) 南橋 昭、湊 芳明、塩谷康生、花田 章 (1986) : ウシ体外成熟卵子の体外受精に由来する2~8細胞期分割卵の形態的正常性の検討. 家畜繁殖学会第70回大会講演抄録, pp 205
- 10) Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L., First, H.L. (1985) : Effect of heprin and condroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm in vitro. Thriogenology, 24: 537-549
- 11) 佐藤英明、入谷 明、西川義正 (1977) : ブタ及びウシ卵胞卵の体外培養, とくに卵の成熟に影響する要因について. 家畜繁殖誌, 23: 12-17
- 12) Sherman, J.K., Lin, T.P. (1959) : Temperature shock and cold storage of unfertilized

- zed mouse eggs. Fertil. Sterility 10:384-396
- 13) 塩谷康生、桑山正成、上田修二、斎藤秀一、大田 均、花田 章 (1988):屠場で吸引採取した牛未成熟卵胞卵子の体外受精後の発生能. 家畜繁殖誌, 34:39-43
- 14) 鈴木達行、下平乙夫、藤山雅照 (1983) :ウシ凍結受精卵の1段階ストロー法による移植. 家畜繁殖誌, 34:39-43
- 15) 鈴木達行、下平乙夫、藤山雅照 (1984) :蔗糖を用いた1段階ストロー法によるウシ凍結融解卵の生存性と非手術的移植. 家畜繁殖誌, 30:211-215

性腺刺激ホルモン投与による黒毛和種
雌牛の過剰排卵反応と血液性状の関係

Relationship between superovulatory response and blood profiles
in Japanese black cows with FSH treatment

松岡 一仁・阪田 昭次・水原 孝之¹⁾・鈴木 達行²⁾

Kazuhito Matsuoka, Syoiji Sakata, Takayuki Mizuhara¹⁾ and Tatsuyuki Suzuki²⁾

山口県畜産試験場
Zootechnical Experiment Station, Prefecture of Yamaguchi
山口県中部家畜保健衛生所¹⁾
Yamaguchi Prefectural Chubu Livestock Hygiene Service Center¹⁾
山口大学大学院連合獣医学研究科²⁾
United Graduate School of Veterinary Sciences, Yamaguchi University²⁾

Abstract: This study was carried out to investigate the relationship between the blood profiles and the superovulatory response in Japanese black cows with FSH treatment. Eleven Japanese black cows under the same father and same ages (4 years old) were treated for superovulation using follicle stimulating hormone (FSH). For the estimation of blood profiles, blood samples were collected from those cows on the day of natural heat (0 day), single flushing (7 days), start of FSH treatment (10 days), PGF_{2α} treatment (12 days), heat from superovulation (15 days), and recovery of superovulated embryo (21 days), respectively. Progesterone concentration was high level in superovulated cows compared with those of untreated ones (13.5 ± 1.1 vs 5.4 ± 1.6 ; $P < 0.01$). Number of transferable embryos were associated with increasing in the cows had many of embryo recovered (Group-II), in compared with the cows had few number of embryo recovered (Group-I) (17.4 ± 8.8 vs 3.3 ± 2.5 ; $P < 0.05$). Similarly, progesterone levels were higher in Group-II than those of Group-I (14.2 ± 0.8 vs 12.9 ± 1.1). GOT levels were significantly increased in the estrus of superovulated cows in compared to those of others (73.3 ± 28.5 vs 53.7 ± 10.9 ~ 58.9 ± 15.1 ; $P < 0.05$ ~ 0.01). Total-Cholesterol, Phospholipid, α-Tocopherol and β-Carotene serum concentrations were lower in the times of single flushing from the non treated cow and embryo

recovery from the superovulated one. Retinol concentration levels were significantly decreased from PGF_{2α} treatment to estrus. ($P < 0.05$). The value of the each blood substances was no significant difference between Group-I and Group-II.

緒 言

供胚牛からの安定的移植可能胚の供給は、胚移植の実用化上、最も重要な部分である。しかし、これまで報告されたブタ下垂体由来の卵胞刺激ホルモン (Follicle Stimulating Hormone, 以下「FSH」と略) 投与による牛の過剰排卵処理では、胚回収成績に個体ごとのばらつきが大きく満足のいく結果が得られていない。これらの問題を解明するために、供胚牛の繁殖生理機能に関与すると思われる血中プロジェステロン値、血中総コレステロール値やβ-カロチン値等の各種血液成分と胚回収成績との関係をみた報告^{1)~15)} があるが、その関係は一定せず、未だ供胚牛の過剰排卵処理に対する反応性と血液性状との関係が明らかにされたとは言い難い。

そこで、本研究では正常な性周期を繰り返す黒毛和種の経産牛を対象に、FSH投与により過剰排卵処理を行い、処理前後の血液性状の動態と採胚成績との関係を調査分析したので、これらの概要を報告する。

材料と方法

1. 供試牛と飼養形態

1989年1月から4月にかけて、山口県畜産試験場繫養の黒毛和種経産牛11頭について試験を行った。これらの供試牛は、父、年齢(5歳)及び産歴(4産)が同一であり、正常な性周期を繰り返しているものを選定して用いた。飼養形態は、開放牛舎での繋ぎ飼育とし、日中は運動場で放飼した。給与飼料は、自家配合飼料(TDN 67.1%, DC P 13.0%)及びイタリアンサイレージで、年間を通じて平衡給与した。給与量は、粗飼料からのTDN供給割合を60%とし、日本飼養標準の100%を給与した。

2. 過剰排卵処理と胚回収法

スタンディング発情を示した供試牛に人工授精を行い、7日後に黄体側子宮角内を非外科的に灌流することにより1胚採取を行った。灌流後は全頭に合成ペニシリン製剤(ペニシリンG, 明治製薬製)の50ml(10万IU)を子宮内注入した。次いで、その3日後(発情日を0日として10日目)から合計20mgのFSH(アントリン: デンカ製薬製)を既法に準じて朝夕2回ずつ3日間(5, 5; 3, 3; 2, 2mg)筋肉内に減量投与した。発情誘起は、FSH投与開始の3日目に朝夕それぞれ15, 10mgのPGF_{2α}(プロナルゴンF: 武田薬

品製) を筋肉内投与した。人工授精はスタンディング発情の現れた PGF_{2α}投与開始後 56時間と 72 時間の 2 回、凍結精液を用いて行った。胚の回収は、人工授精後 7 日目に多孔式バルーンカテーテルを用いた子宮洗浄法により行い、回収胚は鈴木らの方法¹⁶⁾に準じて形態的に正常に発育したものと移植可能胚と判定し、変性及び未受精胚と区分した。

3. 採血と血清分離

採血は、過剰排卵処理開始前の自然発情時(0日)、1胚採取時(7日目)、FSH投与開始時(10日目)、PGF_{2α}処理時(12日目)、過剰排卵処理の人工授精時(15日目)、過剰排卵処理の採胚時(21日目)の計 6 回実施した。いずれも真空採血管を用いて頸静脈より採血し、直ちに 4~5℃に冷却後、3000rpm 30 分間冷却遠心して、血清を分離し、-20℃で凍結保存した。

4. 血清の生化学的検査と測定方法

血清の生化学的検査は下記の 16 項目について、それぞれの測定方法により実施した。

- 1) 血清蛋白 (S·P) : 屈折計法 (日立蛋白計)
- 2) アルブミン (Alb) : セルロース・アセテート膜電気泳動法
- 3) α, β, γ-グロブリン (Glob) : セルロース・アセテート膜電気泳動法
- 4) カルシウム (Ca) : OCP C 法
- 5) マグネシウム (Mg) : キシリジルブルー法
- 6) 無機リン (I-P) : P-メチルアミノフェノール還元法
- 7) 尿素窒素 (BUN) : ウレアーゼ・インドフェノール法
- 8) GPT : POP・TOOS 法
- 9) GOT : POP・TOOS 法
- 10) γ-GTP : γ-グルタミル-P-N-エチルヒドロキシエチルアミノアニリド基質法
- 11) 総コレステロール (T-Chol) : COD・DAO S 発色法
- 12) リン脂質 (PL) : COD・POD・4-アミノアンチピリン法
- 13) α-トコフェロール (α-Toc) : 高速液体クロマトグラフィー
- 14) β-カロチン (β-Car) : 高速液体クロマトグラフィー
- 15) レチノール (V·A) : 高速液体クロマトグラフィー
- 16) プロジェステロン (P) : オプチェック血清用 EIA キット

5. 供試牛の区分

血液性状の動態と胚回収成績との関係を比較検討するため、昭和 63 年度の山口県畜産試験場の平均採胚数 13.8 個、平均移植可能胚数 6.9 個及び平均移植可能胚率 50.0% を基

準に、これらの3基準より下回るものをグループI(6頭)、3基準をすべて越えるものをグループII(5頭)に区分した。

6. 統計処理

各平均値の比較はt検定で、また比率の差の比較は χ^2 検定でその有意性を調べた。なお、測定値は必要に応じて対数変換した。

結 果

1. 胚回収成績

過剰排卵処理前の1胚採取の成功率と移植可能胚率については、いずれもグループ間で有意差は認められなかった。過剰排卵処理後の平均採胚数はグループIが 15.5 ± 10.5 個、グループIIが 21.2 ± 7.6 個となり、グループ間で有意差は認められなかつたが、移植可能胚数及び移植可能胚率についてはグループIIが有意($P < 0.05$)に高かった。(Table 1)

2. 血清検査成績

S・P、A1b、G1b、Ca、Mg、I-P、BUN、GPT及び γ -GTP値(Table 2)は、採血時期により僅かな変動がみられたが、いずれも正常値¹⁷⁾の範囲内にありグループ別、採血時期別に有意差は認められなかつた。

P値(Table 3)は両グループ共ほぼ同様な動きを示し、自然発情と過剰排卵処理の発情別にそれぞれ $0.6 \pm 0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $1.9 \pm 1.9 \mu\text{g}/\text{ml}$ となり、後者で高い値を示した。1胚採取と過剰排卵処理による胚採取別でもそれぞれ $5.4 \pm 1.6 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $13.5 \pm 1.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ となり、後者で有意($P < 0.01$)な上昇がみられた。また、過剰排卵処理の採胚時の値はグループIとグループII別にそれぞれ $12.9 \pm 1.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ と $14.2 \pm 0.8 \mu\text{g}/\text{ml}$ となり、グループIIで高値を示す傾向にあった。さらに、移植可能胚数と過剰排卵処理の採胚時のP値との間には有為な正の相関($r = 0.706$)が認められた。(Table 4)

GOT値は(Table 3)、過剰排卵処理後の人工授精時(15日目)にすべての個体で値($73.3 \pm 28.5 \text{KU}$)が上昇し、他の時期の値($53.7 \pm 10.9 \sim 58.9 \pm 15.1 \text{KU}$)に比較して有意($P < 0.05$)に高値を示した。この変動をグループ別にみると統計的な有意差はグループIIでのみ認められた。また、グループ間には差がみられなかつた。

T-Ch₀、PL、 α -Toc及び β -Car値は(Table 3, Fig 1)グループ間で比較すると、T-Ch₀及びPL値は、どの時期においてもグループIが高値を示し、 β -Car値は逆にグループIIが高値を示した。 α -Toc値はFSH投与時を除いて、グループIIが高値を示した。しかし、いずれの項目においてもグループ間に有意差はみられなかつた。また、検査時期別に経時的推移をみると、いずれもほぼ同様の動きを示し、両

Table 1. Results of embryo recovery by single flashing and superovulated flashing in Japanese black cow

Group	Number of donors	Single flashing		Superovulated flashing	
		recovery rate, (%)	transferable embryo, (%)	ova/donor	transferable embryo/donor, (%)
I	6	83.3	80.0	15.5±10.5	3.3a±2.5(21.5)c
II	5	80.0	100	21.2±7.8	17.4b±8.8(82.1)d
計	11	81.8	88.9	18.1±9.3	9.7±9.4(53.8)

a, b; c, d: P<0.05

I : (number of embryo recovery<13.8, number of transferable embryo<6.9, rate of transferable embryo<50.0)

II : (number of embryo recovery>13.8, number of transferable embryo>6.9, rate of transferable embryo>50.0)

Table 2. The blood profiles on the single flashing and superovulatory treatment cycle in donor cow (I)

Item	Group	0day	7days	10days	12days	15days	21days*
S · P (g/dl)	I	6.7±0.1	6.5±0.1	6.7±0.3	6.7±0.3	6.9±0.4	6.5±0.3
	II	6.8±0.4	6.5±0.4	6.8±0.4	6.8±0.7	6.8±0.7	6.9±0.7
A l b (%)	I	3.7±0.2	3.6±0.2	3.7±0.2	3.7±0.1	3.8±0.2	3.5±0.2
	II	3.8±0.3	3.7±0.2	3.8±0.3	3.8±0.4	3.8±0.4	3.9±0.4
γ -G l b (%)	I	1.5±0.2	1.6±0.3	1.5±0.3	1.6±0.3	1.6±0.3	1.5±0.3
	II	1.5±0.1	1.4±0.1	1.5±0.1	1.5±0.3	1.5±0.3	1.5±0.2
C a (mg/dl)	I	10.1±0.9	10.0±1.0	10.1±0.8	10.0±0.9	10.1±0.8	8.8±1.2
	II	8.8±0.5	9.8±0.7	10.0±0.5	8.6±0.7	8.8±0.6	10.0±1.0
M g (mg/dl)	I	2.7±0.3	2.6±0.4	2.7±0.3	2.7±0.3	2.8±0.3	2.6±0.4
	II	2.7±0.4	2.5±0.4	2.5±0.4	2.6±0.4	2.5±0.3	2.4±0.4
I - P (mg/dl)	I	4.6±0.4	4.1±0.6	5.0±0.8	4.7±0.6	5.0±0.8	5.1±1.0
	II	4.7±0.5	4.8±0.6	5.1±0.7	5.1±0.4	5.0±0.6	5.7±0.7
B U N (mg/dl)	I	11.9±2.2	12.8±3.0	12.6±3.0	12.0±2.8	11.5±2.5	11.5±2.4
	II	12.3±2.0	11.4±1.4	11.6±2.6	12.6±3.7	12.0±2.0	12.7±2.3
G P T (KU)	I	7.9±6.5	8.1±6.4	8.6±5.6	7.5±6.3	8.2±6.2	7.5±5.6
	II	7.9±4.7	7.7±5.1	9.0±4.2	8.3±4.0	9.7±4.4	8.1±3.6
γ -G T P (IU/l)	I	15.6±2.7	15.2±3.0	15.6±3.2	15.5±3.0	15.6±2.9	15.0±2.6
	II	17.0±2.9	16.4±3.3	16.2±2.9	16.8±3.2	16.5±3.1	16.6±4.3

※ : Day0=estrus, Day7=single flashing, Day10=FSH injections, Day12=PG injections, Day15=estrus after superovulation, Day21=superovulated flashing

Table 3. The blood profiles on the single flashing and superovulatory treatment cycle in donor cow (II)

Item	Group	Oday	7days	10days	12days	15days	21days*
P ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	I	0.6 \pm 0.3a	5.4 \pm 1.3C	6.8 \pm 1.0	9.0 \pm 1.2	1.4 \pm 0.7b	12.9 \pm 1.1D
	II	0.5 \pm 0.1	5.4 \pm 2.1C	6.7 \pm 0.8	8.3 \pm 2.1	2.4 \pm 2.8	14.2 \pm 0.8D
	Total	0.6 \pm 0.2a	5.4 \pm 1.6C	6.7 \pm 0.8	8.7 \pm 1.6	1.9 \pm 1.9b	13.5 \pm 1.1D
G O T (KU)	I	58.4 \pm 18.6	55.8 \pm 8.6	53.7 \pm 12.3	51.9 \pm 12.0	74.8 \pm 37.5	54.1 \pm 14.6
	II	58.3 \pm 11.8a	55.5 \pm 11.8a	53.9 \pm 10.5a	56.0 \pm 11.4	71.5 \pm 16.1b	57.7 \pm 10.2a
	Total	58.9 \pm 15.1A	55.6 \pm 9.6a	53.7 \pm 10.9A	53.8 \pm 11.4a	73.3 \pm 28.5Bb	55.7 \pm 12.3a
T-CHO (mg/dl)	I	140.1 \pm 25.2Ac	131.2 \pm 19.9d	138.7 \pm 24.5a	135.4 \pm 28.0A	137.3 \pm 23.0a	124.3 \pm 25.6Bb
	II	126.9 \pm 23.2	122.9 \pm 16.3	128.7 \pm 20.9	127.0 \pm 22.3	127.7 \pm 21.7	114.8 \pm 13.1
	Total	134.1 \pm 24.1Aa	127.5 \pm 18.0b	134.2 \pm 22.4A	131.6 \pm 24.7A	132.9 \pm 21.8A	120.0 \pm 22.1B
P L (mg/dl)	I	155.5 \pm 31.9Ac	139.5 \pm 27.4d	151.2 \pm 31.4a	146.3 \pm 32.1a	154.6 \pm 28.4A	139.3 \pm 29.1Bb
	II	140.2 \pm 24.5	131.4 \pm 14.4	139.4 \pm 18.5a	139.2 \pm 23.0	143.0 \pm 20.3a	126.6 \pm 11.6b
	Total	148.5 \pm 28.5AC	135.8 \pm 21.8D	145.8 \pm 25.8A	143.0 \pm 27.2a	149.3 \pm 24.6Ac	133.0 \pm 23.3Bb
α -Toc ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	I	382.5 \pm 105.5A	351.8 \pm 63.9	391.7 \pm 89.5A	388.1 \pm 119.8a	378.8 \pm 103.2a	334.6 \pm 92.4Bb
	II	418.0 \pm 137.4	365.8 \pm 90.4	383.3 \pm 103.3	407.1 \pm 127.0	385.5 \pm 123.6	356.9 \pm 78.8
	Total	404.1 \pm 115.3Ac	364.7 \pm 90.4d	387.9 \pm 91.1A	402.2 \pm 116.8A	381.9 \pm 107.0a	344.7 \pm 83.0Bb
β -Car ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	I	240.4 \pm 62.2	226.6 \pm 49.8	233.7 \pm 52.9	233.1 \pm 65.4	238.0 \pm 67.9	220.6 \pm 87.9
	II	306.9 \pm 115.2	267.5 \pm 92.2	301.9 \pm 101.0	316.2 \pm 113.9	316.9 \pm 110.0a	278.4 \pm 80.6b
	Total	270.6 \pm 92.0	245.2 \pm 71.4	264.7 \pm 82.1	270.9 \pm 96.0	273.8 \pm 94.0A	247.4 \pm 86.0B
V·A (IU/dl)	I	79.3 \pm 12.5	76.6 \pm 14.8	79.9 \pm 11.4	79.3 \pm 9.6	74.5 \pm 10.8	75.1 \pm 15.7
	II	76.0 \pm 8.8a	70.7 \pm 7.8c	73.8 \pm 7.0	78.4 \pm 12.2	71.3 \pm 9.8b	79.4 \pm 9.1d
	Total	77.8 \pm 10.6	73.9 \pm 12.0	77.1 \pm 8.7	78.9 \pm 10.3a	73.0 \pm 10.0b	77.1 \pm 12.7

(A, B; C, D: Mean \pm SD; P<0.01) (a, b; c, d: Mean \pm SD; P<0.05)※: Day0=estrus, Day7=single flashing, Day10=FSH injections, Day12=PG injections,
Day15=estrus after superovulation, Day21=superovulated flashing

Table 4. Relationship between the concentration of serum progesterone and results of flushing

P Item	Single flushing (7days)	FSH treatment (10days)	Superovulated flushing (21days)
oval embryo, no	-0.233	0.058	-0.184
transferable embryo, no	-0.077	0.206	0.706*
rate of transferable embryo	0.092	0.427	0.57

※ : P<0.05

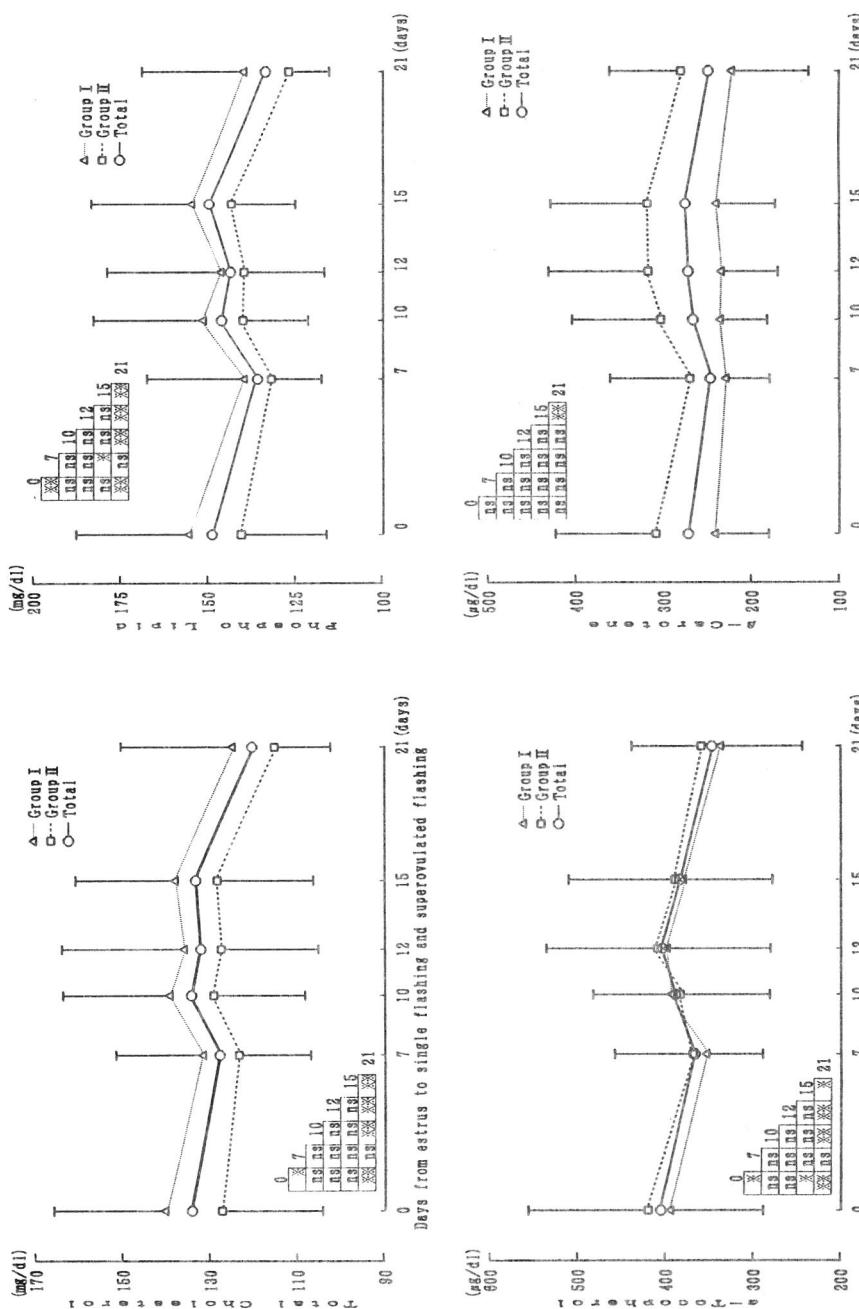


Fig. 1. The blood profiles on the single flashing and superovulatory treatment cycle in donor cow.
Day 0=estrus, Day 5=single flashing, Day 10=FSH treatment, Day 15=superovulation, Day 21=superovulated flushing

グループとも1胚採取時及び過剰排卵処理後の採胚時に有意に低下、又は低下する傾向を示した。

なお、T-Ch₀、P L、 α -Toc及び β -Carの値はそれぞれ類似した変動パターンを示し、これら4項目の検出値の間には有意な正の相関が認められた。

V・A値は(Table 3)、過剰排卵処理後の採胚時を除いて、グループIが高値で推移する傾向にあったがグループ間に有意差は認められなかった。経時的な推移をグループ全体でみると、1胚採取時及び過剰排卵処理後の人工授精時に低下する傾向がみられ、PG処理時と過剰排卵処理後の人工授精時の間に有意差がみられた。これをグループ別にみると、両グループともグループ全体の動きと同様な傾向を示したが、有意差はグループIIにおいて、自然発情時(76.0±8.8)と過剰排卵処理後の人工授精時(71.3±9.9)及び1胚採取時(70.7±7.8)と過剰排卵処理後の採胚時(79.4±9.1)の間にみられた。

考 察

本研究では供試牛の年齢、産歴、父及び飼養環境を同一条件としたにもかかわらず、採胚成績と同様、血液所見においても個体差がみられ、生理的恒常性の範囲内でもかなりのバラツキの生じることが示唆された。検査時期別にみたP値は、1胚採取と過剰排卵処理による胚採取時を比較すると、後者で有意($P < 0.01$)な上昇がみられた。この傾向はグループ別にもみられ、回収胚数の多かったグループIIではグループIに比べて高値であった。このことは複数の胚の生存性を維持させるためには、それに応じたP_iの動員が要求されることを示唆しており興味深い。Wubishetら¹⁵⁾が示した牛の過剰排卵処理でもP値と黄体数との間に正の相関が得られており、本研究の成績はこれらの報告と一致するものであった。

GOT値は、全個体において、過剰排卵処理後の人工授精時には明らかに有意な上昇がみられ、正常値の上限(70KU)を越えるものが3例みられた。GOTは肝及び心疾患等において細胞損傷により上昇するとされているが、ホルモンの頻回処理とPGF_{2α}投与による生理機能への急激な変化がこれらの臓器に何らかの影響を与えてるものと思われた。山科ら¹³⁾は、供胚牛の選定条件としてGOT値が80KU以下を示す個体が望ましいと述べているが、今回の成績では80KU以上を示す個体が3例みられたが、一時的な上昇であると共に両グループでみられており、採胚成績との関係は明らかにできなかった。

T-Ch₀及びP L値は、グループ間で有意差はなかったが、いずれの検査日においても採胚数の多かった群が低く、経時的な推移では発情後7日目に当たる1胚採取時と過剰排卵処理の採胚時に有意に低下又は低下する傾向がみられた。丸尾ら¹¹⁾はT-Ch₀

値と採胚数との間には有意な相関がみられたが正常胚数及び正常胚率との間には特に関係はなかったとし、採胚日にはT-Cho値が低下したと述べている。今回の調査においても採胚数だけでもみると、採取胚数の多い方がT-Cho値が高い傾向にあったが、移植可能胚数及び移植可能胚率まで条件に加えると、特に関係は見出せなかった。T-Choはステロイドホルモンの前駆物質として知られており、過剰排卵処理時には要求量が増すことが考えられるが、栄養状態を反映する物質でもあり、一定の血中濃度を保持していれば、特に卵巢反応に対する影響はないものと思われた。また、菅ら¹⁸⁾は黄体中期における子宮内分泌液の総脂質濃度は発情期に比較して2.8倍量に増加するとしており、T-Cho及びPL値が低下した時期（発情後7日目）が血中から子宮に動員される時期に当たるのではないかと推察された。

α -Toc値は脂溶性物質であり、血中では脂質と行動を共にしていることからT-C₁₈及びPLとほぼ同様な動きを示したものと考えられるが、 α -Tocの働きとしては生体の抗酸化物質として知られており、卵巢反応及び胚発生に対する直接的な作用よりも、繁殖生理機能を正常に維持するという間接的な作用が主ではないかと思われた。

β -Car値については、安部ら³⁾が正常胚率の高かった群は高値を示すとともに、過剰排卵処理の発情日から採胚日にかけて低下をみており、いずれも本試験結果と一致するものであった。また、後藤⁴⁾、鈴木ら⁸⁾は良好な採胚成績を得るには採胚日の β -Car値が200 μg/dl以上必要であると述べているが、本成績においても採胚数の少なかつたグループでは6例中3例が採胚日には200 μg/dlを下回っており、200 μg/dl以上を維持することが重要であることを伺わせた。さらに、甫立ら¹⁹⁾の報告によると、発情後2～5日目の黄体中の β -Car含量は2.12～5.04 μg/g、5～7日目は23.36 μg/gであったとしており、採胚日に当たる時期に血中からの動員があり血中濃度を低下させたのではないかと推察され、特に、過剰排卵処理後の採胚時には多量の動員があったものと思われた。

以上、T-Cho、PL、 α -Toc及び β -Car値の血中における低下時期が、排卵後の黄体形成並びに胚の発生過程に合致していることから考えると、これらの物質が黄体の形成や維持、ひいては胚の初期発生になんらかの形で関与していることを伺わせるもので興味深い。

V·A値は、1胚採取時と過剰排卵処理後の発情時において低下する傾向がみられた。V·Aは、プロジェステロン産生に必要な物質であり、主として黄体中の β -CarがV·Aに転換されて利用されていることを甫立¹⁹⁾、稻葉ら²⁰⁾は報告しているが、1胚採取時は前述のように黄体中の β -Car濃度が上昇する時期に当たると推察され、一時的に血中のV·Aもプロジェステロン産生に関与したとも考えられる。過剰排卵処理後の

発情時に低下したことについては、PGF_{2α}処理後、黄体の急激な退行とともに多数の卵胞が発育、排卵する時期であり、V・Aが発情から排卵時にも関与する物質であることが伺われた。しかし、GOTが一過性に上昇した時期とも一致しており、ホルモン処理による生体反応の一つであることも考えられる。この一時的な低下の反動としてその後の採胚日の上昇につながったものと思われた。

ここで得られた結果では、T-Chol、PL、β-Car及びα-Tocは胚の生産に関与することが伺われ、採胚成績をある程度予測できる可能性が示された。しかしながら、飼養管理条件を一定にした状態であっても、これらの血清成分値のみから採胚成績を予測する指標とするには不十分であると思われ、プロジェステロン値のほか内分泌学的な動態を含めた総括的な追及の必要性が示唆された。

文 献

- 1) 青柳敬人・岩住安晃・和地秀一・権五鏡・高橋芳幸・金川弘司・宮本明夫・梅津元昭・正木淳二 (1987) : ウシの過剰排卵処置におけるPMSGとFSHの比較、とくに血漿ステロイドホルモンの動態と胚回収成績について、家畜繁殖学雑誌, 33: 167~172.
- 2) 安達善則・藤野日出海・吉成寿生・村上 司・石川俊彰 (1988) : 牛の受精卵移植における適正牛の選定基準の確立、京都碇高総牧試研報, 10: 14~21.
- 3) 安部茂樹・三代英俊・大滝保夫 (1989) : 過排卵処理における供卵牛の血液性状の変化と採卵成績、島根畜研報, 24: 6~9.
- 4) 後藤和文・加治佐 修・江副幹太・中西喜彦・小川清彦・田崎道弘・太田 均・猪八重 悟・立山昌一・川畑 孟 (1987) : 黒毛和種供卵牛の血漿中β-カロチノ濃度と卵質の関係、第72回日本家畜繁殖学会講演要旨, p35.
- 5) 後藤和文・江副幹太・大久津昌治・加治佐 修・阿久沢正夫・中西喜彦・小川清彦・田崎道弘・太田 均・猪八重 悟・立山昌一・川畑 孟 (1988) : 黒毛和種供卵牛の血液性状と卵質の関係、家畜繁殖学雑誌, 34: 50~55.
- 6) 後藤和文・中西喜彦・大久津昌治・小川清彦・田崎道弘・太田 均・猪八重 悟・立山昌一・川畑 孟 (1988) : 黒毛和種供卵牛の卵巢機能と卵質の関係、家畜繁殖技術研誌, 9: 57~60.
- 7) 権五鏡・小野 齊・山科秀也・清家 昇・森 一樹・金川弘司 (1985) : ホルスタイン種乳牛における過剰排卵誘起時の血清総コレステロールおよび黄体ホルモン値と移植可能な胚数との関係、家畜繁殖学雑誌, 31: 231~235.
- 8) 堂地 修・高倉宏輔・伊藤剛嗣・高橋博人・津田秋司・酒井 豊・中尾敏彦 (1986)

- ：ホルスタイン種未経産牛における過剰排卵処理に伴う血中プロジェステロン濃度の変動と採卵成績との関係，北海道牛受精卵移植研究会会報，4：37～41。
- 9) 鈴木達行・羽根茂雄（1986）：牛の血中 β -カロチン濃度と繁殖性，畜産の研究，40：1197～1199。
- 10) 前田淳一・小林修一・笹木教隆・加藤信正（1990）：黒毛和種のSingle Flashによって得られた胚の品質とその後の過剰排卵処置成績との関係，繁殖技術研誌，12：83～88。
- 11) 丸尾喜之・沢田 勉・稻葉俊夫・小西一之・斎藤則夫・森 純一（1987）：黒毛和種供卵牛の過剰排卵処置前後の血漿中総コレステロール濃度と卵巢反応，日畜会報，58：711～713。
- 12) 砂川政広・笠原民夫・角田龍司・大津昇三（1987）：牛受精卵移植における受卵牛の黄体形状及び血中プロジェステロン値と移植成績，家畜繁殖学雑誌，33：206～208。
- 13) 山科秀也（1988）：ETニュースレター 3：5，家畜改良事業団，東京。
- 14) 若槻義弘・三代英俊・大滝保夫（1988）：給与飼料の違いが過排卵処理効果に及ぼす影響，島根畜研報，23：56～59。
- 15) Wubishet, A., Kesler, D. J., Graves, C. N., Spahr, S. L. and Favero, R. J. (1991) : Preovulatory LH profiles of superovulated cows and Progesterone concentration at embryo recovery. Theriogenology, 35, 451~457
- 16) 鈴木達行（1985）：家畜人工授精講習会テキスト（家畜受精卵移植編），147，日本家畜人工受精師協会，東京。
- 17) 元井葭子（1987）：臨床病理検査要領（農水省経済局編）333，全国農業共済協会，東京。
- 18) 菅 徹行（1974）：牛の子宮分泌液に関する生化学的研究，家畜繁殖学雑誌，20：81～88。
- 19) 甫立京子（1984）：牛黄体中の β -カロテンとビタミンAの存在量と役割，農水省畜産試験場年報，24：74～76。
- 20) 稲葉俊夫・免山央時・小野忠義・森 純一（1987）：牛培養卵胞顆粒膜細胞のプロジェステロン産生に対する β -カロチンおよびビタミンAの影響，日本獣医学雑誌，4：1021～1025。

Tumor Necrosis Factor Inhibits the Development of
Mouse Embryos Co-cultured with Oviducts.: Possible
Relevance to Infertility Associated with Endometriosis.

Yuji Taketani, Tsong-Ming Kuo and Mashiko Mizuno.

Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of
Medicine, University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku,
Tokyo, Japan. 113.

Abstract: In the search for the underlying mechanism for infertility associated with endometriosis, the possible involvement of tumor necrosis factor (TNF) in peritoneal fluid was investigated. The concentrations of TNF in peritoneal fluid in infertile women with endometriosis were about five times as high as those found in infertile women without endometriosis. In *in vitro* experiments using mouse embryos, the addition of TNF alone had no effect on the development of 2-cell embryos during 24 hours incubation. Since peritoneal fluid freely goes into the oviductal cavity where early embryogenesis takes place, elevated TNF in peritoneal fluid in women with endometriosis may influence reproductive process by altering the intraductal microenvironment. As expected, the addition of TNF inhibited the development of 2-cell embryos co-cultured with the oviduct during 24 hours incubation. TNF exerted an inhibitory effect on 4-cell embryos as well, but not 8-cell embryos. Conditioned media harvested from the culture of the oviduct with TNF similarly inhibited the development of 2-cell embryos. These results implicate that TNF in peritoneal fluid, may be a candidate responsible for impaired reproductive performance associated with endometriosis possibly by acting on the oviducts and stimulating the release of a certain humoral factor from them.

Introduction

Although anatomical derangement such as tubal obstruction and peritoneal adhesion can be

an etiological factor for infertility, when present, in women with endometriosis. However, the causes for infertility are unexplained in many women with endometriosis.

Chronic intraperitoneal inflammatory process is recently receiving increased attention as manifested by increased volume of peritoneal fluid¹⁾, increased number of peritoneal macrophages^{2, 3)}, an increased their activity^{2, 3)} and elevated levels of cytokines in peritoneal fluid⁴⁾. Since peritoneal fluid is in direct contact with the ovaries and the oviducts, subtle alterations of the fluid are supposed to adversely influence reproduction. Particularly, elevated levels of cytokines are suggested to be involved in impaired fecundity associated with endometriosis⁴⁾. In this context, we have offered evidence that interleukin 1 (IL-1), a major cytokine, may compromise early embryogenesis by acting on the oviducts in *in vitro* experiments⁵⁾. Considering the increased levels of IL-1 in peritoneal fluid with endometriosis and a direct continuity of peritoneal fluid with the oviductal cavity, it seems that IL-1 in peritoneal fluid may be one of potential mediators of an embryo-toxic property present in peritoneal fluid in women with endometriosis⁵⁾. Tumor necrosis factor (TNF), a kind of cytokines, shares many of the biological actions of IL-1 and is released concurrently with IL-1 in many instances⁶⁾. Therefore, in the present study, we intended to examine whether TNF like IL-1 may contribute to infertility associated with endometriosis.

Materials and Methods

Collection of peritoneal fluid

The subjects in this study were 40 infertile women who had laparoscopy or laparotomy for either an infertile evaluation or treatment of infertility. The subjects consisted of (1) 20 women with evidence of endometriosis and (2) 20 women without endometriosis but having apparent etiological factors for infertility including tubal obstruction and male factor, etc. Samples of peritoneal fluid were obtained from the cul-de-sac space at these procedures. After centrifugation at 600g for 15 minutes, the supernatant was collected and stored at -80 °C before use.

TNF assay

The concentrations of TNF α in peritoneal fluid were measured by ELISA purchased from Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.. The lowest concentration measurable was 4 pg/ml. The intraassay coefficient of variation was 3.1% while the interassay coefficient of variation was 12.0%.

In vitro experiments for assessment of TNF on the embryonal development

Female ICR mice at 8 weeks were superovulated by the injection of pregnant mare serum (5IU) intraperitoneally, followed 48 hours later with 5 IU human chorionic gonadotropin (hCG). The mating was confirmed by the presence of the copulatory plug. The oviducts were dissected out 48, 54 and 60 hours after the hCG injection to obtain 2-cell, 4-cell and 8-cell embryos respectively. The embryos were collected by flushing the oviducts. After selecting the embryos at stages desired, they were cultured for 24 hours under the condition of 95% air and 5% CO₂ at 37 °C in modified BWW medium. Usually, 10 embryos were cultured in plastic organ culture dish (Falcon) containing 1.5ml of the medium. In experiments of co-culturing embryos with the oviduct, the oviducts were obtained from nonpregnant ICR mice at 8 weeks. A piece of the oviduct (about 5 mm in length) was added into a dish with embryos which did not perturb pH and osmotic pressure of the culture media. The degree of the development of cultured embryos was assessed by microscopic examination. TNF α used in this study was obtained from Genzyme Co.

Statistics

Chi-square analysis was performed for the comparison of the embryonic development. A probability of 0.05 was considered significant.

Results

The TNF α concentrations in peritoneal fluid associated with endometriosis were 308.2±98.6 pg/ml (mean±SEM), about a five-fold high ($p<0.05$) than those without endometriosis (64.6±17.3 pg/ml) (Fig. 1).

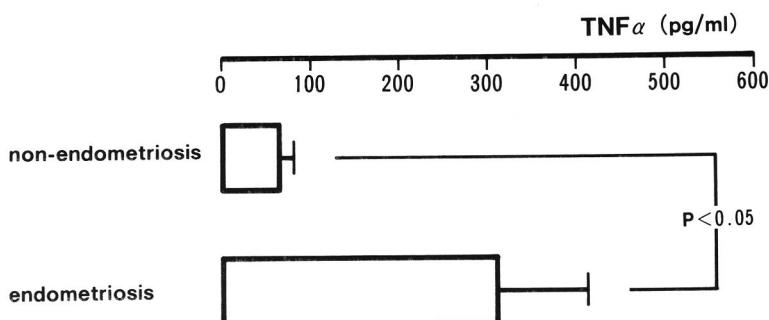


Fig. 1 Tumor necrosis factor levels in peritoneal fluid in infertile women with or without endometriosis.

Then the effect of TNF on the embryonic development was examined. The addition of TNF (200 U/ml) alone did not produce any discernible effect on the development of mouse 2-cell embryos (Fig. 2). TNF at concentration of 20 U/ml produced essentially the same inhibitory effect as that obtained by TNF at 200 U/ml.

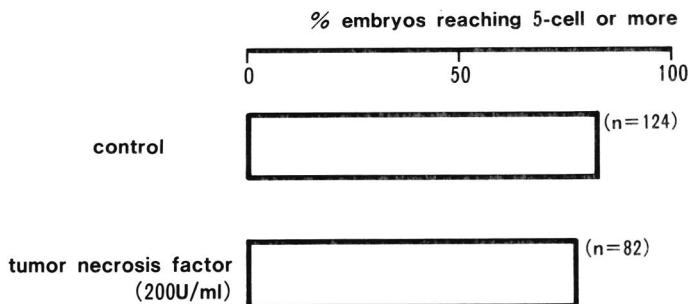


Fig. 2 Effect of tumor necrosis factor on the development of mouse 2-cell embryos during 24 hours incubation.

The numbers in parentheses indicate the number of embryos examined.

We next explored the effect of TNF on the embryonic development in the presence of oviducts. As shown in Fig. 3, TNF significantly inhibited the development of 2-cell embryos co-cultured with oviducts as compared with the control.

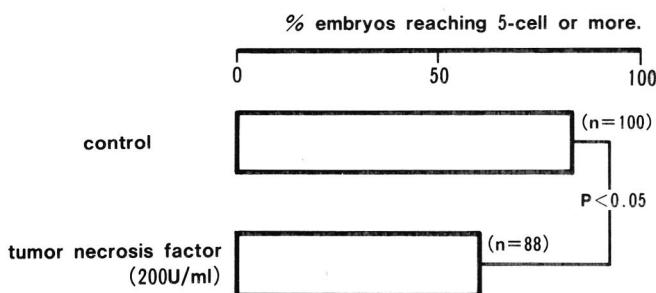


Fig. 3 Effect of tumor necrosis factor on the development of mouse 2-cell embryos co-cultured with the oviduct during 24 hours incubation. The numbers in parentheses indicate the number of embryos examined.

Likewise, TNF inhibited the development of 4-cell embryos in the presence of the oviducts (Fig. 4). However, it did not affect the development of 8-cell embryos cultured under similar conditions.

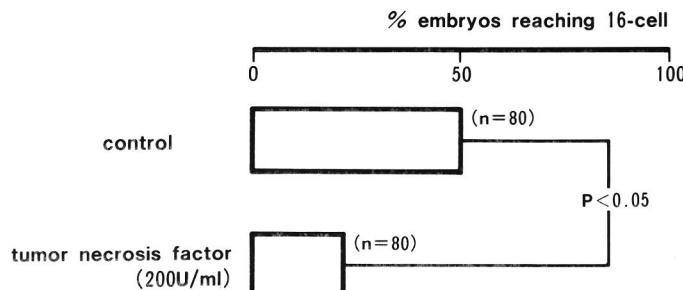


Fig. 4 Effect of tumor necrosis factor on the development of mouse 4-cell embryos co-cultured with the oviduct during 24 hours incubation. The numbers in parentheses indicate the number of embryos examined.

It is of interest to see whether a certain humoral factor could be released from the oviducts in response to TNF and mediate the inhibition of the embryonic development. As expected, the conditioned media harvested from the culture of the oviducts with TNF as well inhibited the development of 2-cell embryos (Fig. 5), while conditioned media without TNF had no effect.

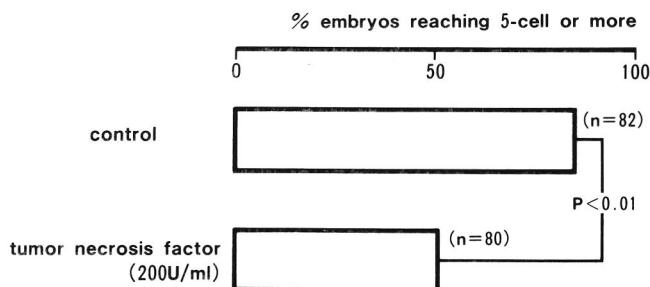


Fig. 5 Effect of conditioned media harvested from the culture of the oviduct with or without tumor necrosis factor on the development of mouse 2-cell embryos during 24 hours incubation. Control represents the conditioned media without tumor necrosis factor. The numbers in parentheses indicate the number of embryos examined.

Discussion

Mild or moderate endometriosis is often associated with infertility in spite of the apparently healthy ovaries, tubes and uterus in appearance. The mechanism for

endometriosis-related infertility has been the subject of intense study. A large body of recent literatures indicate the altered cellular or humoral components in peritoneal fluid in women with endometriosis⁷⁾, thus suggesting the presence of chronic intraperitoneal inflammation in endometriosis. Furthermore, a considerable body of evidence has been accumulated in support of the adverse effect of peritoneal fluid in endometriosis on diverse reproductive process such as ovulation, gamete transport or survival, fertilization, early embryogenesis or implantation⁴⁻⁷⁾. Along with this line, we have shown that peritoneal fluid in endometriosis acts on the oviducts and thereby stimulates the release of a certain factor which ultimately compromises early embryogenesis in *in vitro* experiments⁵⁾. Since peritoneal fluid is a direct continuity with oviductal cavity, the above finding argues strongly for the role of peritoneal fluid as a possible causative factor for infertility associated with endometriosis.

It is of interest to determine the substance relevant to embryo-toxic property of peritoneal fluid in endometriosis. In this context, previous our report⁵⁾ pointed to IL-1 as one of substances in question. IL-1 was shown to exert its inhibitory effect on embryonal development by virtue of acting on the oviducts and stimulating the release of prostaglandin E₂ from them. TNF is known to be released from macrophages concurrently with IL-1. As expected, present studies revealed the elevated concentrations of TNF in peritoneal fluid in endometriosis. Taking into account that both TNF and IL-1 are surprisingly similar in many of their actions⁶⁾, we addressed the question of whether TNF, like IL-1, inhibits embryogenesis. Here we showed that TNF inhibits the development of mouse early embryos through acting on the oviducts as is the case with IL-1.

Mechanisms whereby TNF inhibits embryogenesis remains to be clarified. TNF is capable of stimulating prostaglandin E₂ from a variety of cells⁸⁻⁹⁾. Therefore, it is conceivable that an inhibitory effect of TNF may be executed in a similar way as IL-1. TNF is further shown to stimulate prostaglandin E₂ release in a synergistic fashion with IL-1¹⁰⁾. Thus, it may be that TNF compromises embryogenesis along with IL-1. Additional support for the involvement of prostaglandin in lowered fecundity in endometriosis came from the observation that indomethacin, an inhibitor of prostaglandin synthesis, effectively restores the lowered fecundity in rats with experimental endometriosis¹¹⁾.

In the present study, the evidence for an inhibitory effect of TNF on embryogenesis is presented. Recent study has shown that TNF suppresses sperm motility *in vitro*¹²⁾. Therefore, an elevation of TNF levels in peritoneal fluid may affect the reproductive

status through several modes of actions in *in vivo* paradigm.

References

- 1) Drake, T. S., Metz, S. A., Grunert, G. M. and O'Brien, W. F. (1980). Peritoneal fluid volume in endometriosis. *Fertil. Steril.*, 34, 280-281.
- 2) Muscato, J. J., Haney, A. F. and Weinberg, J. B. (1982). Sperm phagocytosis by human peritoneal macrophages: A possible cause of infertility in endometriosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 144, 503-510.
- 3) Haney, A. F., Misukonis, M. A. and Weinberg, J. B. (1993). Macrophages and infertility: Oviductal macrophages as potential mediators of infertility. *Fertil. Steril.*, 39, 310-315.
- 4) Taketani, Y. Fundamental and clinical studies on biochemical properties of endometriosis in comparison with endometrium. (1989). *Acta Obstet. Gynecol. Jpn.*, 41, 971-980.
- 5) Kuo, T-M., Taketani, Y., Shimizu, T. and Mizuno, M. (1990). A possible mechanism of infertility in endometriosis.: A role of interleukin 1 in peritoneal fluid. *Assisted Reproductive Technology/andrology*, 1, 24-31.
- 6) Old, L. J. (1988). Tumor necrosis factor. *Scientific American*, 258, 41-49.
- 7) Syrop, C. H. and Halme, J. (1987). Peritoneal fluid environment and infertility. *Fertil. Steril.*, 48, 1-9.
- 8) Dayer, J-M., Beutler, B. and Cerami, A. (1985). Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E₂ production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J. Exp. Med.*, 162, 2163-2168.
- 9) Bachwich, P. R., Chensue, S. W., Lerrick, J. W. and Kunkel, S. L. (1986). Tumor necrosis factor stimulates interleukin-1 and prostaglandin E₂ production in resting macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 136, 94-101.
- 10) Pfeilschifter, L., Pignat, W., Vosbeck, K. and Marki, F. (1989). Interleukin 1 and tumor necrosis factor synergistically stimulate prostaglandin synthesis and phospholipase A₂ release from rat renal mesangial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 159, 385-394.
- 11) Dargenio, R., Golan, A. and Winston, R. M. L. (1994). Experimental endometriosis and fertility: Compared effects of an antigenadotropin (danazol) and an antiprostaglandin (indomethacin). *Acta Eur. Fertil.*, 15, 257-259.
- 12) Hill, J. A., Haimovici, F., Politch, J. A. and Anderson, D. J. (1987). Effects of soluble products of activated lymphocytes and macrophages (lymphokines and monokines) on human sperm motion parameters. *Fertil. Steril.*, 47, 460-465.

卵管共培養系におけるマウス初期胚発生のtumor necrosis factorによる抑制：
子宮内膜症の不妊機序との関連

武谷 雄二、郭 宗明、水野 正彦

東京大学 産科婦人科学教室

近年子宮内膜症（EM）における腹腔内の炎症性変化が不妊との関連で注目されている。特に腹腔内貯留液（PF）中のcytokineの1種であるinterleukin 1が不妊と密接に関連しているとされている。今回interleukin 1と生物作用の酷似しているtumor necrosis factor(TNF)について検討した。不妊婦人のPFを採取しTNF濃度を測定すると、EM合併例では非合併例の約5倍の濃度を示した。TNFのマウス初期胚発生への影響をみたが2細胞期胚にTNFを加えて培養しても卵割には影響しなかった。胚発生が実際に進行する場は卵管内でしかもPFは卵管内と直接交流していることより卵を卵管と共に培養した。すると2細胞期胚または4細胞期胚の卵割はTNF添加により遅延し、さらにTNFを添加した卵管の培養液でも同様の抑制がみられた。以上よりTNFは卵管に作用してある種の液性物質を分泌し、それが胚発生を抑制することが示され、EMの不妊機序にTNFが関わっている可能性が示唆された。

哺乳動物卵子研究会会則

名 称

第 1 条 本会は、哺乳動物卵子研究会と称する。

事 務 局

第 2 条 本会の事務局は、東京都内または近隣県内に置く。

目 的

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

事 業

第 4 条 本会は、前条の目的を達成するために、次の事業を行う。

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

会 員

第 5 条 本会は、次の会員をもって組織する。

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

入 会

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

退 会

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

第 8 条 会員は、次の事項に該当する時は会員の資格を失う。

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

役 員

第 9 条 本会に次の役員を置く。

会 長 1 名

副 会 長 1 名

理 事 若干名

監 事 2 名

幹 事 2 名

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

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

第11条 役員の選出は、次によって行う。

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

第12条 役員の任期は2年とし、再任を妨げない。

総 会

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

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

第14条 総会は次の事項を審議し、決定する。

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

会 計

第15条 本会の会計年度は、毎年4月1日に始まり翌年3月31日に終わる。

2. 本会の経費は会費、寄付金およびその他の収入をもってこれにあてる。

附 則

この会則は、平成3年4月27日に制定し、同日から施行する。

哺乳動物卵子学会役員

期間：平成3年4月1日～平成5年3月31日

会長：豊田 裕（東大・医研）

副会長：鈴木 秋悦（慶大・医）

理事：

石田一夫（新潟大）	石島芳郎（東農大）	井上正人（東海大）
入谷 明（京大）	遠藤 克（日大）	小栗紀彦（帯畜大）
金川弘司（北大）	久保春海（東邦大）	香山浩二（兵庫医大）
佐藤和雄（日大）	佐藤嘉兵（日大）	菅原七郎（東北大）
鈴木秋悦（慶応大）	角田幸雄（近畿大）	豊田 裕（東大）
丹羽皓二（岡山大）	野田洋一（京大）	花田 章（農水省）
平尾幸久（和歌山県立医大）	広井正彦（山形大）	福田芳詔（北里代）
星 和彦（福島医大）	安田泰久（岩手大）	柳町隆造（ハワイ大）

監事： 佐久間勇次 堤 義雄

幹事： 金山喜一（日大・農獣医） 大会幹事： 斎藤英和（山形大・医）

編集委員会：

委員長 石島芳郎

委員 伊藤雅夫、井上正人、遠藤 克、小栗紀彦
久保春海、香山浩二、新村末雄、星 和彦

哺乳動物卵子学会評議会議員

期間：平成3年4月1日～平成5年3月31日

安部裕司（東邦大・医）	伊藤雅夫（日大・医）
上口勇二郎（旭川医大）	臼井 彰（東邦大・医）
内海恭三（京大・農）	岡田詔子（東邦大・医）
長田尚夫（日大・医）	葛西孫三郎（高知大・農）
加藤 修（恵愛病院）	金山喜一（日大・農獣医）
北井啓勝（埼玉中央病院）	河野友宏（東農大・総研）
小林善宗（東海大・医）	斎藤英和（山形大・医）
佐藤文彦（山形大・医）	佐藤晶子（苫小牧駒沢短大）
塩谷康生（農水省・畜試）	繁田 実（兵庫医大）
下平乙夫（福島種牧）	鈴木達行（山口大・大学院）
鈴木宏志（中外製薬）	関 守利（群大・医）
高橋寿太郎（岩手大・農）	武谷雄二（東大・医）
田中 温（セントマザー医院）	辻井弘忠（信州大・農）
堤 治（東大・医）	中瀧直巳（日生研）
長嶋比呂志（日清粉・那須研）	成本勝彦（京大・医）
新村末雄（新潟大・農）	野田善郎（愛媛大・理）
橋詰良一（東農大・生物生産）	福井 豊（帯畜大）
堀内俊孝（広島県立大）	星合 昊（近畿大・医）
三宅正史（神戸大・農）	柳田 薫（福島県立医大）
横山峯介（実中研）	吉松宜弘（福島県立医大）

哺乳動物卵子学会誌投稿規定

(哺乳動物卵子学会誌第9巻第1号から適用)

1. 投稿論文は、原則として哺乳動物卵子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)、その他(論説、資料、文献紹介等)とし、著者は、原則として本会の会員に限る。
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。
3. 論文は、次の規定に従って投稿する。
初投稿は手書かワープロしたものをお書きください。掲載が決定したものについては、本会指定の原稿用紙(A4版)に所定の様式に従って印刷したものと文書フローピー(3.5、5.0インチ)を送付する。
 - (1)和文、英文の両論文とも、和文、英文両方の表題、著者名、所属および要旨(和文400字、英文150Word程度)を付記する。
 - (2)原著は、緒言(Introduction)、材料及び方法(Materials and Methods)、結果(Resultte)、考察(Discussion)、文献(References)の順序とする。なお、短報は原著に準ずるが項目分けはしない。
 - (3)図、表、写真等のタイトル、説明は英文とし本文中に挿入する。
 - (4)外国人の人名、地名などは原語、数字は算用数字、学術用語および単位の略語などは常用されているものを用いる。
 - (5)Key word phraseは一論文につき5個以内とする。なお、英文論文ではAbstractの後に、和文論文では英文抄録の後に、短報では所属機関名の後に記入する。
 - (6)引用文献の記載方法は下記の例に従う。
雑誌の場合：著者名(年次)、表題、誌名、巻(号)、頁-頁
1) Bavister, B. 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.
2) 新村末雄, 石田一夫(1985): ハムスター顆粒層細胞における 17β -Hydroxysteroid dehydrogenaseの組織化学的研究, 日不妊会し, 30, 36~46.
単行本の場合：著者名(年次)、表題、書名、(編集者名)、頁-頁
発行所、発行地。
3) Yamagimachi, R. (1981): Mechanisms of fertilization in mammals. In Fertilization and Embryonic Development in Vitro (Mastroianni, L. Jr. and Biggers J. D., eds) p81-90, Plenum Press, New York.
4) 豊田 裕(1984): 試験管内受精と初期胚培養-マウスを中心に、哺乳類の発生工学(大沢仲昭、江藤一洋、館 郷、御子柴 克彦編) p2~10、ソフトサイエンス社、東京。
 4. 原著論文は、刷り上がり6頁以内、短報は同じく2頁以内とし、超過ページについては実費を著者負担とする。
 5. 別刷を希望する時は50部単位で有償で受け付ける。
 6. 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研究室内
哺乳動物卵子学会編集委員会

第14期最後の総会終わる

平成3年6月 日本学術会議広報委員会

日本学術会議は、去る5月29日から31日まで第111回総会を開催しました。今回の日本学術会議だよりでは、その総会で採択された勧告を中心に、同総会の議事内容等についてお知らせします。

日本学術会議第111回総会報告

日本学術会議第111回総会（第14期・第7回）は、平成3年5月29日～31日の3日間開催された。

総会冒頭に逝去された大谷茂盛、石原智男両会員の冥福を祈り黙禱を捧げた。会長からの経過報告の後各部・各委員会の報告があった。続いて規則の一部改正1件、国際対応委員会の設立等運営内規の改正1件、申し合わせ2件、勧告1件、要望1件、対外報告等3件、計9議案の提案があった。これらの議案については、同日午後の各部会での審議を経て、第2日目の午前に採決された。

なお、総会前日の午前には連合部会を開催し、これらの議案の説明、質疑を行った。また、総会に平行し、第1日の夕方には第771回運営審議会が開催されて、これら議案についての各部の審議状況が報告された。

第2日目の午後は、「ポスト湾岸をめぐる諸問題」について自由討議が行われた。

第3日の午前には各特別委員会が、午後には各常置委員会が開催された。

今回の総会では、「大学等における人文・社会科学系の研究基盤の整備について（勧告）」と「公文書館の拡充と公文書等の保存利用体制の確立について（要望）」が採択され、同日（30日）午後、内閣総理大臣に提出され、関係各省に送付された。

日本学術会議としての国際対応組織の問題は、前期からの懸案事項であったが、本期においてもこの問題は新たに増幅され、国際対応委員会を当分の間設立することが決まり、それに伴い運営内規の一部を改正することとなった。

対外報告としては、「人間活動と地球環境に関する日本学術会議の見解」を〔人間活動と地球環境に関する特別委員会〕が、「『医療技術と社会に関する特別委員会報告—脳死をめぐる問題に関するまとめ』について」を〔医療技術と社会に関する特別委員会〕がまとめ採択された。また、会長提案のバイオテクノロジー国際科学委員会及び国際生物学連合への加盟も採択された。

「ポスト湾岸をめぐる諸問題」についての自由討議は、大石泰彦副会長の司会で、はじめに話題提供として第2部の西原道雄部長、第2常置委員会の星野安三郎委員長、平和及び国際摩擦に関する特別委員会の川田侃委員長がそれぞれ部・委員会の審議状況を報告した。それに基づき、会員間での意見交換が行われた。

大学等における人文・社会科学系の研究基盤の整備について（勧告）

国家・社会の健全な発展は、人文・社会科学と自然科学のバランスのとれた学術研究の成果が常にその土壤となっている。ところが、戦後の我が国では、自然科学の急速な進展に比して、人文・社会科学がそれに対応できない状況にある。それは、大学等における人文・社会科学系の研究基盤が整備されないまま放置されていたことに起因する。その上、これからのが我國は、国内的には広く生涯教育を推進し、国際的には各国との研究交流や留学生の受け入れなどを一層積極的に行うことを要請されている。すでに日本学術会議は、第13期において「大学等における学術予算の増額について（要望）」などを要望しており、これを踏まえて第14期では、さきに、主として自然科学系の「大学等における学術研究の推進について－研究設備等の高度化に関する緊急提言－（勧告）」の勧告をした。それに続いて、ここに人文・社会科学系の大学等における研究基盤を早急に改善し、整備するよう勧告する。

まず、人文・社会科学系の研究基盤を改善し、整備するためには、研究に関わる人的構成の強化を必要とする。したがって、なによりも研究者の増員が必要であり、それに関連して、特に若手研究者の養成と研究補助者の増員が求められる。今日、人文・社会科学も自然科学と同様に、研究分野が細分化されるとともに総合化も図られ、それに応じて新しい分野が開発され、それぞれの分野において総合的かつ多面的な研究方法が採られるようになったからである。

また、国内外でのフィールド・ワーク等の研究調査や外国人研究者の招へいなどがより活発に行われるためには、研究費の大幅な増額を必要とする。なお、国公立大学等における研究費の実験系と非実験系による区分は適正な基準により是正する必要がある。

さらに、人文・社会科学系の研究基盤の整備には、図書や資料の収集・保管など学術情報の充実が要求される。それを充たすには、それぞれの研究室における情報処理機器を整備・充実するとともに、図書館・情報センターなどの学術情報機関の拡充を図るべきである。その際、情報処理機器の購入と維持のために相対的に図書購入に当てる費用が圧迫されなければならず、図書費全体についても特段の増額が必要である。

以上のように人文・社会科学の人的・物的な研究基盤の速やかな整備が、国公私立大学のみならず、すべての研究機関において今日切実に要望されている。なお、大学等における研究基盤の整備に役立つ民間からの寄付等の援助には、それに対する包括的かつ柔軟な免税措置等が講じられるよう配慮すべきである。

公文書館の拡充と公文書等の保存利用体制の確立について(要望)〔要旨〕

わが国の公文書等の保存体制は、公文書館法が公布・施行されて大きく前進したが、その体制はなお国際的にみて大きく立ち遅れた状況にある。公文書等はきわめて重要な学術情報であり、かつ、国民共有の文化的・歴史的資産として貴重であることから、その保存・利用体制を確立するために以下の措置を早急に講じられるよう要望する。

1. 国立公文書館の拡充とその権限の強化

現在の国立公文書館はその設備・人員等がきわめて貧弱であり、また、権限が著しく弱小である。国の公文書等の保存利用体制の確立のために、まず国立公文書館の権限を強化し、その設備・人員を大幅に拡充整備する必要がある。

2. 地域文書館の設立・整備のための国の支援の強化

公文書館法の公布以後、地方公共団体において公文書館を設立する動きがあるが、まだ、その動きは限られている。設立を促進し機能を強化するために、国の財政的援助を拡充すると共に、地方公共団体の自主性を尊重しつつ国の技術的な指導・助言を強化する必要がある。あわせて、公文書等の保存に関して、文書館の権限を強化する必要がある。

3. 公文書館専門職員養成制度と資料学・文書館学研究体制の整備

公文書館専門職員の養成・確保は緊急な課題であり、わが国にふさわしい専門職養成制度を早急に確立すべきである。この確立のためには、資料学・文書館学の研究者を確保し研究を推進するための体制を整備する必要がある。

4. 公文書館法の整備

以上のような措置を講じる上で、現在の公文書館法は、公文書館の設置義務とその権限、専門職員の資格と地位、地域文書館への国の支援などについて不十分な点が多くみられるので、これを早急に整備して、公文書等の保存利用体制の確立を推進する必要がある。

人間活動と地球環境に関する日本学術会議の見解〔要旨〕

日本学術会議は、人間活動と地球環境に関する問題に強い関心を持ち、特別委員会や多数の研究連絡委員会において学術情報をを集め、問題を総括し、研究体制の検討等を行ってきた。これらを基礎として見解を表明する。

日本はその自然環境の多様性や、近年の人間活動の急速な進展により環境問題に対して厳しい見方が必要である。この関連の研究は從来必ずしも十分ではなかった。国際協力の下に多岐にわたる学問分野がこれまでの枠を拡大し、多分野の学協会が融合化して活動し、新しい分野の研究活動の強力な推進を図るべきである。また、地球環境問題はグローバルな問題であるが、個々の人間の対応から出発する問題でもあるから教育や啓蒙活動が急務である。

わが国では多数の省庁が研究を行っているが、相互関係や全体を見渡した有機的・体系的な研究推進政策が必要である。日本学術会議はこれらのための助言、連絡、調整等にその組織と能力を生かして活動し努力する。

医療技術と社会に関する特別委員会報告 —脳死をめぐる問題に関するまとめ—

医療技術は不斷に進歩するが、その進歩が著しければ著しい程、医療技術と人々のものの考え方や社会的な習慣との間に調和を欠く状況が生じている。脳死の取扱をめぐる問題はその一つである。本期の本特別委員会では「脳死は人の死か」についての直接的な審議は保留し、「もし脳死をもって人の死とすると、あるいは臓器移植を視点にいれると、何が問題になり、それを如何に考えるか」などについて論議した。本報告はその結果を整理したものである。
(原文のまま、以下項目のみ)

- 1 脳死患者の医療上の取扱
- 2 意思の個別の確認について
- 3 死亡時刻の考え方について
- 4 医療提供側の問題点
- 5 医療費の取扱について

日本の学術研究環境－研究者の意識調査から－（第3常置委員会）刊行される

第3常置委員会は、第13期の「学術研究動向」調査を踏まえ、21世紀に向けて我が国の学術研究の中心的存在として活躍を期待される30歳代から40歳代の若手研究者（約200人）を対照に、学術研究の基礎となる「研究環境」についてのアンケート調査（調査事項は、大別して「学術研究の組織・体制、研究者の養成・確保と国際化、研究費の調達・運用と研究設備、情報の収集・保存）を行い、その結果を基礎に報告書を作成した。なお、本書は日学資料として刊行している。

日本学術会議主催公開講演会「日本の学術研究環境は21世紀に対応できるか開催される

「日本の学術研究環境」の刊行を記念し、平成3年6月6日（木）13時30分～17時00分に日本学術会議講堂において開催された。近藤会長の開会のあいさつの後、澤登第2部会員の司会により、①「日本の学術研究環境－研究者の意識調査から－」（森第7部会員）②純粹基礎研究は大学しかやらない（有馬第4部会員）③私立大学の立場から（松本第2部会員）④「産業の立場から」（内田第5部会員）の講演の後、総合討論を経て、渡邊第7部会員（第3常置委員会委員長）の閉会のあいさつをもって盛況のうちに終了した。なお、本公開講演会の内容は、追って日学双書で刊行する予定である。

平成3年1月以降、委員会等別の対外報告

部	1件	特別委員会	4件
常置委員会	1件	研究連絡委員会	23件

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

第15期最初の総会開催される

平成3年8月 日本学術会議広報委員会

日本学術会議の第15期が7月22日から発足し、7月22日～24日の3日間、第15期最初の総会が開催されましたので、その総会等についてお知らせします。

日本学術会議第112回総会報告

7月22日の第15期の発足に伴い、内閣総理大臣による日本学術会議会員の辞令交付が行われた。第15期の会員は、選出制度が学術研究団体を基礎とする推薦方式になって、3回目の会員である。この第15期会員による最初の総会である、第112回総会が7月22日から24日までの3日間、本会議堂で開催された。

第1日目（22日）は、午前は新会員への辞令交付式があり、午後総会が開会され、直ちに、会長及び両副会長の選挙が行われた。会員による互選の結果、会長には近藤次郎第5部会員が13期、14期に引き続き三選された。人文科学部門の副会長には、川田侃第2部会員、自然科学部門の副会長には、渡邊格第4部会員が選出された（渡邊副会長は再選）。選挙終了後、近藤会長から「新人の方が半数以上おられ、大きな抱負をもっておられると思う。挫折感を持つことのないようできるだけの努力をしたい。皆様にも御協力ををお願いしたい」との就任のあいさつがあり、又、川田、渡邊両副会長からもそれぞれ就任のあいさつがあった。

会長、副会長選出後は、直ちに各部会が開催され、各部の部長、副部長、幹事の選出が行われた。（第15期の役員については、別掲を参照）

第2日目は10時に総会が開催され、近藤会長が14期の会長という資格で第14期の総括的な活動報告を行った。その報告の折々には、国際交流とか、将来計画委員会、学術会議の予算等、会長の感慨、または感想をも交えてその所感を述べた。続いて、会員推薦管理会報告として、久保亮五委員長の代理として事務総長が、第15期会員の推薦を決定するまでの経過報告を行った。

引き続き、会長から3日目の総会で提案・審議する予定の「第15期活動計画委員会の設置について（申合せ案）」に関する各部での事前討議について、並びに各常置委員会の各部での委員の選出について、それぞれ各部へ依頼した。

総会終了後、各部会が開催され、前述の申合せ案の討議及び各常置委員会委員の選出等が行われた。

第3日目（24日）、10時に総会が開会され、会長から「第15期活動計画委員会の設置について」の提案が行われた。

これは、第15期の活動の基本計画の立案を目的とする臨時委員会を次の定例総会までの間、設置することを内容としている。そしてこの提案は原案どおり可決された。

総会終了後、直ちに各部会が開会され、設置が決定された第15期活動計画委員会委員の選出等が行われた。

なお、この第15期活動計画委員会は、総会期間中に第1回の会議を開き、全会員を対象にした第15期の学術会議の活動に関するアンケートの実施を決めるなど、早速その活動を開始した。

また、運営審議会附置委員会、常置委員会、国際対応委員会等も活動を開始した。

第15期日本学術会議の辞令交付式等について

第112回総会に先立ち、第15期日本学術会議会員の辞令交付式が7月22日（月）11時から、総理大臣官邸ホールで行われた。辞令交付式は、海部内閣総理大臣、坂本内閣官房長官、大島、石原両官房副長官、稻橋総理府次長等の出席を得て執り行われた。

第1部から第7部までの会員1人ずつの名前が読み上げられた後全会員の最年長である渡邊格第4部会員が代表して海部総理から辞令を手渡された。この後、海部総理大臣から「会員の皆様には、創造性豊かな科学技術の発展、総合的観点に立った学術研究に係る諸活動に御尽力いただきたい。」とのあいさつがあり、これに応えて第15期会員を代表して渡邊格会員が「微力ながら全力を尽くし、重要な責務を全うし、国民の期待に応えたい。」とあいさつがあり、式は終了した。式には192名の会員が出席した。

また、総会2日の夕方には、学術会議ホールで、坂本官房長官主催の第15期会員就任パーティーが開催された。パーティーは坂本官房長官のあいさつで開会し、日本学士院院長代理の藤田良雄幹事の祝辞があり、これに対する近藤会長の答礼のあいさつ、沢田敏男日本学術振興会会长の発声による乾杯の後、懇談に入った。ホールには溢れんばかりの人々で歓談が続き盛会であった。

第15期日本学術会議役員

会長	近藤 次郎 (第5部・経営工学)
副会長	川田 侃 (第2部・政治学)
副会長	渡邊 格 (第4部・生物科学)
<各部役員>	
第1部 部長	肥田野 直 (心理学)
副部長	弓削 達 (歴史学)
幹事	一番ヶ瀬康子 (社会学)
"	山本 信 (哲学)
第2部 部長	西原 道雄 (民事法学)
副部長	細谷 千博 (政治学)
幹事	正田 椅 (社会法学)
"	山下 健次 (公法学)
第3部 部長	大石 泰彦 (経済政策)
副部長	島袋 嘉昌 (経営学)
幹事	岡本 康雄 (経営学)
"	藤井 隆 (経済政策)
第4部 部長	中嶋 貞雄 (物理科学)
副部長	田中 元治 (化学)
幹事	竹内 郁夫 (生物科学)
"	樋口 敬二 (地球物理学)
第5部 部長	岡村 純吾 (電子工学)
副部長	市川 悅信 (計測・制御工学)
幹事	内田 盛也 (応用化学)
"	増子 昇 (金属工学)
第6部 部長	中川昭一郎 (農業総合科学)
副部長	水間 豊 (畜産学)
幹事	志村 博康 (農業工学)
"	平田 黙 (農芸化学)
第7部 部長	岡田 晃 (社会医学)
副部長	伊藤 正男 (生理科学)
幹事	渥美 和彦 (内科系科学)
"	金岡 祐一 (薬科学)

(注) カッコ内は、所属部・専門

平成4年(1992年)度共同主催国際会議

本会議は、昭和28年以降、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たが、平成4年(1992年)度には、次の6国際会議を開催することが、6月7日の閣議で了解された。(カッコ内は、各国際会議の開催期間と開催地)

・第9回国際光合成会議

(平成4年8月30日～9月5日、名古屋市)

共催団体：日本植物生理学会

・国際地質科学連合評議会及び第29回国土地質学会議

(平成4年8月24日～9月3日、京都市)

共催団体：(社)東京地学協会外5学会

・第5回国際臨床薬理学会議

(平成4年7月26日～31日、横浜市)

共催団体：日本臨床薬理学会

第15期日本学術会議会員の概要について

この度任命された210人の第15期日本学術会議会員の概要を以下に紹介する。(カッコ内は前期)

1 性別 男子207人(207人) 女子3人(3人)

2 年齢別 50～54歳 3人 55～59歳 29人

60～64歳 105人 65～69歳 58人

70～74歳 15人

最年長 74歳(76歳)

最年少 54歳(51歳)

平均年齢 63.5歳(63.1歳)

3 勤務機関及び職名別

(1) 大学関係 国立大学 71人(78人)

公立大学 2人(4人)

私立大学 93人(88人)

その他 3人(2人)

計 169人(172人)

(2) 国公私立試験研究機関・病院等 11人(9人)

(3) その他 法人・団体関係 9人(10人)

民間会社 9人(6人)

無職 10人(13人)

その他 2人(0人)

計 30人(29人)

4 前・元・新別 前会員 88人(109人)

元会員 3人(4人)

新会員 119人(97人)

5 地方別(居住地) 北海道 4人(3人)

東北 8人(6人)

関東 133人(130人)

中部 20人(17人)

近畿 34人(42人)

中国・四国 5人(4人)

九州・沖縄 6人(8人)

(注) 詳細については、日本学術会議月報7月号を参照

・第11回国際光生物学会議

(平成4年9月7日～12日、京都市)

共催団体：日本光生物学協会

・第14回国際平和研究学会総会

(平成4年7月27日～31日、京都市)

共催団体：日本平和学会

・第8回国際バイオレオロジー会議

(平成4年8月3日～8日、横浜市)

共催団体：日本バイオレオロジー学会

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

編 集 後 記

哺乳動物卵子学会誌の第8巻第2号をお届けいたします。

今秋は例年になく雨が多く、日照時間も極めて少なく、天候不順の数ヶ月でありました。

今回は、8編の原著論文を掲載することができ、内容も基礎的研究から臨床面での研究まで幅の広いものとなっております。秋の夜長に是非一読下さいますよう。

なお、第9巻第1号より本誌の投稿規定を一部改正いたしましたので、ご投稿の際はご注意下さいますようお願い申し上げます。

(遠藤 克)

編 集 委 員

委員長：石島 芳郎

委員：伊藤雅夫，井上正人，遠藤 克，小栗紀彦

久保春海，香山浩二，新村末雄，星 和彦

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

第8巻 第2号

Vol. 8

NO.2

平成3年9月25日 印刷

(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 藤沢市龜井野1866
日本大学農獣医学部獣医生理学教室内
TEL. 0466-81-6241 (内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)

三共の家畜繁殖用ホルモン製剤

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

日本薬局方 注射用胎盤性性腺刺激ホルモン

動物専用 フペローケン®

1,500単位 3,000単位 5,000単位 10,000単位

日本薬局方 オキシトシン注射液

動物専用 ヒントシン®-O

日本薬局方 安息香酸エストラジオール注射液

動物専用 エナンドール®

日本薬局方 プロゲステロン注射液

動物専用 ルテオーケン®

ご使用の際は、添付文書の用法・用量、使用上の注意等をご覧ください。



販売元 三共株式会社
東京都中央区銀座2-7-12

動物用医薬品 V.A・D₃・E配合

胎盤性性腺刺激ホルモン

油性動物用 フペローケン®V

動物用医薬品 脳下垂体後葉注射液

動物用 ヒントシン®

動物用医薬品 持続型プロゲステロン注射液

動物用 ルテオーケン®L

動物用医薬品 エストリオール水性懸濁注射液

動物用 エストリオール注〔三共〕

動物用医薬品 受胎向上・EP複合注射液

ルテオーケン®E



製造元 三共ゾーキ株式会社
東京都品川区広町1-4-4

健保適用

下垂体性性腺刺激ホルモン パーゴナル[®]注75・150

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



【効能・効果】

間脳性（視床下部性）無月経、下垂体性無月経の排卵誘発

【用法・用量】

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

【包装】

パーゴナル注75：10管
パーゴナル注150：10管



帝國臓器製薬株式会社
東京都港区赤坂二丁目5番1号

【使用上の注意】

- 一般的注意
 - 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。
 - 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。
 - 患者の状態（例えばエストロゲン・性腺刺激ホルモン・ブレグナジオール分泌、頸管粘液、基礎体温等）を詳細に検査し、子宮性無月経の患者には投与しないこと。
 - 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。
 - 本療法の卵巣過剰刺激による副作用を防ぐため、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。
 - 患者の自覚症状（特に下腹部痛）の有無
 - 卵巣腫大の有無
 - 基礎体温の異常上昇の有無（毎日測定させること）
 - 頸管粘液量とその性状
 - 卵巣過剰刺激の結果としての多胎妊娠の可能性があるので、その旨をあらかじめ患者に説明すること。
 - 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。
 - 産婦人科・内分泌専門医師の管理のもとに投与すること。
 - 次の場合には投与しないこと
 - 卵巣腫瘍及び多くのう胞性卵巣症候群を原因とする卵巣の腫大を有する患者
 - 妊娠
 - 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。
 - 児を望まない第2度無月経患者
 - 多くのう胞性卵巣を有する患者
 - 副作用
 - 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。
 - その他 ときに恶心、頻尿、しづれ感、頭痛、浮腫があらわれることがある。また尿量が増加することがある。
 - 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。

プロゲステロン濃度が10分間で判定できる!

牛乳に試薬を加えるだけで
プロゲステロン濃度を
簡便かつ迅速に判定して
牛の妊娠診断ができます。

■動物用医薬品

オブ"チェックカウサイド・W 《体外診断用》

■牛乳中プロゲステロン定性測定キット



新発売

■特長

- 目で見て判定できるので、略農・臨床現場で便利です。
- 操作が簡便で、10分間で測定できます。
- 検査には、採材し易い牛乳(全乳)を用います。
- 牛乳中プロゲステロンを、簡便に判定でき、
再現性が高いEIAキットです。
- アメリカやヨーロッパではすでに牛の早期妊娠
診断に広く普及しています。

お問い合わせ先▶営業部 044-266-0400

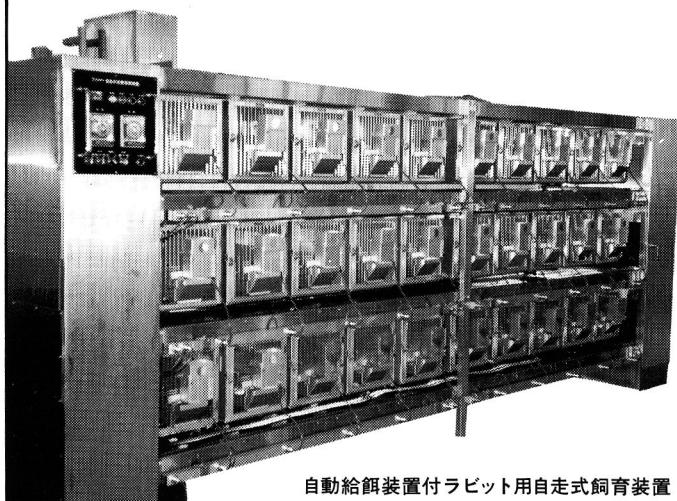
製造元 ケンブリッジ ベテリナリイ サイエンス社
Cambridge Veterinary Sciences
a division of Cambridge Life Sciences plc

輸入発売元

テルカ製薬株式会社
神奈川県川崎市川崎区中瀬3丁目19番11号 〒210

給餌の自動化を実現いたしました!!

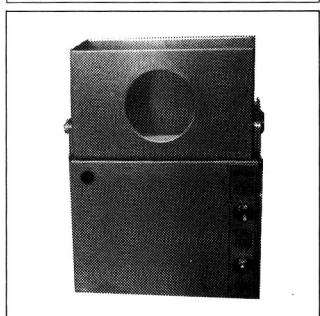
自動給餌装置は各ケージに1台ずつ取付けるカートリッジタイプ
の本体とそれらを一括自動制御するシステムから成立っています。



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。
- 安全性を考え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

