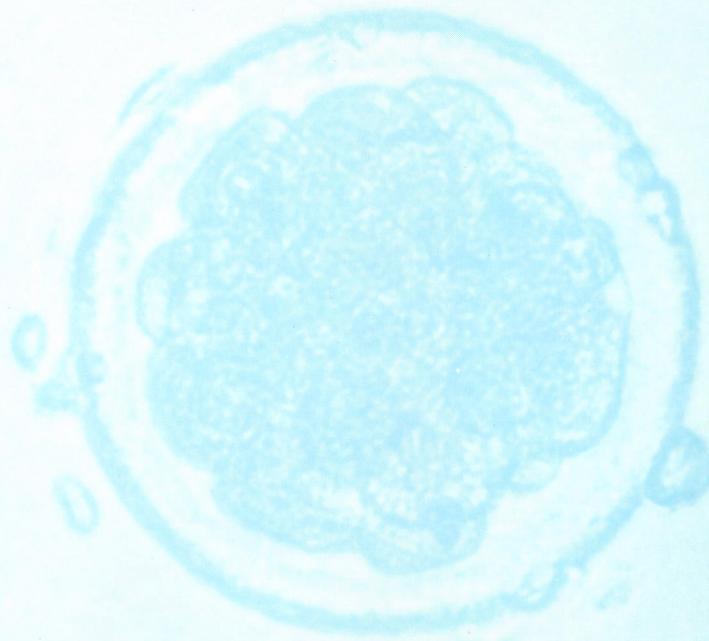


ISSN 0916-7625

哺乳卵学誌  
J. Mamm. Ova Res.

# 哺乳動物卵子学会誌

Journal of Mammalian Ova Research



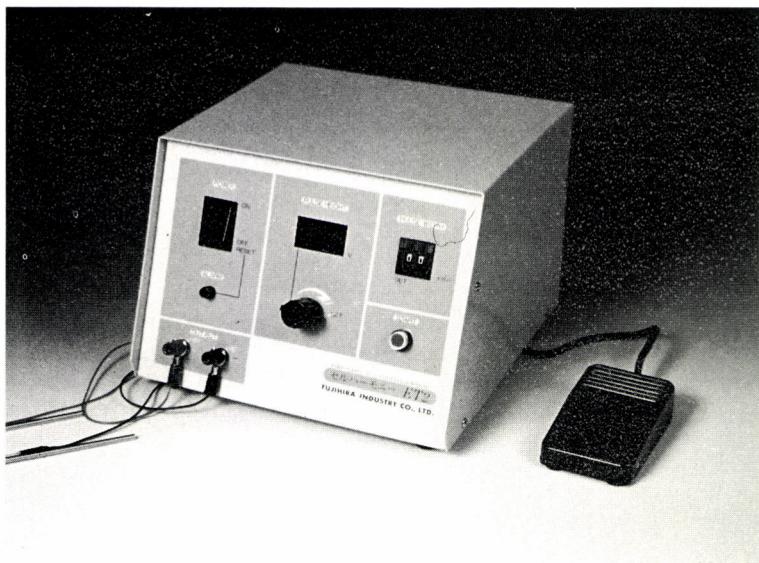
哺乳動物卵子学会

Japanese Society of  
Mammalian Ova Research

Vol. 9 No. 1

April 1992

# 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】

DCパルス電圧：3～50V  
DCパルス幅：10～300μS  
DC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6kg  
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 ファクシミリ(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

# 哺乳動物卵子学会誌

第9巻 第1号

平成 4年 4月

## 目 次

原 著

ミンク卵母細胞の回収および体外成熟

亀山祐一、橋詰良一、石島芳郎 ..... 1

電気的融合法による異属間（マウス、ラット）の前核と細胞質の融合

ならびに前核置換卵の卵割について

辻井弘忠、寺社下浩一 ..... 7

月別にみた牛卵胞卵子の体外受精後の発育能（英文）

音井威重、立川 進、近藤正治、鈴木達行 ..... 15

牛未成熟卵子のK99保有大腸菌への曝露と洗浄による細菌除去、

—特に卵丘細胞の有無による洗浄効果の比較—

音井威重、立川 進、近藤正治、鈴木達行 ..... 21

### 第33回哺乳動物卵子学会講演要旨集

特別講演

卵のQualityに関する考察

鈴木秋悦 ..... 27

マウス卵および着床前初期胚の成熟とエネルギー代謝

加藤 尚彦 ..... 29

哺乳動物卵子研究の展望

豊田 裕 ..... 31

一般講演

LH-RH及び数種ホルモンによる過排卵誘起時の初期胚の正常性について

船内克俊、原 秀平、加田日出美 ..... 33

PMSGによるラット移植卵巣の卵胞発育

利部 聰、萬場光一、牧田登之 ..... 35

チャイニーズハムスターの過排卵誘発法

飯沢禎之、柳田 薫、星 和彦、上口勇次郎、美甘和哉 ..... 37

マウス顆粒膜細胞間のGap Junction

小池数与、渡辺 眩、外崎 昭、広井正彦 ..... 39

ヤギにおけるPMSG-PG処置後の卵胞発育

青島義明、佐々田比呂志、菅原七郎 ..... 41

早発卵巣不全患者におけるGnRH agonistを用いた排卵誘発

河野康志、榎原久司、吉松 淳、松井尚彦、宮村研二、宮川勇生 ..... 43

マウス透明帯構成糖タンパク質Z P 3の発現に関する組織化学的解析	
木村順平、小瀬村伊久美、佐藤嘉兵、月瀬 東、岡野真臣	.....45
ブタ透明帯糖質蛋白質（Z P 4）のアミノ酸配列について	
長谷川昭子、井上みゆき、香山浩二、磯島晋三	.....47
ニホンハタネズミ精子のマウス及びハムスター卵子透明帯通過について	
若山照彦、正田陽一、圓山悠子、小泉伸夫、今村憲吉、福田勝洋	.....49
卵丘除去マウス卵子の体外受精に及ぼす豚卵胞液画分の効果	
石川和男、F.P.DAEN、内藤邦男、豊田 裕	.....51
Epidermal growth factor(EGF)のマウス胚DNAおよびRNA合成に及ぼす影響	
高尾成久、原田 省、大野原良昌、見尾保幸、寺川直樹	.....53
卵管液中基質濃度とラット受精卵の体外培養	
松本浩道、菅原七郎	.....55
ハムスター体外受精胚における2-cell block 現象起因因子の検討	
中山貴弘、野田洋一、馬岡 陽、森 崇英	.....57
ミドリザルの卵胞発育誘起と体外受精	
山海 直、井田 聰、若林庸夫、長 文昭	.....59
豚体外受精卵の発生に及ぼす豚血清、卵胞液および卵管灌流液の影響	
戸津川 清、今 千賀子、齊藤英文	.....61
牛胚の胚盤胞期への発生に関与する血清分画について	
建本秀樹、堀内俊孝、山田 學	.....63
共焦点レーザー走査型顕微鏡によるマウス卵母細胞表層のLCA（レクチン）	
レセプターの観察	
岡田詔子、三島真喜子、川村 良、永江 肇、猪俣賢一郎	.....65
マウス卵子の Laser Scanning Microscopeによる観察	
横田秀夫、木村順平、佐藤嘉兵	.....67
ハムスター卵母細胞における表層粒の卵胞発育に伴う変化	
細江実佐、新村末雄、石田一夫	.....69
ハムスターの卵成熟分裂にみられる卵表層のアクチンの分布の変化	
平尾幸久、山崎 尚	.....71
卵の成熟過程における表層顆粒の動態に関する検討	
小関みづほ、南郷周児、木村裕幸、大庭三紀子、倉沢滋明、	
鈴木秋悦、野澤志朗	.....73
体内で成熟したマウス卵子の単為発生誘起条件の検討	
中川 明、坂本裕敬、川島一成、菅 徹行	.....75
ハムスター卵胞卵の卵核胞崩壊と体外成熟に及ぼすプロテインキナーゼ	
阻害剤の影響	
堀内俊孝、建本秀樹、山田 學	.....77

犬卵子の体外成熟	
山田秀一、島津美樹、川野裕子、内藤邦彦、豊田 裕	79
豚卵胞卵子の体外成熟に及ぼすPMSGとhCGの影響	
上田 大、康 承律、高木優二、保科和夫、辻井弘忠	81
豚卵子の成熟分裂におけるp34 <sup>cdc2</sup> キナーゼの活性化	
内藤邦彦、青木不学、崔 泰生、東 貞宏、山下正兼、長濱嘉孝、 河本 馨、豊田 裕	83
卵子形成過程におけるc-mos の発現に関する組織化学的解析	
小瀬村伊久美、大塚麻理子、木村順平、佐藤嘉兵	85
マウス卵胞内卵子および排卵卵子の顕微授精；授精用培地内Ca <sup>2+</sup> 濃度 (CaCl <sub>2</sub> :1.71mM, 3.42mM) の受精率に及ぼす影響	
土屋 秀樹、藤本 午朗、佐賀 正彦、浜田 宏、尾川 昭三	87
各種成長因子のマウス卵子受精能におよぼす影響	
陳 健業、寺田幸弘、萬代泰男、渡部 正、田村みどり、千田定規、 村上 節、戸沢秀夫、対木 章、深谷孝夫、矢嶋 晴	89
受精時および単為発生時におけるマウス卵細胞内カルシウム濃度の変化	
椎名有二、金田 城、田中万博、土居勝彦、広井正彦	91
マウス胚性幹細胞の核移植の試み	
角田幸雄、加藤容子	93
ウシにおけるES細胞株作出の試み	
高橋清也、今井 裕	95
除核未受精卵の体外受精により作出したマウス雄性発生胚の発生能	
河野友宏、佐藤靖弘、外丸祐介、中原達夫	97
ウシ核移植卵の体外発生能に及ぼす融合時期ならびに培養液の影響	
加藤容子、新田良平、高野 博、角田幸雄	99
ダルベッコ修正培養液を用いたキメラマウス胚の培養成績	
高橋正浩、石原由美、高橋壽太郎、安田泰久	101
卵細胞質内精子核注入による受精へのCa-ionophore 前処理の影響	
柳田 薫、片寄治男、市川文隆、阿部利明、星 和彦	103
ヒトの卵子内精子注入－電子顕微鏡による観察	
井上正人、佐藤素子、瀬戸敦子、小林善宗、 本田育子、野見山真理、藤井明和	105
ミクロウエスタンプロッティング法によるマウス初期胚の糖輸送担体の解析	
森田 豊、堤 治、細谷岩生、武谷雄二、水野正彦、加藤尚彦	107
マウス初期胚糖取込み能への成長因子の影響	
細谷岩生、堤 治、森田 豊、綾部琢哉、三橋直樹、 武谷雄二、水野正彦、加藤尚彦	109

マウス初期胚発生に及ぼすエンドトキシンの影響、一作用時期に関する検討—	
詠田由美、吉満陽孝、池田景子、白川光一	111
マウス、サルにおけるEmbryo Biopsy と P C R：着床前遺伝子診断モデル	
竹内一浩、永田行博、G.D.Hodgen	113
着床前診断のためのembryo biopsy 法に関する検討	
雀部 豊、安部裕司、臼井 彰、池永秀幸、片山 進、久保春海、百瀬和夫	115
受精卵凍結融解後の胚の膜機能に関する研究	
大野原良昌、高尾成久、原田 省、見尾保幸、寺川直樹	117
ガラス化凍結保存によるラット胚盤胞の形態学的観察について	
大星茂樹、仲道麗子、藤原 昇、古賀 優	119
DMSO／P R O H混合液を用いたマウス初期受精卵の超急速凍結保存について	
田谷順子、石原 理、木下勝之	121
超急速凍結法により保存した牛体外受精卵の微細構造の変化	
續木靖浩、芦沢幸二	123
ヒト凍結卵子および受精卵解凍胚移植の臨床的検討	
小田原 靖、立花郁雄、武田信好、千田 智、飯田修一	
蛭田益紀、森 滋、鈴木雅洲	125
胚盤胞形成過程のマウス胚におけるアクチンとサイトケラチンの組織	
化学的観察	
四谷伊公子、新村末雄、石田一夫	127
ハムスター卵管上皮に対する单クローラン抗体を用いた免疫組織化学的研究	
黒木圭一、木村順平、月瀬 東、岡野真臣	129
シバヤギ卵管上皮に対する单クローラン抗体を用いた免疫組織化学的研究	
山田英雄、木村順平、月瀬 東、岡野真臣、森 裕司	131
マウスにおける経卵管壁卵管内胚移植の試み	
中瀧直己、上田 進	133
体外受精—胚移植（1991）	
小林善宗、本田育子、井上正人、野見山真理、藤井明和	135
体外受精—培養—移植系の薬物の安全性試験への応用；抗癌剤投与	
雄マウスの受精能試験	
上田乙也、鈴木宏志、安達二朗、杉山 修	137
ハムスターの卵管内精子移動に及ぼすOvulatory productsの影響	
伊藤雅夫、柳町隆造	139
家兎卵管膨大部の遠位端における精子の受精能獲得と卵分割	
成相孝一、金山喜一、遠藤克、佐久間勇次	141
ヒト精子性状と精子のアクリシン、ヒアルロニダーゼ、チューブリン、	
ダイニン、アクチン	
菅野孝子、吉松宣弘、佐々木宏子、中木純子、藤森 淑、柳田 薫、星和彦	143

# Journal of Mammalian Ova Research

Vol. 9 ,No. 1

April 1992

## Contents

### Originals

Recovery and in vitro maturation of mink oocytes.

KAMEYAMA, Y., R. HASHIZUME & Y. ISHIJIMA ..... 1

Cleavage of Hterogenetically—reconstituted eggs by electrofusion of nucleus and cytoplasm and exchannge of pronucleus from mouse and rat eggs.

TUJII, H. & K. JISHAGE ..... 7

In vitro development of bovin oocytes collected from ovaries in every month through the year after in vitro fertilization.

OTOI, T., S. TACHIKAWA, S. KONDO & T. SUZUKI ..... 15

In vitro exposure of bovine immature oocytes to K99<sup>+</sup>Escherichia coli and elimination of exposed bacteria by washing, —Especially comparison of washing effectiveness with or without cumulus cell——.

OTOI, T., S. TACHIKAWA, S. KONDO & T. SUZUKI ..... 21

Proceeding of the 33th Annual Meeting of Japan Society of Mammalian Ova Research.

### Special reports

Some aspects on ovum quality.

SUZUKI, S. ..... 27

Maturation and energy-metabolism of oocytes and preimplantation embryos from mice.

KATO, T. ..... 29

Future prospects of mammalian ova research.

TOYODA, Y. ..... 31

### General reports

Discussion on normality of embryo obtained by superovulation treatment with LH-RH or other hormone preparation.

FUNAUCHI, K., S. HARA, & H. KADA ..... 33

Effect of PMSG on follicular development in transplanted rat ovary.

KAGABU, S., K. MAMBA, & T. MAKITA ..... 35

Superovulation of chinese hamster.

IIZAWA, Y., K. YANAGIDA, K. HOSHI, Y. KAMIGUCHI & K. MIKAMO ..... 37

Gap junctions of mouse granulose cells.	
KOIKE,K.,H.WATANABE,A.TONOSAKI & M.HIROI .....	39
Follicular growth after PMSG-PG treatment in the goat.	
AOSHIMA,Y.,H.SASADA & S.SUGAWARA .....	41
Induction of ovulation using GnRH agonist in patient with premature ovarian failure.	
KAWANO,Y.,H.NARAHARA,J.YOSIMATU,N.MATSUI,K.MIYAMURA & I.MIYAKAWA .....	43
Molecular cytochemistry of mouse zona pellucida component protein(ZP3).	
KIMURA,J.,I.KOSEMURA,K.SATO,A.TUSKISE & M.OKANO.....	45
Amino acid sequence analysis of a porcine zona pellucida glycoprotein(ZP4).	
HASEGAWA,A.,M.INOUE,K.KOYAMA & S.ISOJIMA .....	47
On the ability of vole spermatozoa to pass through the zona pellucida of mouse and hamster ova.	
WAKAYAMA,T.,Y.SHODA,Y.MARUYAMA,N.KOIZIMI,K.IMARURA & K.FUKUDA .....	49
Effect of a fraction from porcine follicular fluid on in vitro fertilization of mouse eggs after removal of cumulus oophorus.	
ISHIKAWA,K.,F.P.DAEN,K.NAITO & Y.TOYODA .....	51
Effects of epidermal growth factor on DNA and RNA synthesis in mouse embryos.	
TAKAO,N.,T.HARADA,Y.ONOHARA,Y.MIO & N.TERAKAWA .....	53
In vitro development of rat 1-cell embryos in chemically defined media modified with substrate in oviductal fluids.	
MATSUMOTO,H. & S.SUGAWARA .....	55
Analysis of factors causing two-cell block to development of cultured hamster embryos fertilized in vitro.	
NAKAYAMA,T.,Y.NODA,Y.UMAOKA & T.MORI .....	57
Superstimulation and in vitro fertilization in the african green monkey.	
SANKAI,T.,S.IDA,T.WAKABAYASHI & F.CHO .....	59
Effects of pig serum,follicular fluid and oviductal perfusate on development of pig follicular oocytes fertilized in vitro.	
TOTSUKAWA,K.,C.CON & H.SAITO .....	61
The stimulatory effect of serum fractions on the development of bovine embryos to blastocyst stage.	
TATEMOTO,H.,T.HORIUCHI & M.YAMADA .....	63
Distribution of the site of LCA(Lectin) receptors in the cortical surface of oocyte using confocal laser-scanning microscopy.	
OKADA,A.,M.MISHIMA,M.KAWAMURA,T.NAGAE & K.INOMATA .....	65

Observation of mouse eggs by the laser scanning microscope.	
YOKOTA,H.,J.KIMURA & K.SATO	67
Changes in cortical granules in hamster oocytes during the folliculogenesis.	
HOSOE,M.,S.NIIMURA & K.ISHIDA	69
Cortical changes in actin distribution during the meiotic maturation in the hamster egg.	
HIRAO,Y. & H.YAMASAKI	71
Studies of cortical granuels in the process of oocyte maturation.	
KOSEKI,M.,S.NANGO,H.KIMURA,M.OBA,S.KURASAWA,S.SUZUKI & S.NOZAWA	73
Studies on the parthengenic activation of mouse oocytes matured in vivo.	
NAKAGAWA,A.,H.SAKAMOTO,K.KAWASHIMA & T.SUGA	75
Effects of protein kinase inhibitors on germinal vesicle breakdown and in vitro maturation of hamster follicular oocytes.	
HORIUCHI,T.,H.TATEMOTO & M.YAMADA	77
In vitro maturation of canine oocytes.	
YAMADA,S.,Y.SHIMAZU,Y.KAWANO,K.NAITO & Y.TOYODA	79
Effects of PMSG and hCG on the maturation of pig oocytes in vitro.	
UEDA,M.,S.KAN,Y.TAKAGI,K.HOSINA.,& H.TUJII	81
Activation of P34 <sup>cdc2</sup> protein kinase activity in meiotic maturation of porcine oocytes.	
NAITO,K.,F.AOKI,T.CHOI,S.AZUMA,M.YAMASITA,Y.NAGAHAMA, K.KOHMOTO & Y.TOYODA	83
Histochemical analysis of <u>c-mos</u> expression during oogenesis.	
KOSEMURA,I.,M.OHTSUKA,J.KIMURA & K.SATO	85
Subzonal insemination (assisting sperm adhesion onto ooplasm) and subsequent culture with the medium containing elevated concetntion of Ca <sup>2+</sup> in the follicular and-ovulated mouse ova.	
TSUTIYA,H.,G.FUJIMOTO,M.SAGA,H.HAMADA & S.OGAWA	87
The effect of growth factors on the fertilization of the mouse oocytes.	
CHAN,W.,Y.TERADA,Y.MANDAI,T.WATANABE,M.TAMURA,S.CHIDA, T.MURAKAMI,H.TOZAWA,A.TUIKI,T.FUKAYA & A.YAJIMA	89
Changes in intracellular Ca <sup>2+</sup> in fertilization and parthonogenesis in mouse eggs.	
SHIINA,Y.,M.KANEDA,K.TANAKA,K.DOI & M.HIROI	91
Nuclear transplantation of embryonic stem cells in the mouse.	
TSUNODA,Y. & Y.KATO	93
An attempt for the establishment of bovine ES cells.	
TAKAHASHI,S. & H.IMAI	95

Development of mouse androgenetic embryos produced by in vitro fertilization of the enucleated oocytes.	
KONO, T., Y. SATO, Y. SOTOMARU & T. NAKAHARA .....	97
Effects of timing of fusion and culture medium on the development of bovine eggs receiving blastomeres from 16~32-cell embryos in vitro.	
KATO, Y., R. NITTA, H. TAKANO & Y. TSUNODA.....	99
Results of culture of chimeric mouse embryos in a modified Dulbecco's medium.	
TAKAHASHI, M., Y. ISHIHARA, J. TAKAHASHI & Y. YASUDA .....	101
The effect of Ca-ionophore pretreatment of oocytes on microfertilization.	
YANAGIDA, K., H. KATAYOSE, H. ICHIKAWA, T. ABE & K. HOSHI.....	103
Electron microscopic observations of human oocytes microinjected with human spermatozoa.	
INOUE, M., M. SATO, A. SETO, Y. KOBAYASHI, I. HONDA, M. NOMIYAMA & A. FUJII .....	105
Micro Western Blot analysis of glucose-transporter expression during development of mouse preimplantation embryos.	
MORITA, Y., O. TSUTSUMI, I. HOSOYA, Y. TAKETANI, M. MIZUNO & T. KATO .....	107
Effect of growth factors on maturation of preimplantation mouse embryos.	
HOSOYA, I., O. TSUTSUMI, Y. MORITA, T. AYABE, N. MITSUHASI, Y. TAKETANI, M. MIZUNO & T. KATO .....	109
Effects of endotoxin to early embryo development of mouse.	
—Evaluation of stage of embryo development —	
NAGATA, Y., K. YOSHIMITSU, K. IKEDA & K. SHIRAKAWA .....	111
Embryo biopsy and PCR using mouse and monkey pre-embryos:	
Pre-clinical models for human pre-embryo biopsy and genetic diagnosis.	
TAKEUCHI, K., Y. NAGATA & G. D. HODGEN .....	113
Evaluation of embryo biopsy methods for preimplantation diagnosis.	
SASABE, Y., Y. ABE, A. USUI, H. IKENAGA, S. KATAYAMA, H. KUBO & K. MOMOSE .....	115
The assessment of metabolic function of frozen-thawed embryos.	
ONOHARA, Y., N. TAKAO, T. HARADA, Y. MIO & N. TERAKAWA .....	117
Microscopical observations of rat blastocysts cryopreserved by vitrification.	
OHBOSHI, S., R. NAKAMISHI, N. FUJIHARA & O. KOGA .....	119
Ultrarapid freezing of early stage mouse embryos in DMSO-PROH mixture.	
TAYA, J., O. ISHIHARA & K. KINOSHITA .....	121

The ultrastructural chnges of in vitro fertilized bovine embryos  
after ultrarapid freezing and thawing.

TSUZUKI, Y. & K. ASHIZAWA ..... 123

Clinical outcome of frozen-thawed oocyte and embryo replacement.

ODAWARA, Y., I. TACHIBANA, N. TAKEDA, S. CHIDA, S. IIDA,  
M. HIRUTA, S. MORI & M. SUZUKI ..... 125

Histochemical observations of actin and cytokeratin in mouse embryos  
in the course of blastocyst formation .

YOTSUTANI, I., S. NIIMURA & K. ISHIDA ..... 127

Immunohistochemical study of oviductal epithelial cells in the hamster  
using monoclonal antibody.

KUROKI, K., J. KIMURA, A. TSUKISE & M. OKANO ..... 129

Immunohistochemical study of oviductal epithelial cells in the shiba-goat  
using monoclonal antibody.

YAMADA, H., J. KIMURA, A. TSUKISE, M. OKANO & Y. MORI ..... 131  
Embryo transfer through the wall of the fallopian tube in mice.

NAKAGATA, N & S. UEDA ..... 133

Result of IVF-ET (1991).

KOBAYASHI, I., I. HONDA, M. INOUE, M. NOMIYAMA & A. FUJII ..... 135  
Application of in vitro fertilization-embryo culture-embryo transfer system  
on the drug safty evaluation : Fertility of male mice administered  
with the anticancer drug.

UEDA, O., H. SUZUKI, A. MATSUOKA, J. ADACHI & O. SUGIYAMA ..... 137  
Effect of ovulatory products on sperm transport in the hamstar oviduct.

ITO, M. & R. YANAGIMACHI ..... 139

Sperm capacitation and cleavage of ova in the ampulla of the tube  
in rabbits.

NARIAI, K., K. KANAYAMA, T. ENDO & Y. SAKUMA ..... 141  
Human semen propertiws in sperm acrosin, hyaluronidase, tubulin,  
dynein and actin

SUGANO, T., N. TOSHIMATU, H. SASAKI, J. NAKAKI,  
S. FUJIMORI, K. YANAGIDA & K. HOSHI ..... 143

# ミンク卵母細胞の回収および体外成熟

Recovery and *in vitro* maturation of mink oocytes.

亀山祐一・橋詰良一・石島芳郎

Yuichi KAMEYAMA, Ryoichi HASHIZUME and Yoshiro ISHJIMA

東京農業大学生物産業学部

Faculty of Bioindustry, Tokyo University of Agriculture.

**Abstract:** At 0, 1, 2 and 4 days after coitum, ovaries were obtained from female minks treated with or without PMSG at breeding season. The mean number of oocytes recovered per ovary were 2.0~10.0 by puncturet of follicles with needle and 7.9 ~32.7 by mince of ovary with razor. About 70 % of oocytes recovered by mincing were classified types of morphology as surrounding no layer of cumulus cells or abnormal. Oocytes without dispersed cumulus cells did not resume meiosis. At 48 hr of culture, maturation rate of oocytes with thick and tight cumulus cells were 31.4 and 21.4 % for TYH and TCM199, respectively.

KEY WORDS: Mink, Cumulus cells

(受付1991年12月15日, 受理1992年2月1日)

## 緒 言

ミンクの繁殖生理は主要生産国を中心とする諸外国でかなり検討されているが<sup>13)</sup>、ミンクの繁殖性の向上や改良が期待される発生工学的研究は、現時点ではほとんど行われていない。そこで、本実験ではミンクの体外受精法確立の一環として、卵母細胞の回収ならびに体外成熟を試みた。

## 材料および方法

実験には、繁殖季節（2月下旬～3月上旬）のホワイトおよびジェットブラック系成熟雌ミンクから、未交配（0日）、交配後1および4日、PMS G処理・交配後2および4日に摘出した卵巣を供試した。PMS G（PMS ゼンヤク、日本全薬）は、日量50IUを午前10時に5日間筋肉注射した。

摘出卵巣は、直径0.5 mm以上の卵胞を有柄針で穿刺して胞状卵胞内の卵母細胞を回収し、次いで穿刺後の卵巣をカミソリ刃で1mm角に細切・濾過(300 μmメッシュ)して潜在卵母細胞を回収した。卵母細胞の回収にはP B Sを使用した。

回収卵母細胞は、既報<sup>7, 8)</sup>に準じて以下の6つに分類した。

膨潤化：卵丘細胞が膨潤化しているもの。

A : 卵丘細胞が厚く緊密に付着しているもの。

B～C : 卵丘細胞は付着しているが、付着程度がAより劣るもの。

D : 卵丘細胞がまったく付着していないもの。

S : 卵丘細胞の付着程度とは関係なく、卵母細胞自体の直径が明らかに小さいもの。

異常 : 形態および色彩的に異常と思われるもの。

成熟培養は、T Y H もしく T C M 199 (SIGMA) に 10% の F C S を添加したもの用い、温度 37°C、炭酸ガス 5 %、空気 95 %、湿度 100 % の条件下で 48 時間まで行った。

核相の判定は、カルノア液で固定後、1 % アセトオルセインで染色して行った。

### 結 果

交配後 0 ~ 4 日に卵胞穿刺と卵巣細切による採卵を試みた結果は、Table 1 に示すとおりである。PMSG 处理しなかった場合の平均卵巣重量は 52.3 ~ 102.2 mg で、一卵巣当たり 3.8 ~ 7.8 個の卵胞から 2.0 ~ 4.3 個の卵母細胞が回収され、穿刺後の卵巣細切では 7.9 ~ 13.9 個の卵母細胞が回収できた。PMSG 处理した場合には、平均卵巣重量が 131.0 ~ 139.3 mg、穿刺可能卵胞数が平均 13.5 ~ 18.0 個と増加し、卵胞穿刺で平均 3.0 ~ 10.0 個、卵巣細切で平均 10.0 ~ 32.7 個の卵母細胞が回収できた。全体では、39 個の卵巣の 257 個の卵胞から 47.5 % にあたる 122 個の卵母細胞が回収され、卵巣細切では 533 個の卵母細胞が回収できた。

Table 1 Recovery of mink oocytes by puncture of follicle and mince of ovary.

PMSG	Days after coitum	No. of ovaries used	Weight of ovaries (mg)	No. of puncturing follicles (>0.5mm)	No. of oocytes recovered by		Total no. of recovered oocytes
					Puncture of follicle	Mince of ovary	
None	0	12	52.3	4.5	2.6	7.9	10.5
			± 2.86	± 0.79	± 0.51	± 1.12	± 1.43
	1	4	65.3	7.8	4.3	19.3	23.5
			± 11.52	± 0.54	± 0.65	± 4.53	± 4.48
	4	16	102.2	3.8	2.0	13.9	15.9
			± 12.49	± 0.71	± 0.40	± 1.86	± 2.11
Given*	2	3	139.3	18.0	10.0	32.7	42.7
			± 8.09	± 5.91	± 4.11	± 5.04	± 8.92
	4	4	131.0	13.5	3.0	10.0	13.0
			± 5.56	± 2.80	± 1.54	± 3.59	± 5.12

\* PMSG(50IU/d) were given for 5 days before coitum.

Mean ± S.E.

回収卵母細胞の内訳は、Table 2 に示すとおりである。内訳を採卵法別にみると、卵胞穿刺が膨潤化型17個（13.9%）、A型78個（63.9%）、B～C型12個（9.8%）、D型12個（9.8%）、異常3個（2.5%）であり、卵巣細切がA型60個（11.3%）、B～C型75個（14.1%）、D型159個（29.8%）、S型16個（3.0%）、異常223個（41.8%）であった。膨潤化型は交配後1日の卵胞を穿刺した場合にのみ回収され、S型は卵胞穿刺ではまったく回収されなかった。卵丘細胞が厚く緊密に付着したA型卵母細胞は、交配後1日を除けば卵胞穿刺では回収卵の58.4～77.4%と多くを占めたが、卵巣細切では8.2～18.2%を占めたにすぎなかった。

Table 2 Morphological classification of recovered mink oocytes.

PMSG	Days after coitum	No. of ovaries recovered	Method of recovery	Morphological classification**					% of type A oocytes		
				Exp.	A	B～C	D	S	Abnormal	Total	
None	0	126	Puncture		24	5	1		1	31	77.4
			Mince		11	15	45	5	19	95	11.6
	1	94	Puncture	17						17	0
			Mince		14	4	16	4	39	77	18.2
Given*	4	253	Puncture		27	2	1		2	32	84.4
			Mince		22	42	47	5	107	223	9.9
	2	128	Puncture		20	5	5			30	66.7
			Mince		8	8	33	2	47	98	8.2
Given*	4	46	Puncture		7		5			12	58.4
			Mince		5	6	18		11	40	12.5

\* PMSG (50IU/ml) were given for 5 days before coitum.

\*\* Exp.: Oocytes with expanded cumulus cells, A: Oocytes with thick and tight cumulus cells, B～C: Oocytes with poor cumulus cells compared A, D: Oocytes without cumulus cells, S: Small oocytes.

回収卵母細胞をT Y HもしくはT CM199を用いて48時間まで成熟培養した結果、Table 3 に示す成績が得られた。培養0時間すなわち採取直後に検査した膨潤化型卵母細胞は、4個中3個が中期I～終期Iの分裂像を示した。これに対してA、B～CおよびD型の卵母細胞は、退行像を示さないかぎり卵核胞期であった。このように、膨潤化型の卵母細胞はすでに減数分裂を再開していたので、6時間だけ培養したところ、いずれも採取直後同様に中期I～終期Iの分裂像が得られたにすぎず、中期IIへの発育は観察されなかった。

培養48時間における成熟率は、A型がT Y Hで31.4%、T C M 199で21.4%、B～C型がT Y Hで2.7%、T C M 199で33.3%、D型がT Y Hで3.9%、T C M 199で10.6%であった。

Table 3 *In vitro maturation of mink oocytes.*

Duration of culture	Type of oocytes**	Media	No. of oocytes examined	Stage of maturation*			Maturation rate (%)
				GV	M I ~ T I	M II	
0 hr	Exp. A B~C D	TYH 199	4	1	3		0
			22	21		1	0
			8	5		3	0
			21	19		2	0
6 hr	Exp.	TYH 199	5	4		1	0
			2	2			0
48 hr	A	TYH	51	14	8	16	31.4
		199	28	5	3	6	21.4
	B~C	TYH	37	10	1	1	2.7
		199	6		1	2	33.3
	D	TYH	51	36		2	3.9
		199	47	23		5	10.6

\* GV: Germinal vesicle, M I ~ T I : Metaphase I ~ Telophase I, M II : Metaphase II,  
Deg. : Degeneration.

\*\* Exp. : Oocytes with expanded cumulus cells, A: Oocytes with thick and tight cumulus cells, B~C: Oocytes with poor cumulus cells compared A, D: Oocytes without cumulus cells, S: Small oocytes.

## 考 察

今回の実験の結果、繁殖期ミンク卵巢の直径0.5mm以上の卵胞を穿刺することにより、PMS G処理していない場合で3.8～7.8個の卵胞から50%程度にあたる2.0～4.3個の卵母細胞が回収できた。本実験で得られた回収卵母細胞数は、ミンクグラーフ卵胞の平均直径が1.0～1.1mm<sup>13)</sup>、交尾季節中には概ね8日周期で4個以上ずつの卵胞が成熟し<sup>2)</sup>、1～12個の卵が排卵されること<sup>10)</sup>および卵胞穿刺の卵母細胞回収率が60%前後であること<sup>7,10)</sup>を考えるとやや少なめであった。これは、実験の実施が繁殖季節のごく早い時期であったことが関係したかもしれない。また、PMS G処理した場合の穿刺可能な卵胞数は13.5～18.0個で、PMS G処理により増加が認められた。このことから、ミンクの卵胞発育促進にもPMS Gが有効なことが示唆された。

卵胞穿刺で回収した卵母細胞は、交配後1日を除けば60～80%が卵丘細胞が厚く緊密に付着したA

型であった。交配後1日は膨潤化型の卵母細胞だけが回収され、排卵が交配後48時間（範囲28～72時間）に起こることから<sup>1, 5, 9)</sup>、排卵前のグラーフ卵胞から採取されたと推測された。

卵胞を穿刺した卵巣をカミソリで細切り、300 μmのメッシュで濾過した場合には、一卵巣当たり10.5～42.7個と卵胞穿刺より多い卵母細胞が回収できた。回収卵母細胞がもっと多かったのはPMSG処理・交配後2日であったが、PMSG処理に反応するのは卵巣表面の卵胞であり、その卵胞はすでに穿刺してあるので、潜在卵母細胞の回収はPMSG投与の影響を受けないものと考えられた。

卵巣細切では全体的にみて卵丘細胞がまったく付着していないD型のものが30%程度、形態的に異常なものが40%程度回収された。形態的に異常な卵母細胞も大半がD型であり、分離の際の機械的ダメージにより変形したものが多いと考えられる。カミソリによる細切や酵素処理により卵巣から潜在卵母細胞を分離した場合には卵丘細胞を持たない卵母細胞が多く回収されることはすでに報告されており<sup>4, 6, 8, 12)</sup>、本実験の結果と一致した。卵丘細胞を持たない卵母細胞は容易に退行過程に入ることから<sup>3, 11)</sup>、成熟培養の供試卵としては不適であると思われた。

回収直後の膨潤化卵母細胞は大半の卵がすでに卵核胞が崩壊して減数分裂を再開していたが、まだ中期I～終期Iの段階で中期IIには移行していなかった。中期I～終期Iから中期IIへの移行は、6時間の培養では達成されなかった。一方、緊密に卵丘細胞が付着した卵母細胞と卵丘細胞がまったく付着していない卵母細胞は、閉鎖しかかった卵胞から採取されたと思われる退行卵を除外すれば、すべて卵核胞期であった。交尾排卵動物のミンクは交配後平均48時間で排卵するので<sup>1, 5, 9)</sup>、これらの卵母細胞を48時間培養したところ、中期IIに移行した卵を得ることができた。このことから、ミンク卵母細胞の体外における中期IIへの移行速度は、体内とほぼ一致することが推測された。

A型卵母細胞の培養48時間での成熟率は、T Y Hで31.4%、TCM 199で21.4%と比較的低率であった。しかし、中期I～終期Iを示す卵母細胞がかなりあることから、培養時間を延長すれば成熟率の向上が期待できるよう思われた。卵丘細胞を持たないD型卵母細胞は、本実験においてもT Y Hで3.9%、TCM 199で10.6%が成熟したにすぎず、成熟能が劣っていた<sup>3, 11)</sup>。

これらのことから、繁殖季節のミンク卵巣から回収した卵丘細胞が厚く緊密に付着した卵母細胞はT Y HもしくはTCM 199で48時間培養することにより、20～30%程度成熟することが判明した。

本実験を実施するにあたり、ご協力を賜った北村ミンク飼育場・北村正美氏に謝意を表する。

## 文 献

- 1) Adams, C. E. (1981): Observations on the induction of ovulation and expulsion of uterine eggs in the mink, *Mustela vison*. J. Reprod. Fert., 63, 241-248.
- 2) Enders, R. K. (1952): Reproduction in the mink (*Mustela vison*). Proc. Am. Philos. Soc., 96, 691-755.

- 3) Fukui, Y. and Sakuma, Y.(1980): Maturation of bovine oocytes cultured in vitro: Relation to ovarian activity, follicular size and presence or absence of cumulus cells. Biol. Reprod., 22, 669—673.
- 4) Fukunari,A.,Sasabe,M.,Maeda,T, Terada,T. and Tsutsumi,Y.(1989):A mechanical and enzymatic approach to recovery of ovarian follicular oocytes in rabbits. Jpn. J. Anim. Reprod., 35, 26—33.
- 5) Hansson, A.(1947): The physiology of reproduction in the mink (*Mustera vison*, Schreb.) with special reference to delayed implantation. Acta zool. (Stockh.), 28, 1—136.
- 6) Iwasaki,S.,Kono,T.,Nakahara,T.,Shioya,Y.,Fukushima,M. and Hanada,A. (1987): New methods for the recovery of oocytes from bovine ovarian tissue in relation to *in vitro* maturation and fertilization.Jpn.J.Anim. Reprod.,33,188—192.
- 7) 亀山祐一, 石島芳郎 (1989):屠場ブタ卵巣から採取した卵胞卵の体外成熟. 日不妊会誌, 34, 751—756.
- 8) 亀山祐一, 川崎しのぶ, 石島芳郎 (1990):と畜場廃棄卵巣からの卵母細胞の回収. 東獣畜誌, 36 (3,4), 7—10.
- 9) Nosova, N. G.(1977): Ovulation and the development of corpora lutea in female mink. Nauchni Trud. nauchno—izsled. Inst. Pushn. Zverovod. Krolikovod., 15, 21—32.
- 10) 菅原七郎編 (1986):図説哺乳動物の発生工学実験法, 学会出版センター, 東京.
- 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—18.
- 12) 佐藤英明, 宮本庸平 (1988):マウス卵母細胞の体外培養, とくに卵母細胞の減数分裂再開始能力について. 実験動物, 37, 231—238.
- 13) Sundqvist,C.,Amador,A.G. and Bartke, A.(1989): Reproduction and fertility in the mink (*Mustela vison*). J. Reprod. Fert., 85, 413—441.

## 電気的融合法による異属間（マウス・ラット）の前核と 細胞質の融合ならびに前核置換卵の卵割について

Cleavage of Intergenetically-Reconstituted Eggs by Electrofusion of  
Nucleus and Cytoplasm and Exchange of Pronucleus from Mouse and Rat  
Eggs.

辻井 弘忠 • 寺社下 浩一<sup>1)</sup>  
Hirotada TSUJII and Kouichi JISHAGE<sup>1)</sup>

信州大学農学部 生物資源開発学教室  
現所属 中外製薬株式会社 研究開発本部<sup>1)</sup>

Department of Bioscience and Biotechnology Fac. Agric., Shinshu Univ.  
Kamiina, Nagano, 399-45  
Chugai Pharmaceutical Co. Ltd., Senior Resercher, Tokyo<sup>1)</sup>

**Abstract:** Embryonic reconstitution and subsequent cleavage of the reconstituted eggs were studied by interspecific fusion of mouse and rat pronucleus and cytoplasm. After the fusion of pronucleus or cytoplasm from rat egg to mouse egg with or without pronucleus, reconstitution was carried out in the following four combinations by electrofusion.

(1) Mouse egg with rat pronuclei. (2) Mouse egg with a small volume of rat cytoplasm. (3) Enucleated rat egg with mouse pronuclei. (4) Enucleated mouse egg with rat pronuclei. By any combination, reconstituted eggs could be produced in approximately 80%. The rates of cleavage of the reconstituted eggs into the two-cell stage in vitro were 68.7% for group (1), 87.5% for group (2), 43.4% for group (3) and 63.3% for group (4). These rates were significantly low compared with those obtained in controls. The rates of cleavage into the four-cell stage in vitro were 6.1% for group (1), 14.3% for group (2), 18.9% for group (3) and 3.3% for group (4), respectively. These were again significantly lower than those in controls. These results indicated that even the reconstituted embryos produced between different species such as mouse and rat, have the ability to cleave and develop in vitro.

**KEY WORDS:** Electric fusion, Reconstituted egg. Mouse, Rat.

(受付 1991年10月15日. 受理 1992年2月1日)

## 序論

ラットとマウスの初期卵子を用いた異属間キメラ胚の作成が既に報告されている<sup>1)</sup>。

異属動物細胞間の核と細胞質の融合に関しては、体外で継続して培養した体細胞を用いた実験があり、マウスfibroblastの核とラットhepatoma細胞質との融合例が報告されている<sup>2)</sup>。しかしながら、哺乳類の初期卵子を用いたこのような融合例は、報告されていない。

哺乳卵子における核移植技術は、McGRATH and SOLTER<sup>3)</sup>によって1983年にマウスで確実な方法が報告されて以来、種々の型の核移植に関する研究が、マウス<sup>3-7)</sup>、ラット<sup>8,9)</sup>、縊羊<sup>10)</sup>、牛<sup>11)</sup>、ウサギ<sup>12,13)</sup>で報告されている。

そこで、本実験では新しい実験動物作出を最終目標として基礎的知見を得る目的で、属の異なるマウスとラットの前核期卵を用いて①マウス卵にラット卵の前核または細胞質を融合および②雌雄前核置換によりラットあるいはマウス卵細胞質にマウスあるいはラットの前核を有する再構築卵をそれぞれ作出した。ついで、これらの再構築卵の *in vitro*での初期分割について観察をした。

## 材料および方法

供試動物は、ICR系マウスとWistar系ラットを用いた。マウスおよびラットは、腫瘍像が発情前期像を示した日に雄と一晩同居させ交配した。翌日腫瘍の有無を検査し妊娠1日目とした。

1細胞期卵の採卵は、妊娠1日目の午後1時に行った。卵丘細胞は、ヒアルロニダーゼ(150u/ml, Sigma製)を含むHanks液<sup>14)</sup>で除去した。卵丘細胞除去後3回Hanks液で洗浄し、流動パラフィン下のPBS中に卵子を移した。

雌雄前核および細胞質の融合は、TSUNODA et al.<sup>7,15)</sup>の前核置換法によった。すなわち、①1細胞期卵の前核または細胞質を除去する卵をサイトカラシンB(5 μg/ml, Sigma製)とコルセミド(0.1 μg/ml, Gibco製)を含むダルベコーのPBS中で15分間5%CO<sub>2</sub> 95%air 37°C下で前培養した。②マウスまたはラット1細胞期卵を一方のマイクロマニプレーターに接続したホールディングピペットで保定後、透明帯をもう一方のマイクロマニプレーターに接続したガラス針で切開した。他方のマイクロマニプレーターに接続した除核用ピペットで少量の細胞質を含む雌雄前核または前核を含まない細胞質を吸引除去した。なお、細胞質の吸引除去量は雌雄前核除去とはほぼ同じとした。③上述の吸引除去したドナーの前核または細胞質を Phytohemagglutinin (PHA 0.5 μl/ml, Difco製)を含むダルベコーのPBSドロップ中でレシピエント卵の透明帯の切開した穴に除核用ピペットを挿入して、ドナー前核または細胞質をレシピエント卵細胞膜に接合させた。④電気的融合を行うために前核または細胞質と卵細胞質との接合面が電極と平行になるように毛細ガラスピペットを用いて配置し、1.3kv/cm, 150 μsecの直流パルスを2秒間隔で2回通電した。

通電後1時間目で融合の有無を確認後、融合のみられた卵は、M16<sup>16)</sup>+100 μM EDTA<sup>17)</sup>(エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水塩、半井化学製)培養液を用い、流動パラフィン下中で72時間培養した(5%CO<sub>2</sub>, 95%空気)。卵子の発生状況の検査ならびに培養液の交換は、24時間毎に行っ

た。融合卵の核数は、分割後の融合卵をホールマウント法<sup>18)</sup>により固定、1%アセトオルセイン染色<sup>19)</sup>後検鏡して調べた。

再構築卵は、以下の4つの組み合わせで作成した。

- ① マウス1細胞期卵ヘラット雌雄前核を融合。
- ② マウス1細胞期卵ヘラット1細胞期卵細胞質を融合。
- ③ 除核ラット卵ヘマウス雌雄前核を融合。
- ④ 除核マウス卵ヘラット雌雄前核を融合。

これら異属間の融合卵の対照区として、マウスまたはラット卵にそれぞれ同種の雌雄前核または細胞質を融合した再構築卵を用いた。

統計処理は、 $\chi^2$ 検定によって行った。

## 結 果

表1に、マウス卵にラットおよびマウス卵の前核あるいは細胞質を融合した際の融合率と融合卵の分割率を示した。融合率は90%前後で各群間において有意差は無かった。

2細胞期への分割率は、マウス卵にマウスおよびラット細胞質を融合した場合91.3%および87.5%であったのに対し、マウス卵にマウスの前核あるいはラットの前核を融合した場合は66.7%および68.2%と有意に低かった。

4細胞期への分割率は、マウス卵にマウスの前核または細胞質を融合した場合に比べ、ラットの前核あるいは細胞質を融合した場合は、それぞれ6.1%および14.3%と有意に低かった。

表2にマウスとラットの前核を置換して融合させた卵の融合率、ならびに分割率を示した。融合率は80%前後と各群間において有意差はなかった。

2細胞期への分割率は、除核ラット卵ヘマウス前核を融合した場合43.4%と対照区のマウス同士(70.8%)、ラット同士(76.9%)での前核置換および除核マウス卵ヘラットの前核を融合した場合(6.3%)より有意に低かった。

4細胞期への分割率は、マウス同士で置換した卵で62.5%、除核ラット胚ヘマウスの雌雄前核を融合した場合で18.9%、除核マウス卵ヘラットの前核を融合した場合で3.3%と、それぞれの分割率に有意差が見られた。

ラット同士の雌雄前核を置換した再構築卵は、4細胞期へは分割しなかった。また、除核ラット卵ヘマウスの雌雄前核を融合した卵と除核マウス卵ヘラットの雌雄前核を融合した卵とを比較すると、2細胞期までの分割率は後者(63.3%)の方が、前者(43.3%)より有意に高かったが、4細胞期への分割率は逆に前者の方が18.9%と後者(3.3%)に比べ有意に高かった。

図1は、除核ラット卵ヘマウスの雌雄前核を置換し、融合直後の写真である。写真の右側に融合したマウスの前核がみられる。

図2は、マウス1細胞期卵ヘラットの雌雄前核を融合した卵の4細胞期の写真である。外見上正常なマウス胚と差がみられなかった。このように他の融合胚も同様に外見上正常な胚と差がなかった。

また、分割後核を染色、観察した結果、4つの組み合わせのいずれの場合も1個の細胞に1個の核が存在していた。

Table 1. In vitro development of mouse eggs after fusion of pronuclei or cytoplasm from rat eggs.

Donor	No. of eggs with fused karyoplast or cytoplasm/operated ( % )	No. of eggs developed to ( % )	
		2cell	4cell
<u>Pronuclei</u>			
Mouse	21 / 24 (87.5)	14 (66.7)a	8 (38.1)a
Rat	66 / 77 (85.7)	45 (68.2)a	4 ( 6.1)b
<u>Cytoplasm*</u>			
Mouse	23 / 25 (92.0)	21 (91.3)b	14 (60.9)a
Rat	56 / 61 (91.8)	49 (87.5)b	8 (14.3)b

\* 1-cell stage eggs.

a,b ; Difference was significant ( $P < 0.05$ ) .

Table 2. In vitro development of pronuclei-exchanged eggs between mice and rats.

Karyoplasic donor	Cytoplastic recipient	No. of eggs with fused karyoplast/ operated ( % )	No. of eggs developed to ( % )	
			2cell	4cell
Mouse	Mouse	24 / 29 (82.8)	17 (70.8)a	15 (62.5)a
Rat	Rat	26 / 32 (81.3)	20 (76.9)a	0 ( 0 )d
Mouse	Rat	53 / 70 (75.7)	23 (43.4)b	10 (18.9)b
Rat	Mouse	60 / 78 (76.9)	38 (63.3)a	2 ( 3.3)c

a,b,c,d ; Difference was significant ( $P < 0.05$ ) .

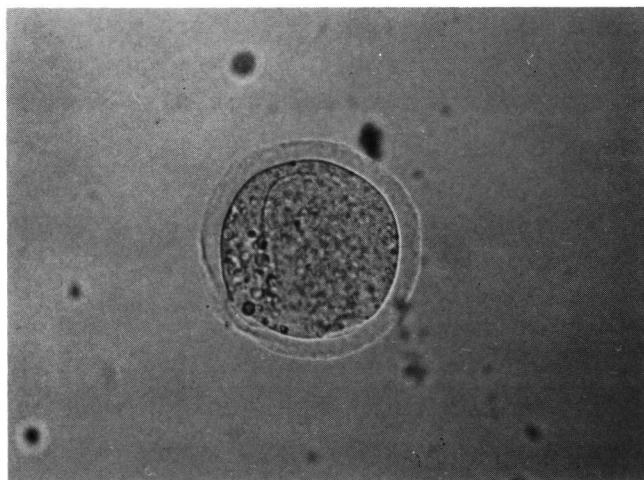


Fig.1. One hour after electric stimulus. The fusion of mouse karyoplast to the enucleated rat eggs is completed (Exp.3).

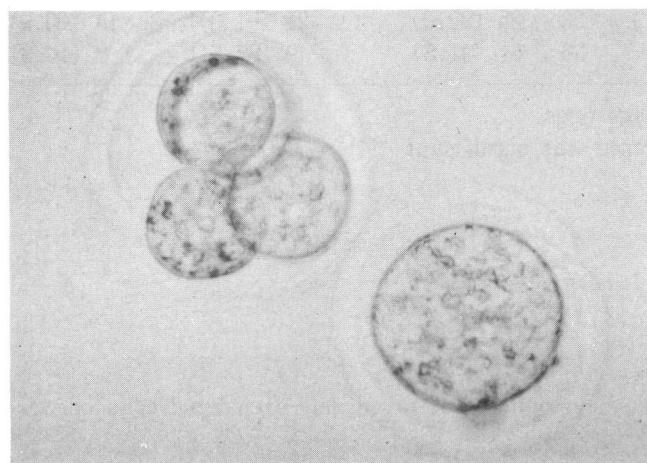


Fig.2. Reconstituted(Exp.2) 4-cell stage egg cultured for 2 days after electrofusion and 1-cell stage embryo did not develop during the whole culture period.

#### 考 察

本実験での再構築卵の作成は、同種間における前核置換技術<sup>3,6,15)</sup>を利用して行った。すなわち、サイトカラシンBおよびコルセミドで供試卵を前培養することによって卵細胞膜を破ることなく少量の細胞質を含む前核または細胞質を吸引し、目的とする卵に融合する方法である。この方法により異属間でも前核置換が可能であることが明かとなった。そして、本実験における融合率は、対照の同種間での融合

率、電気的融合法を使った TSUNODA et al.<sup>7)</sup>のマウスでの前核置換実験の融合率 78%、またラットでの前核置換実験での KONO et al.<sup>9)</sup>の融合率 81%、舟橋と丹羽<sup>8)</sup>の融合率 84%などと比較して遜色はなかった。

マウス卵にマウスの前核を融合させた卵は、結果的に4倍体になるが、マウス2細胞期の割球を融合して作成した4倍体の卵子<sup>20,21)</sup>と同様に卵割することが判明した。マウス卵にマウス卵細胞質を融合した卵の4細胞期への分割率は、60.9%と高く卵の体積が細胞質の融合により多少増加しても卵割には殆ど影響が無いと思われた。マウス卵同士の前核置換で作成した再構築卵の4細胞期への分割率は 62.5%であった。この成績は TSUNODA et al.<sup>7)</sup>の行った電気的融合法を用いた前核置換実験での桑実胚または胚盤胞期への分割率 67%の成績と比較して差がなく、本実験の前核置換技術に問題はなかったことが示唆された。

本実験で作成した4つの組み合わせの融合卵とも2細胞期への分割率が、43.4~91.3%と比較的高かったが、4細胞期への分割率は、0~62.5%と低かった。この原因の一つとして、ラット卵同士の前核置換卵は、4細胞期以上に発育せず、ラットの2cellおよび4cell block<sup>22)</sup>と大きく関係していると思われた。また、マウス1細胞期へラットの雌雄前核を融合した場合、マウスとラット初期卵子の発生速度が異なる<sup>11)</sup>ことが卵分割に影響していると思われた。除核ラット卵へマウスの雌雄前核を融合した卵と除核マウス卵へラットの雌雄前核を融合した卵との分割率を比較すると、2細胞期への分割率は後者の方が有意に高かったが、4細胞期への分割率は逆に前者の方が有意に高くなった。このことも、ラットの2cellおよび4cell block<sup>22)</sup>と大きく関係していると思われた。また、ラット前核を置換した融合卵が4細胞期に分割しないのに対し、除核ラット卵へマウスの雌雄前核を移植した卵と除核マウス卵へラットの雌雄前核を移植した卵との融合卵が4細胞期に分割することは、高率に4細胞期へ分割するマウス卵由来の前核または細胞質により、何らかの活性化がおこり分割したのではないかと考えられ、今後の研究課題であると思われた。

辻井・寺社下<sup>23)</sup>は、1または2細胞期胚を用いてマウスとラット異属間割球融合卵を作成したが、1細胞期同士で融合させた卵は2細胞期までしか分割が観察されなかった。しかしながら、本実験における融合卵の分割は、マウスとラットの前核と細胞質両方とも同じ割合で存在しないためか4細胞期に分割した。

体外で継続して培養した体細胞を用いたマウス fibroblast の核とラット hepatoma 細胞質で再構築した細胞<sup>2)</sup>での実験では、その特徴づけとしての研究も行われ、レシピエントとしての細胞質の特徴から核由来の特徴になっていたことが確認されている。しかしながら、本実験においては、融合卵の分割率が低いこともありこの特徴は調べることができなかつた。

初期発生時には、マウスとラット異属間キメラ卵子でみられる分割における細胞間の許容性があることが報告されている<sup>1)</sup>が、本実験結果より分割における異属間の核と細胞質との許容性がある程度は存在し体細胞で再構築した雑種細胞と同様に、異属間の核と細胞質を融合した卵は分割することがみいだされた。

文 献

- 1) Zeilmaker, G.H., (1973) : Fusion of Rat and Mouse Morulae and Formation of Chimaeric Blastocysts. *Nature*, 242, 115-116.
- 2) Lipsich, L.A., Kates, J.R. and Lucas, J.J., (1979) : Expression of liverspecific function by mouse fibroblast nulei transplanted into rat hepatoma cytoplasts. *Nature*, 281, 74-76.
- 3) McGrath, J. and Solter, D., (1983) : Nuclear Transplantation in the Mouse Embryo by Microsurgery and Cell Fusion. *Science*, 220, 1300-1302.
- 4) 中村公章・角田幸生, (1987) : 前核置換技術を用いた「in vitro 2-cell block」の検討. *家畜繁殖誌*, 33, 15-18.
- 5) 角田幸生・安井司・徳永智之・内田驍・杉江信, (1985) : マウス前核の置換と置換卵の移植による産子の生産, *家畜繁殖誌*, 31, 130-134.
- 6) Tsunoda, Y., Yasui, T., Shinoda, Y., Nakamura, K., Uchida, T. and Sugie, T., (1987) : Full-Term Development of Mouse Blastomere Nuclei Transplanted into Enucleated Two-Cell Embryos. *J. Exp. Zool.*, 242, 147-151.
- 7) Tunoda, Y., Kato, Y. and Shioda, Y., (1987) : Electrofusion for the Pronuclear Transplantation of Mouse Eggs. *Gamete Research*, 17, 15-20.
- 8) 舟橋弘晃・丹羽皓二, (1988) : 電気的融合法によるラット1細胞期卵の前核置換と置換卵の発生能. *家畜繁殖誌*, 34, 133-137.
- 9) Kono, T., Shioda, Y. and Tsunoda, Y., (1988) : Nuclear Transplantation of Rat Embryos. *J. Exp. Zool.*, 248, 303-305.
- 10) Willadsen, S.M., (1986) : Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, 320, 63-65.
- 11) Prather R.S, Barnes F.L, Sims M.M, Robl J.M, Eyestone W.H, and First N.L, (1987) : Nuclear transplantation in the bovine embryo; assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.*, 37, 859-866.
- 12) Stice, S.L. and Robl, J.M., (1988) : Nuclear Reprogramming in Nuclear Transplant Rabbit Embryos. *Biol. Reprod.*, 39, 657-664.
- 13) 角田幸雄・圓山悠子・北満夫・牛島仁・河野友宏・徳永智之・今井裕, (1989) : ウサギにおける除核未受精卵への8~16細胞期胚の核移植. *日畜会報*, 60, 846-851.
- 14) 館鄰・横山峯介・館澄江, (1981) : 哺乳動物の初期発生, (妹尾左知丸・加藤淑裕・入谷明・鈴木秋悦・館鄰編), 361, 理工学社, 東京.
- 15) Tsunoda, Y., Yasui, T., Nakamura, K., Uchida, T. and Sugie, T., (1986) : Effect of Cutting the Zona Pellucida on the Pronuclear Transplantation in the Mouse. *J. Exp. Zool.*, 240, 119-125.
- 16) Whittingham, DG., (1971) : Culture of mouse ova. *J. Reprod. Fert. (Suppl)*, 14, 7-21.

- 17) 星雅樹・豊田裕, (1985): 体外受精に由来するマウス胚の発生におよぼすEDTAの効果. 日畜会報, 56, 931-937.
- 18) 菅原七郎, (1986) : 図説哺乳動物の発生工学実験法, (菅原七郎編) 147-150, 学会出版センター, 東京.
- 19) 菅原七郎, (1986) : 図説哺乳動物の発生工学実験法, (菅原七郎編) 299. 学会出版センター, 東京.
- 20) 加藤泰之・角田幸生, (1987) : 電気刺激によるマウス2細胞期胚の割球融合. 家畜繁殖誌, 33, 19-26.
- 21) 辻井弘忠・寺社下浩一, (1989) : マウス2細胞期胚の電気的融合について. 受精着床学会誌, 6, 48-51.
- 22) Whittingham,D.G.,(1975): Fertilization, early development and storage of mammalian ova in vitro. In The Early Development of Mammal (Balls, M and Wild, A.E. eds) p1-24, Cambridge university Press, Cambridge.
- 23) 辻井弘忠・寺社下浩一, (1989) : 電気刺激によるマウス・ラット初期胚の異種間割球融合について. 受精着床学会誌, 6, 52-55.

In vitro development of bovine oocytes collected from ovaries in  
every month through the year after in vitro fertilization

Takeshige OTOI, Susumu TACHIKAWA, Shoji KONDO, Tatsuyuki SUZUKI<sup>1)</sup>

Tokushima Prefectural Beef Cattle and Swine Experiment Station,  
Anan, Tokushima 774 and United Graduate School of Veterinary  
Sciences, <sup>1)</sup> Yamaguchi University, Yamaguchi 753, Japan

**Abstract:** This experiment was conducted to analyse variations of in vitro development of bovine oocytes collected in every month from December, 1990 through November, 1991 after in vitro fertilization. Cleavage rates of embryos derived from oocytes in January and December were significantly lower ( $p<0.05$ ) than that of embryos derived from oocytes in another month exclusive of April. The rates of blastocyst formation of embryos derived from oocytes in January were significantly lower ( $p<0.05$ ) than that of embryos derived from oocytes in another month exclusive of April, June and August. However, the rates of blastocyst formation of embryos derived from oocytes in December and February were more than the average per year. These results indicate that the developmental capacity of embryos was not affected by the season.

**KEY WORDS:** bovine oocyte, in vitro development, month

(Received 20 December 1991, Accepted 5 February 1992)

### Introduction

The developmental capacity of bovine oocytes after in vitro fertilization are influenced by factors such as the degree of cumulus cells attached to oocytes<sup>6,11,12)</sup>, the time of in vitro maturation of oocytes<sup>8)</sup>, and the size of follicle containing oocytes<sup>9)</sup>. Kato<sup>9)</sup> reported that the in vitro fertilization rates and developmental capacity of bovine oocytes were affected by the season. However, thier result was obtained by using rabbit oviducts for development of embryos after in vitro fertilization, implying the existence of two factors of bovine ovaries and rabbit oviducts. Therefore, this study was conducted to ascertain whether developmental capacity of bovine embryos derived from in vitro maturation, fertilization and culture were affected by the season.

### Materials and Methods

The ovaries were obtained from Holstain cows and heifers at a local slaughter house between 5th and 25th of every month (from December, 1990 to November, 1991). The ovaries were brought to the laboratory being kept in physiological saline (0.85% (W/V) NaCl) at 25–30°C within 1h. Oocytes were aspirated from follicles 1–7mm in diameter and the follicular contents were mixed with modified Dulbecco's phosphate buffered saline (mPBS) (Embryotek; Nippon Zenyaku Co., Koriyama, Japan). After collection, oocytes were washed twice with mPBS and once with the maturation medium (25mM–Hepes TCM–199 with Eargle's salts; Gibco, NY, U.S.A.) supplemented with 5% fetal calf serum, 1 ug/ml estradiol 17- $\beta$  (Sigma, St.Louis, U.S.A) and 0.01 A/ml FSH (Denka, Kawasaki, Japan). Thereafter the oocytes surrounded with cumulus cells were placed into the maturation medium, and cultured for 21–22h at 38.5°C in 5% CO<sub>2</sub> in air.

Frozen semen from a single bull were used throughout the experiment. Two straws of the frozen semen were thawed in a water–bath at 37°C for 1 min in each experiment. These semen were washed twice with BO medium<sup>2)</sup> without bovine serum albumin, and supplemented with 5mM–caffeine by centrifugation, at 500xg for a period of 5 min. The sperm pellet was resuspended in BO medium containing bovine serum albumin (5mg/ml, Sigma) and 2.5mM caffeine to give a sperm concentration of  $1 \times 10^7$  /ml. A 100ul aliquot of the sperm suspension was incubated for 1h at 38.5°C in 5% CO<sub>2</sub> in air prior to insemination.

Insemination and subsequent culture were similar to the report of Kajihara<sup>8)</sup>. Cumulus cell–oocytes cultured for 21–22h were transferred into the each sperm microdroplets for insemination. After incubation of sperm and oocyte for 5h, the each oocyte was transferred to culture medium (25mM Hepes TCM–199 supplemented with 1% fetal calf serum and 5  $\mu$ g/ml insulin (Sigma)) and cultured for up to 12 days after insemination at 38.5°C in 5% CO<sub>2</sub> in air. The culture medium was replaced with new medium at 48h after insemination. Then the cumulus cells surrounding the embryos were removed by pipetting but cumulus cell layer attached to the bottom of the culture dish was not removed. All of the culture media used were supplemented with antibiotics (100IU Penicillin/ml + 100  $\mu$ g streptomycin/ml). The oocytes were examined under the microscope every 24h after insemination.

The data were analyzed with the  $\chi^2$ -test. A probability (P) of 0.05 was considered significant .

## Results

A total of 4923 cumulus-oocyte complexes were collected from 884 ovaries through the year. Rates of embryonic development are shown in Table 1. When oocytes were collected from ovaries in January and December, the cleavage rates of embryos derived from these oocytes were significantly lower ( $p<0.05$ ) than that of embryos derived from oocytes in another month exclusive of April. The rates of blastocyst formation of embryos derived from oocytes in January were significantly lower ( $p<0.05$ ) than that of embryos derived from oocytes in another month exclusive of April, June and August. However, the rates of blastocyst formation of embryos derived from oocytes in December and February were more than the average per year. While, the number of blastocyst formation per a ovary in every month tended to decline in January, April and August (Figure 1).

Table. 1 In vitro development of bovine oocytes fertilized in vitro with the same lot of frozen sperm

Month of oocyte collection	No. of trials	No. of oocytes	% and (No.) of embryos developed to 2 to 8 cells <sup>1)</sup>	% and (No.) of embryos developed to Blastocyst <sup>2)</sup>
1	2	301	60.5 (182) <sup>a1</sup>	14.3 (43) <sup>a</sup>
2	4	683	70.4 (481) <sup>bhj</sup>	25.6 (175) <sup>b</sup>
3	6	704	72.6 (511) <sup>bck</sup>	21.7 (153) <sup>bc</sup>
4	2	365	62.2 (227) <sup>adlmn</sup>	16.7 (61) <sup>acd</sup>
5	4	329	69.3 (228) <sup>be</sup>	21.6 (71) <sup>bde</sup>
6	3	434	74.0 (321) <sup>bf</sup>	19.8 (86) <sup>acef</sup>
7	4	520	75.8 (394) <sup>cfg</sup>	23.3 (121) <sup>bdfg</sup>
8	2	159	77.4 (123) <sup>bds</sup>	17.0 (27) <sup>acegh</sup>
9	2	265	65.7 (174) <sup>ehn</sup>	22.3 (59) <sup>bdfh</sup>
10	3	416	67.8 (282) <sup>ejk1</sup>	26.0 (108) <sup>b</sup>
11	3	243	75.7 (184) <sup>bg</sup>	23.9 (58) <sup>bfh</sup>
12	3	504	58.3 (294) <sup>im</sup>	21.8 (110) <sup>bdfh</sup>
overall	38	4923	69.1 (1522)	21.8 (1072)

<sup>1)</sup> 48h after insemination    <sup>2)</sup> 12 days after insemination

<sup>a-h</sup> Values with different superscripts are significantly different ( $p<0.05$ ).

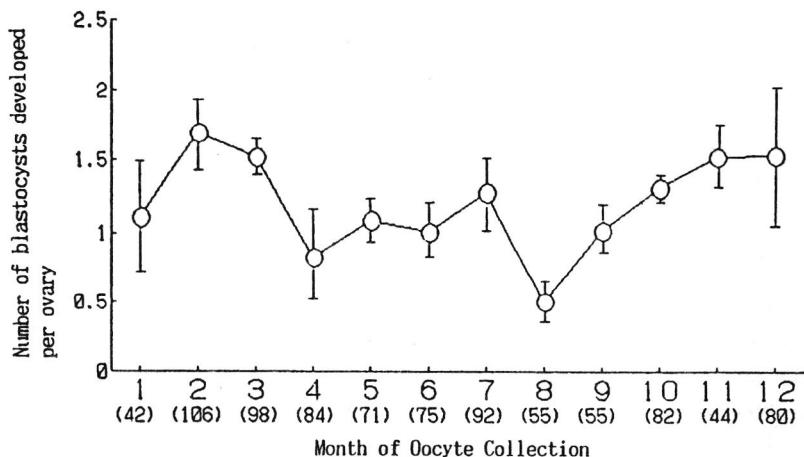


Figure 1. Changes in the number of blastocysts developed from oocytes, collected from ovaries, matured, fertilized and cultured in vitro.

○: Mean ± SE, No. of ovaries in parenthesis.

### Discussion

We used the frozen sperm of the same lot from a single bull through the year, since fertilization rates were varied by individual bulls<sup>1,5,7)</sup> and different lots of the same bull<sup>10)</sup>. Kato<sup>9)</sup> reported that cleavage rates of embryos derived from oocytes in January and February at 48h after insemination tended to decline. And he described that the rates of blastocyst formation of embryos derived from oocytes between December and February, after collecting embryos from rabbit oviducts, tended to decline in comparison with another month. In this study without rabbit oviducts, cleavage rates of embryos derived from oocytes in January and December showed decline. And the rates of blastocyst formation of embryos derived from oocytes in January showed decline. But that of embryos derived from oocytes in December and February were more than the average per year. These results indicated that the developmental capacity of embryos was not affected by the season on the in vitro maturation, fertilization and culture. While, on the change of number of blastocyst formation per a ovary, the number of that showed decline in January, April and August. Goto<sup>4)</sup> reported that oocytes from individual cows had different ability of development in vitro. In the present experiment, the ovaries were collected from cows and heifers of Holstain. Therefore, this observation might indicate that the factors other than season, such as breed of slaughtered cows and heifers, affect developmental capacity of collected oocytes. Further research is necessary to analyse variation of developmental capacity of oocytes collected in every month.

References

- 1) Brackett, B. G., Bousquet, D., Boice, M. L., Donawick, W. J., Evans, J.F. and Dressel, M. A. (1982): Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol. Reprod.*, 27, 147-158.
- 2) Brackett, B. G. and Oliphant, G. (1975): Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.*, 12, 260-274.
- 3) Fukui, Y. and Sakuma, Y. (1980): Maturation of bovine oocytes cultured in vitro: Relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells. *Biol. Reprod.*, 22, 669-673.
- 4) Goto, K., Takuma, Y., Ooe, N. and Ogawa, K. (1990): In vitro development of bovine oocytes collected from ovaries of individual cows after in vitro fertilization. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 36, 110-113. (in Japanese).
- 5) Hanada, A. (1985): In vitro fertilization in cattle with particular reference to sperm capacitation by ionophore A 23187. *Jph. J. Anim. Reprod.*, 31, 56-61. (in Japanese).
- 6) Hunter, R. H. F., Lawson, R. A. S. and Rowson, L. E. A. (1972): Maturation, transplantation and fertilization of ovarian oocytes in cattle. *J. Reprod. Fert.*, 30, 325-328.
- 7) Iritani, A., Utsumi, K., Miyake, M. and Yamaguchi, Y. (1986): Individual variation in the in vitro fertilizing ability of bull spermatozoa. *Devel. Growth Differ.*, Suppl. 28, 45, abstr 35.
- 8) Kajihara, Y., Goto, K., Kosaka, S., Nakanishi, Y. and Ogawa, K. (1987): In vitro fertilization of bovine follicular oocytes and their development up to hatched blastocysts in vitro. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 33, 173-180. (in Japanese).
- 9) Kato, H., Hosoi, Y., Miyake, M., Utsumi, K. and Iritani, A. (1989): Difference of in vitro maturation, fertilization and developmental capacity of bovine follicular oocytes by season. *J. Fertil. Implant.*, (Tokyo) 7th, abstr 81. (in Japanese).
- 10) Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., Leibfried-Rutledge, M. L., Critser, E. S., Eyestone, W. H. and First, N. L. (1986): Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 25, 591-600.
- 11) Shioya, Y., Kuwayama, M., Fukushima, M., Iwasaki, S. and Hanada, A. (1988): In vitro fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured in vitro. *Theriogenology* 30, 489-496.
- 12) Trounson, A. O., Willadsen, S. M. and Rowson, L. E. A. (1977): Fertilization and development capability of bovine follicular oocytes matured in vitro and in vivo and transferred to the rabbit oviducts and cows. *J. Reprod. Fert.*, 30, 325-328.

月別にみた牛卵胞卵子の体外受精後の発育能

音井威重, 立川進, 近藤正治, 鈴木達行<sup>1)</sup>

徳島県肉畜試験場, 山口大学大学院連合獣医学研究科<sup>1)</sup>

1990年12月から1991年11月までの各月別に採取した牛卵胞卵子について体外受精を行い, 胚の発育能について各月毎の変動を比較した。分割率は, 1月, 12月が4月を除く他の月に比べ有意に ( $P < 0.05$ ) 低下した。また, 胚盤胞発生率は, 1月が4月, 6月, 8月を除く他の月に比べ有意に ( $P < 0.05$ ) 低下したが, 2月と12月の胚盤胞発生率は年の平均値以上であった。これらのことから, 成績の変動は, 季節的影響と関連づけられなかった。

## 牛未成熟卵子のK99保有大腸菌への 曝露と洗浄による細菌除去

### —特に卵丘細胞の有無による洗浄効果の比較—

In vitro exposure of bovine immature oocytes to K99<sup>+</sup>Escherichia coli  
and elimination of exposed bacteria by washing

— especially comparison of washing effectiveness with or without cumulus cells —

音井威重・立川進・近藤正治・鈴木達行<sup>1)</sup>

Takeshige OTOI, Susumu TACHIKAWA, Shoji KONDO and Tatsuyuki SUZUKI<sup>1)</sup>

徳島県肉畜試験場

Tokushima Prefectural Beef Cattle and Swine Experiment Station,  
Anan, Tokushima 774

山口大学大学院連合獣医学研究科<sup>1)</sup>

United Graduate School of Veterinary Sciences, Yamaguchi University,  
Yamaguchi 753

**Abstract:** Immature bovine oocytes were exposed in vitro to K99<sup>+</sup>Escherichia coli (K99 E.coli) to determine if K99 E.coli would adhere to the cumulus cells — oocyte complexes or adhere to the cumulus cells — free oocytes. And standard procedures for washing and treating embryos were evaluated to determine their effectiveness for removing K99 E.coli. K99 E.coli was isolated from all groups of cumulus cells — oocyte complexes and 2 of 3 groups of cumulus cells — free oocytes after in vitro exposure and subsequent washing. According to increase in the number of repeated washing, a total number of K99 E.coli isolated from washing medium declined. However after the eighth time of washing, the number of K99 E.coli isolated from washing medium did not decline in the

groups of cumulus cells — oocytes complexes. These results indicated that standard procedures for washing were not effective for removing K99 E.coli adhered to immature oocytes and were not able to remove K99 E.coli adhered to the cumulus cells — oocyte complexes.

KEY WORDS: bovine immature oocyte, cumulus cell, exposure, K99 E.coli, wash

(受付1991年11月20日, 受理1992年3月5日)

### 緒 言

K99保有大腸菌（以下K99大腸菌）は、毒素原性大腸菌に分類され、わが国においては多数の子牛下痢症の発生を引き起こし、育成上甚大な経済的損失を与えている。本症は、主に生後4～5日齢の子牛に致死的な下痢症を引き起こし、さらに発生農家においては分娩産子が継次的に感染発症し、これが長期にわたることが報告されている<sup>6,8)</sup>。また、一部の地域では、34%の成牛がK99大腸菌に対する抗体を保有し、広く浸潤していることが指摘されている<sup>1)</sup>。一方、近年急速に進展している牛の体外受精技術は、生体由来の卵巣を利用するところから、体外受精胚を介した病原性細菌の伝播の可能性がある。屠場内で卵巣を採取するにあたり、卵巣が腸内容物に汚染される危険性が高いことから、通常、卵巣の輸送、または、採取卵子の培養時に抗生物質の添加、採取卵子の洗浄を行い、付着した細菌の除去が図られている。今回、我々は、子牛の下痢便から採取した毒素原性大腸菌を未成熟卵子（卵丘細胞付着卵子、裸化卵子）に曝露し、その卵丘細胞の有無による洗浄効果を比較したので報告する。

### 材料および方法

#### 1. 供試卵子

徳島市営屠畜場で得られたホルスタイン種の卵巣を、ペニシリン 100IU/ml, ストレプトマイシン 100 μg/ml（以下P S）含有の滅菌生理食塩水に浸し、25～30℃に保温して1時間の行程で実験室に運んだ。ただちに新しいP S含有の滅菌生理食塩水に卵巣を移し変えた後、滅菌した紙タオルで卵巣表面を拭き、少量のP S加修正リン酸緩衝液（modified phosphate buffered saline以下m P B S）を含む18G針付き注射器を用いて、直径5mm大以下の小卵胞から卵子を採取した。次いで、卵子をm P B Sで1度洗浄し、卵丘細胞が1/3以上付着しているものを選別し、一部は、ピッピング操作により卵丘細胞を除去して実験に供した。これらの卵子を10%子牛血清（以下C S）を含むゲンタマイシン（50 μg/ml）添加2.5 mM H e p e s B u f f e r e d T C M 199（以下T C M 199）で、Seidelら<sup>3)</sup>の方法に準じて10回洗浄した。すなわち、2mlのT C M 199の入った10枚の滅菌シャーレを準備し、滅菌ピペットを換えながら卵子を順次洗浄液に移した。洗浄後、新しい洗浄液T C M 199（2ml）内に移し、38.5℃, 5%CO<sub>2</sub>,

95%O<sub>2</sub>気相条件下で4時間培養した。培養後、抗生物質無添加の10%CS添加TCM199(2ml)内に卵子を移し、上記条件下で1~2時間培養を行い、これらの卵子を細菌曝露実験に用いた。

## 2. K99大腸菌浮遊液

使用した大腸菌は、子牛の下痢便由来のK99保有の大腸菌で、耐熱性毒素(ST)陽性、易熱性毒素(LT)陰性、Verotoxin陰性、運動性およびアドニット共に陰性であった。このK99大腸菌を使用時にトリプトソーヤ寒天培地で増菌し、抗生物質無添加の10%CS加TCM199内で10<sup>6</sup>~10<sup>8</sup> colony forming units(CFU)/mlに調整して用いた。

## 3. K99大腸菌への曝露

1群あたり24~32個の卵子を細菌浮遊液(2ml)に漬浸し、38.5℃, 5%CO<sub>2</sub>, 95%O<sub>2</sub>気相条件下で2~3時間曝露した。

## 4. 大腸菌曝露後の卵子の洗浄

細菌浮遊液内で曝露した卵子は、抗生物質無添加の8%CS添加TCM199(2ml)を含む10枚の滅菌シャーレ内で、滅菌ピッペットを交換し順次移し換えながら洗浄した。この場合、各洗浄液毎の移動する液量を約1/100になるように調整した。

## 5. 細菌検査

(1) 供試卵子からの細菌分離；細菌曝露した卵子をトリプトソーヤブイヨン内で増菌し、5%羊血液寒天培地で37℃, 24時間培養後、細菌の混在を調べた。

(2) 洗浄液および洗浄後の卵子からのK99大腸菌分離；細菌曝露後の各洗浄液から0.1mlをDHL寒天培地、5%羊血液寒天培地に塗布し、細菌数を計測し、また各洗浄液(0.5ml)並びに洗浄後の卵子全部をトリプトソーヤブイヨン内に入れ、K99大腸菌の分離を試みた。なお、分離した一部の菌について、生化学的性状検査を行ない確認した。

## 結 果

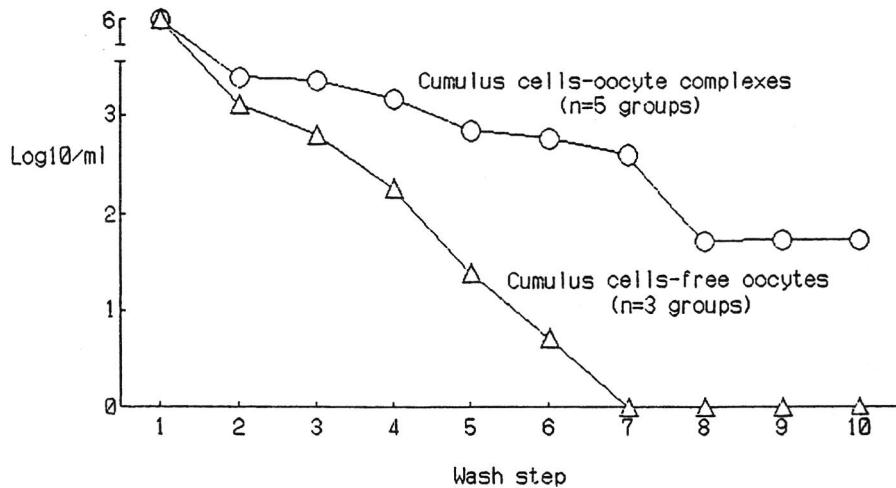
(1) 大腸菌曝露前の細菌検査で、供試した卵子のいずれからも細菌が分離されなかった。

(2) 10<sup>6</sup>~10<sup>8</sup>CFU/mlの濃度のK99大腸菌に卵丘細胞付着卵子と裸化卵子を曝露し、曝露後10回洗浄を行ったところ、卵丘細胞付着卵子由来の各洗浄液から、全群においてK99大腸菌が分離された。他方、裸化卵子由来の各洗浄液では、3群中、最大で8回目までの洗浄液からK99大腸菌が分離されたにとどまった。更に卵子について洗浄後も卵丘細胞付着卵子の全群から、裸化卵子では、3群中2群からそれぞれK99大腸菌が分離された(Table 1)。洗浄液から分離されたK99大腸菌数は、洗浄回数を重ねるに従い、いずれの群においても洗浄液からの分離菌数が減る傾向にあったが、卵丘細胞付着卵子では8回以上洗浄しても分離菌数は減少しなかった(Fig. 1)。

Table1. Isolation of K99 *E. coli* from sequential washes and groups of immature oocytes

oocytes/ group	Exposure dose of <i>K99 E. coli</i> (CFU/ml)	Last wash positive for <i>K99 E. coli</i>	Isolation of <i>K99 E. coli</i> from immature oocytes
<b>Cumulus cells-oocyte complexes</b>			
3 0	1. $2 \times 10^6$	1 0	positive
2 4	3. $0 \times 10^6$	1 0	positive
2 9	7. $0 \times 10^6$	1 0	positive
2 7	1. $0 \times 10^7$	1 0	positive
3 2	4. $0 \times 10^8$	1 0	positive
<b>Cumulus cells-free oocytes</b>			
2 4	1. $2 \times 10^6$	4	negative
2 7	7. $0 \times 10^6$	6	positive
2 9	4. $0 \times 10^8$	8	positive

CFU = colony forming units

Fig.1 The number of K99 *E. coli* isolated from sequential washes

## 考 察

本研究では、未成熟卵子にK99大腸菌を曝露し、the International Embryo Transfer Society (IETS) の推奨する洗浄方法<sup>3)</sup>に準じ、洗浄を行い、その後の卵子および洗浄液から曝露菌の分離を試みた。その結果、卵丘細胞付着卵子では、K99大腸菌曝露後、洗浄7回目までは洗浄回数を重ねるに従い洗浄液からの曝露菌の分離菌数は減少したが、洗浄8回目以降の洗浄液からは約10<sup>1</sup>

～10<sup>2</sup>CFU/mlの範囲で曝露菌が分離された。一方、裸化卵子では洗浄回数8回目までの洗浄液からK99大腸菌が分離されたが、それ以降は分離されなかった。IETSの洗浄操作手順では、洗浄前に透明帯周囲の付着物の確認および除去が推奨されている<sup>3)</sup>。またStringfellowら<sup>4,5)</sup>は透明帯が完全な胚では抗生物質を含まない洗浄液であっても、付着した細菌を洗浄により除去できるが、透明帯欠損胚では洗浄による細菌の除去は困難であることを指摘している。このように、透明帯表面の付着物もしくは透明帯の異常は、洗浄効果を減じているものと考えられ、透明帯周囲に卵丘細胞をもつ未成熟卵子に細菌が付着した場合、洗浄処理操作では容易に除去されにくいことが示唆された。Thomsenら<sup>7)</sup>は、Haemophilus somnusを透明帯の完全な胚に曝露したのち、洗浄したところ、胚からH. somnusが分離されたことから、細菌が透明帯へ付着する際に、細菌の持つ線毛等の付属器官が重要な役割をはたしていることを指摘している。本実験でも、洗浄後、裸化卵子からK99大腸菌が分離されたことは、K99大腸菌が付着因子である線毛を持つことから、卵子表面に付着し、洗浄により容易に除去できなかったものと考えられた。一方、Thomsenら<sup>7)</sup>は、H. somnusを胚に曝露後、洗浄前に抗生物質〔ペニシリン(100IU/ml)＋ストレプトマイシン(100μg/ml)＋アンホテリシンB(0.25μg/ml)〕処理により、胚に付着したH. somnusを除去できることを実験的に示したが、Riddle<sup>2)</sup>は、同様の方法でMycoplasmaを胚に曝露後、抗生物質で処理し、洗浄しても、Mycoplasmaが胚から分離された事実から、その菌種に有効な抗生物質を使用するべきであることを指摘している。また武居ら<sup>6)</sup>は、下痢子牛から分離したK99大腸菌の多くは、多数の薬剤に耐性を示すことを報告している。通常、卵子の体外培養時には、培養液に抗生物質が添加されているが、K99大腸菌のような多剤耐性菌が卵子に感染した場合、細菌の除去や感染を防ぐには、抗菌範囲の広い抗生物質を、洗浄用液や培養液に添加することが、重要であると考えられた。

## 文 献

- 1) 音井威重、東城孝良、東條秀徳、橋本稔(1990)：子牛におけるK99保有大腸菌症の発生と抗体調査、日獸会誌、43、193-196.
- 2) Riddell, K. P., Stringfellow, D. A. and Panangala, V. S. (1989): Interaction of Mycoplasma bovis and Mycoplasma bovigenitalium with preimplantation bovine embryos. Theriogenology, 32, 633-641.
- 3) Seidel, S. M. (1987): Manual of the International Embryo Transfer Society (Seidel, S. M. and Stringfellow, D. A., eds) p31-38, IETS, USA.
- 4) Stringfellow, D. A., Scalan, C. M., Brown, R. R., Meadows, G. B., Gray, B. W. and Young -White, R. R. (1984): Culture of bovine embryos after in vitro exposure to Brucella abortus (a,b,c). Theriogenology, 21, 1005-1012.
- 5) Stringfellow, D. A., Wolfe, D. F., Lauerman, L. H. and Sparling, P. H. (1986):

Resistance of preimplantation bovine embryos to infection with Brucella abortus.

Am. J. Vet. Res., 47, 1924~1927.

- 6) 武居和樹, 田中裕泰, 宇野健治, 来本作治 (1989) : 新生子牛における毒素原性大腸菌感染症と分離菌の性状について, 獣医畜産新報, 812, 145~148.
- 7) Thomson, M. S., Stringfellow, D. A. and Lauerman, L. H. (1988): Adherence of Haemophilus somnus to bovine embryos after in vitro exposure. Am. J. Vet. Res., 49, 63~66.
- 8) 八木充, 山内靖隆, 唯井茂 (1983) : 新生子牛下痢症の原因検索について, 畜産技術, 336, 5~11.



第 33 回  
哺乳動物卵子学会

講 演 要 旨 集

大 会 長： 広 井 正 彦

山形大学医学部教授

会 期 平成 4 年 5 月 16, 17 日

会 場 月岡ホテル（山形県上山市）



# 第33回 哺乳動物卵子学会

## 講演要旨集

Proceeding of the 33th Annual Meeting Japan Society for  
Mammalian Ova Research.

哺乳動物卵子学会

# 卵のQualityに関する考察

## Some Aspects on Ovum Quality

鈴木秋悦

Shuetu SUZUKI

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室

Dept. of Obstet. & Gynec., Sch. of Med., Keio University

1991年7月に開催された第7回世界体外受精会議の焦点は、「体外受精の成功率を如何にして向上させるか」という問題にしばられ、シンポジウムなどで多数の研究が報告された。そして、具体的な問題として、受精率は高いが着床率が低いという、従来から指摘されている点について多くの論議がなされた。そして、1つの結論として、たとえ分割卵であっても、胚移植後の発生能を推測することが困難であること、そのことからも、受精卵が胞胎期に近づくまで、可能な限り長時間培養することが必要とされた。すなわち、胚の着床率までを考慮しての受精率の向上が目標とされた。ここで注目されてきたのが、共培養(co-culture)という概念である。最近、この領域で先駆的研究を報告してきたBongsoらは、132個のヒト卵を、ヒト卵管膨大部の上皮細胞の存在下で受精させると、対象に比較して、高い受精率を得ることができ、これらの受精卵の着床率が予想以上に高く、従って、いわゆるtake-home babyの率も著しく高くなつたと報告している。また、共同研究者の大柴も、ヒト卵管の上皮細胞を24時間培養してconditioned mediumを作成し、それを培養液としてマウス初期胚を培養し、胚発育停止現象(2-cell block)が解除されるか否かを検討した結果、卵管因子の存在下での2-cell block現象の解除を報告している。すなわち、これらの研究から、卵管環境が、受精卵の発育率、移植胚の生育率に必須の条件を構成していることが推測される。しかし、一方で、Boltonは体外受精による受精卵を、胞胎期まで分割してから移植しても、2細胞期で移植しても着床率に差がないことを報告している。

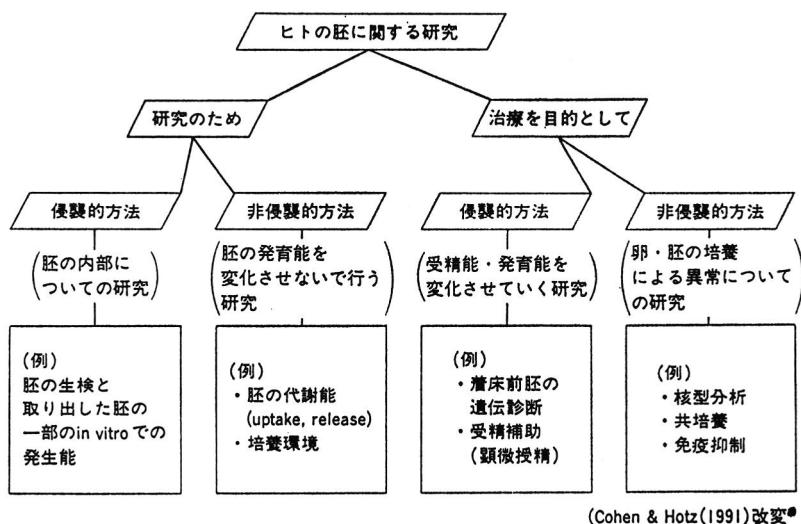
以上の如く、今日、体外受精の成功率が約15%と低率であるとの原因として、*in vitro*での操作が、卵および胚のqualityになんらかの影響を与えてはいないかという問題が提起されている。従ってまた、卵や胚のqualityを、如何にしてアセスメントするかということが論議されてきている。その方法としては、もちろん、体外受精の臨床という観点からは、卵や胚に障害を加えない非侵襲的方法ということになる。ここで注目されたのがLeeseらの生化学的方法である。すなわち、卵管環境の中で重視されてきたlactateとかpyruvateの

消費率から、卵や胚の Viability をアセスメントしようという試みである。この研究方向を考える時、今更ながら、1965年前後に、家兎の卵管分泌液中の体外受精に成功した当時の、Mastroianni らを中心とした、われわれの研究視点を現時点で両考する意義を感じる。

そこで、卵の quality をどのように考えていくかという問題であるが、研究手法としては、初期発生のプロセスが *in vivo* で如何に経過しているかを正確に把握し、次いで、研究者の多くが応用している *in vitro* での条件が、どこまで *in vivo* におけるそれを代行しうるかという問題が解決される必要がある。

われわれは、1964年に赤毛猿の未成熟卵を *in vitro* で培養し、第2減数分裂中期まで成熟させることに成功し、次いで、この培養成熟卵を卵管内に移植して、その受精能を検討した。しかし、核レベルで成熟を完了した卵であっても受精成立の十分な条件を有していないことが明らかとなった。このことは、卵の正常発生の条件として、卵の細胞質の成熟が必要であるという結論に達した。その後、今日に至るまで、主として、卵の細胞質の動態に関する、電子顕微鏡的、組織化学的、免疫蛍光抗体法的手法に加えて、顕微注入法を応用して研究を進めてきている。その結果、卵におけるステロイド産生、卵成熟と cAMP の関係、co-culture による卵管因子の重要性などを明らかしてきた。

本講演においては、卵ならびに胚の quality を、*in vivo* と *in vitro* の両者の環境下でどのように考えていくかを考察し、次いで、われわれの研究成果の概略を紹介し、最後に、ヒト胚の研究についての今後の展望にふれたいと思う。



# マウス卵および着床前初期胚の成熟と エネルギー代謝

Maturation and Energy-metabolism of Oocytes  
and Preimplantation Embryos from Mice

加藤 尚彦

Takahiko KATO

横浜市立大学医学部第一生化学講座

Department of Biochemistry, School of Medicine, Yokohama City University

**目的：**哺乳類の卵・胚のモデルであるマウスの卵・胚を試料とし、独自に開発した微量技術と定量法を用いて卵及び初期胚を分析し、それらの成熟過程の特性を明らかにする事を目的とした。初期胚の8細胞期迄は、主なエネルギー源として pyruvate が用いられ、以後は glucose が利用される。一方 glucose の analogue である 2-deoxyglucose(DG) は、glucose transporter によって細胞内に取り込まれ、hexokinase (EC 2.7.1.1, HK) により磷酸化されて 2-deoxyglycose 6-phosphate (DG6P) となり、それ以上は代謝されずに細胞内に蓄積する。故に卵胚の成熟発育に伴うエネルギー代謝特性を分析する為に、DG と DG6P の酵素的微量測定法を工夫し<sup>1)</sup>、マウス卵胚を DG とともに培養した後、個々の卵胚に取り込まれた DG と DG6P を微量測定した。更に [<sup>3</sup>H]-DG を单一卵胚に取り込ませる微量培養法を開発し、DG の取り込みを指標として種々の栄養因子が、卵胚の成熟発育に及ぼす影響を解析した。また新たに工夫した microimmunoblotting や従来の二次元 microelectrophoresis 法を用いて、10-200 個の卵胚に発現される glucose transporter や蛋白質パターンの特性を解析した（未発表）。

**方法：** 個々の卵胚試料と DG の超微量測定法：マウス (C3B6F<sub>1</sub> 系、6-9 週齢) に PMS と hCG を投与して過排卵を起こさせ、PMS 静注前と 8 h 後に卵胞卵を、また静注後 16, 24 h 後に排卵された未受精卵を採取し、受精させたマウスから以下に示す hCG 静注後の時点で、初期胚を採取した；1-cell [28 h], 2-cell [40], 4-cell [52], 8-cell [64], 桑実胚 [76], 胚胎 [88]。新鮮な卵胚と DG とともに培養後、洗浄した卵胚を凍結乾燥した後、手製の高感度水晶糸バランスを用いて個々の乾燥卵胚を秤量した。電気泳動の試料には新鮮な卵胚を用いた。

Microculture 法：器官培養皿 (Falcon 3037) の中心の well に 4  $\mu$ l の培養液 (modified BWW) の小滴を山盛りにしてとり、周囲の well に蒸留水を張り培養液の蒸発を防いだ。卵胚に [<sup>3</sup>H]-DG を取

り込ませる時は、 $[^3\text{H}]\text{-DG}$  を含む培養液の小滴を  $2 \mu\text{l}$  を先ずとり、 $2 \mu\text{l}$  の卵胚を含む培養液を加えた。4  $\mu\text{l}$  以上の培養液の蒸発は、5%  $\text{CO}_2$ -空気中 2 時間以内の培養では無視出来た。

microelectrophoresis と microimmunoblotting 法：二次元電気泳動には奥山ら<sup>2)</sup>のミクロ泳動装置 (gel size, 35x38x1 mm) を用いた。glucose transporter 蛋白について、同じ装置を利用して  $1 \times 1 \times 7 \text{ mm}$  の slot を作り、10 mm 泳動して immunoblotを行った (詳しくは本学会で森田等が発表)。

**結果：** 卵胚の発育とその蛋白質の泳動パターン：卵胚の重量は卵胚の発育の間殆ど変わらず、 $32.9 \pm 1.9$  (SD) ng 乾燥重量 [371 個] であった。20 個の卵胚を試料とする二次元電気泳動により数十個の spots が得られたが、その main spots は排卵を契機として著しく変化し、全体のパターンにも大きな変化が見られた。受精直前から胞胚に至る発育の期間には、種々の spots に細かい変化が見られたが、全体のパターンは大きく変化しなかった。

エネルギー代謝特性：HK 活性は発育の過程で指数関数的に急激に増加した。8-cell 期以後 HK 活性の増加速度は、細胞分裂による細胞数の増加速度を凌駕した。この事実は、8-cell 期以後細胞一個当たりの HK 量が急激に増加し、pyruvate から glucose へのエネルギー源の転換を支えていることを意味している。未受精卵では、glucose と G6P は 0~24 h にかけて急速に減少し、受精を契機に飛躍的に増加する。続いて胞胚期まで指数関数的に増加した。8-cell 期以後はその増加速度は細胞数増加速度を下回り、細胞一個当たりの glucose と G6P 量は減少した。未受精卵では DG 取り込み活性は著しく低かった。受精により DG 取り込み活性は飛躍的に増加し、DG6P生成活性も認められるようになった。初期胚では両活性とも急速に増加したが、4-cell から 8-cell 期にかけて一時的に増加速度の低下が認められた。卵丘細胞・卵複合体 (卵丘細胞に囲まれた卵) は、hCG 静注前の方が静注後 8 h に比べて DG を著しく活発に取り込んだ。しかし卵丘細胞を除去し裸卵にすると、DG の取り込みは殆ど見られなかった。つまり卵丘細胞が DG を取り込んで DG6P を生成し、両物質とも卵丘細胞と卵の間の gap junction を通じて卵内に取り込まれることを意味している。また DG の取り込みの kinetics を表す理論式による解析の結果、細胞質には 2 つの取り込みの pool (fast trapping pool と metabolic pool) があると考えられ、これらの両 pool size は初期胚の成熟発育と共に増加した。

glucose transporter と成長因子の効果：glucose transporter の isoform の一つである GLUT1 が排卵された未受精卵に見いだされ、初期胚中では胞胚に至る成熟に伴って指数関数的に増加した。上皮成長因子は in vitro での卵胚の成熟発育過程で DG の取り込みを増強させ、またその結合も増加した。他の種々の成長因子には、胚の発育に影響しないものが多かった。

#### 主要文献：

1. Akabayashi, A., Saito, T. and Kato, T.: An enzymatic microdetermination method for deoxyglucose and deoxyglucose 6-phosphate. Biomed. Res. 1989; 10:173-177.
2. Manabe, T., Tachi, K., Kojima, K. and Okuyama, T.: Two-dimensional electrophoresis of plasma proteins without denaturing agents. J. Biochem. 1979; 85:649-659.

# 哺 乳 動 物 卵 子 研 究 の 展 望

Future Prospects of Mammalian Ova Research

豊田 裕

Yutaka TOYODA

東京大学医科学研究所

Institute of Medical Science, University of Tokyo

## 1. 卵子研究の原点

卵子は、一個の細胞に過ぎないが、受精によって完全な一個体を再構築できる点に際立った特徴を有する。この個体形成のサイクルが、地球上に生物が誕生して以来連綿と続いていることを考えると、卵子は正に不死の細胞といえる。卵子に関する全ての研究は、究極的には、この全能性と不死性の解明に向けられると思う。従って、どの様に精密な分析的な研究であっても、その中に、卵子を個体に導くという観点が必然的に含まれる。この意味で、哺乳類卵子の研究に一時期を画したのは、1890年の Walter Heape によるウサギ受精卵の移植の成功、および 1959 年の M.C.Chang によるウサギ体外受精卵移植の成功であった。Heape 以来、すでに百年以上が経過し、研究は著しく進展したが、究極の解明は遙か彼方にあり、容易には手が届かないように思われる。常に原点を踏まえながら、新しい視点と方法論の導入が求められる。

## 2. 哺乳類卵子研究の特徴

1) 基礎研究と応用研究。ウサギに始まる受精卵移植の成功はその後、実験動物および家畜に広がり、1987年にはついに人にまで達した。その後も研究は続いている。その過程を振り返って見ると、研究の流れは「基礎から応用へ」あるいは「実験動物から産業動物へ」という過程を必ずしも経ていない。むしろ当初から、実用上の要請が研究の大きな動機となっており、個々の動物種特有の技術として発達してきた。この傾向は、今も変わらない。とにかく、性急に果実のみを求める傾向が強い。

しかし、すべての科学の研究分野と同様に、哺乳類卵子研究においても、基礎研究の重要性は、どれほど強調しても、強調しすぎることはない。事実、1950代後半からのマウスを用いた初期胚発生に関する緻密な分析的研究が、人の体外受精・胚移植の臨床応用に、また牛における体外成熟卵の体外受精・胚移植の産業化に、決定的な基礎を与えたことはだれしも否定しえないのである。しかし、そのマウスにおいてさえ、受精卵培養のための条件は未知の部分が多く、新たな因子が次々と発見される可能性を含んでいる。

2) 材料の制約。哺乳類卵子に関する研究を制約する最大の要因は、十分な数の均質な

材料を入手しにくい点である。この制約が、上に述べた性急に成果を求める傾向と相まって、対照を置いた厳密な実験の設定を困難にしている。しかし、この点でも事情は急速に変わりつつある。最も重要な進歩は、個々の細胞での遺伝子の解析を可能にした核酸の特異的増幅法（PCR 法および RT-PCR 法）および酵素活性の測定を可能にした酵素サイクリング法の開発であろう。これらの新手法の導入によって、今や卵子の「個性」を論じられる時代になりつつある。そうなれば、数の制約は、もはや大きな問題ではない。実際、ビペットで精子を一匹吸い上げてサンプリングチューブに入れるより、卵子を一個入れるほうが、ずっとやさしい（精子研究の足を引っ張るつもりは毛頭ない一念のため）。

### 3. 今後の重要な研究課題

全能性と不死性を兼ね備えた卵子であれば、その魅力は尽きるところがない。それぞれの立場によって、様々な角度からの研究が可能なことは、言うまでもないが、私は次のような課題に興味をもっている。

1) 排卵の制御。今日マウスを使って実験している者は誰でも当然のように PMSG/hCG による過排卵処理を行っているが、その反応が安定しないことに多かれ少なかれ悩んでいるはずである。しかし、有効な解決策はない。また、過剰排卵と言っても、マウスでさえ一度に 100 個を越えることはまれである。同様に、ある限られた数の卵子だけ（時には一個だけ）を、確実に排卵させる手段も確立されていない。数だけではなく、排卵の時期および卵子の質のコントロールも重要である。この問題に関連し、卵子あるいは受精卵の遺伝診断が今後最も注目される分野の一つとなるであろう。

2) 卵子の成熟誘導。体外培養による未熟卵の成熟誘導は近年活発に研究され、一部は実用の域に達しているが、その技術は多分に経験的であり、要因の解析は進んでいない。卵子成熟の制御にかかわる細胞外および細胞内の機構についての分析的研究の推進が急がれる。同時に、成熟誘導可能な卵子の数が、現状では比較的少数に限られていることも、注目に値する。その数が、およそ上に述べた過剰排卵の限界値に相当するように思われるには、偶然だろうか。そもそも、卵巣の中で退行していく、圧倒的多数の卵子は成熟誘導可能なのであろうか。それとも退行すべくプログラムされているのであろうか。

3) 卵子の受精能力。受精における精子・卵子間相互作用の解析に際して、卵子は受け身の立場で考えられやすい。例えば、精子が、その頭部からヒアルロニダーゼを放出して卵丘基質のヒアルロン酸を分解し卵子に到達することは、どの教科書にも書いてあるが、卵丘基質のヒアルロン酸が精子に対してどの様な作用を及ぼすかについては問題とされていない。近年、透明帯の精子受容体糖蛋白質（マウスでは、ZP-2 および ZP-3）の構造と機能に関して目覚ましい進歩が成し遂げられたが、これだけで、すべてを説明できるとは考え難く、より広範囲な受精制御因子の探索に興味が持たれる。また、排卵後、卵子はいつまで体外受精可能で正常な個体に発生しうるのか、というような地味ではあるが、重要なデータの蓄積も大切である。

このほか、精子・卵融合の過程、精子による卵子の活性化の機構など、分子レベルの解析を急ぐテーマは沢山ある。応用分野では、生殖医学、家畜改良増殖への貢献のほかに、野生動物資源の保存および活用への貢献も重視される。会員諸兄姉の健闘を期待したい。

# LH-RH 及び数種ホルモンによる過排卵誘起時の初期胚の正常性について

Discussion on normality of embryo obtained by superovulation treatment with LH-RH or other hormone preparations

船内克俊・原 秀平・加田日出美

Katsutoshi FUNAUCHI, Shuhei HARA, Hidemi KADA

東京農業大学短期大学部農業科畜産学研究室

Laboratory of Animal Science, Junior College, Tokyo University of Agriculture

目的：優良家畜の生産を目的として、種々のホルモン剤による過排卵処理が行われている。しかしこれらのホルモンは、生体にとって異種蛋白であるために、抗体の产生や卵巣の疲労を引き起こすことになり、反復処理が困難になっている。また一方で、屠場卵巣からの仔畜生産も検討されているが、体外授精の煩雑さや受精成績、優秀な雌畜からの卵子を有效地に利用するということからも、過排卵処理によって卵子を回収することが望ましいと思われる。近年新しい過排卵法の試みとしてLH-RH の使用が検討されているが、LH-RH は生体にとってより自然な排卵を起こさせ、今までのホルモンに比べ低分子であることが知られている。そこで我々は、LH-RH のFSH 放出作用に着目し、LH-RH によって過排卵され受精した初期胚について、その正常性をPMSGとhCG の組合せによる過排卵法と比較検討したので報告する。

方法：試験には、8～12週齢のddY 系未経産マウスを供試した。各ホルモンの投与プログラムは、Fig. 1 に示した。LH-RH による過排卵法は、FSH の大量放出を目的としてhCG 5 IUを投与し、この日をDay 0とした。LH-RH の投与は、Day 0 からDay 1 にかけて22:00, 2:00, 6:00, 10:00, 14:00 の5回にそれぞれ 0.025 $\mu$ gずつ投与し、Day 2 の17:00 に排卵を目的としたhCG を5 IU投与した。交配方法は、Day 2 でのhCG 投与後24時間雄と同居させた。胚の検索はDay 6 の10:00に屠殺開腹し、子宮および卵管の灌流を行って胚を回収し、実体顕微鏡下で排卵数の算定と初期胚の形態での正常性を観察した後、外見上正

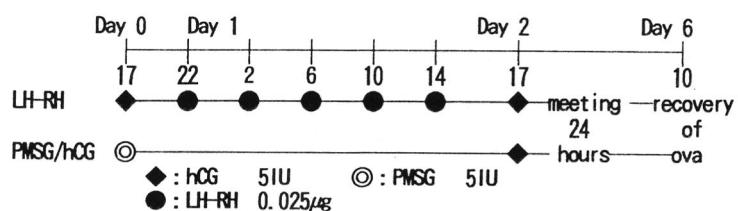


Fig. 1 Program of hormone treatments

常と思われる桑実胚および胚盤胞を用い、 $0.04\mu\text{g}/\text{ml}$ のコレセミドを含むChang's 培養液中で4時間培養した後、常法に従って初期胚の染色体標本を作成し、その正常性もあわせて観察した。PMSGとhCGの組合せによる過排卵法では、PMSG 5 IUを17:00に投与した日をDay 0とし、Day 2の17:00にhCG 5 IUを投与し、雄と24時間同居させた後に同様の検索を行った。

### 結果：LH-RH および

PMSG/hCGによる過排卵  
誘起時の排卵数および

形態上の異常率について  
は、Table. 1 に示し  
たとおりである。平均

排卵数は、LH-RH 法で

$21.3 \pm 1.7$ 、PMSG/hCG法で $27.0 \pm 7.1$ であった。総排卵数に占める異常卵の数（異常率）は、LH-RH 法で31.2%

%、PMSG/hCG法39.5%で、LH-RH 法はPMSG/hCG法に比して異常率が低い傾向にあったが、両者間に有意差はみられなかった( $P < 0.05$ )。

両者の過排卵法で回収された、形態上正常と思われた胚の分裂中期割球での染色体異常率はTable. 2 に示した。LH-RH 法では観察した分裂中期割球数48のうち、正常な染色体数を示したものは37、異常な数を示したもののは11であり、観察総割球数に占める異常割球の割合は22.9%であった。PMSG/hCG 法では16割球のうち正常10、異常 6

異常率は37.5%となった。染色体異常率についてもLH-RH 法はPMSG/hCG法に比して異常率が低い傾向にあったが、両者間に有意差はみられなかった( $P < 0.05$ )。

考察：以上のようにLH-RH による過排卵法では、胚の形態上ならびに染色体の異常率は、PMSG/hCG法よりやや低い傾向を示したが、有意差はみられなかった。一般にPMSG/hCG法では排卵数は多いものの、異常率が高いと言われている。本実験では、LH-RH 法とPMSG/hCG法に異常率において差を認めなかったことから、夜間数回にわたるホルモン処理を行わなくてはならない点で、LH-RH 法を臨床応用するには改善の余地が残されていると思われるが、LH-RH による過排卵法は、研究が緒についたばかりであるので、今後ホルモン処理の簡易化や異常率の改善を行えば、数ある過排卵法の一手法として確立できると思われた。

### 主要文献：

1. 金山喜一・遠藤 克・小林軍次郎・佐久間勇次 (1984) : LH-RH によるマウスの過排卵誘導に関する研究  
日不妊会誌, 29, 273-278.
2. Yoshizawa, M., Takada, M. and Muramatsu, T.: Incidence of Chromosomal Aberration and Primary Sex Ratio in First-Cleavage Mouse Eggs. J. Mamm. Ova Res. 1989; 6 : 119-125

Table. 1 Results of morphological embryo normalities

	No. of mice examine	Mean of ova ovulated $\pm S.E.$	Total	Normal	Abnormal	Abnormal rate (%)
LH-RH	8	$21.3 \pm 1.7$	170	117	53	31.2
PMSG/hCG	3	$27.0 \pm 7.1$	81	49	32	39.5

Table. 2 Results of chromosomal normalities

	Total blastmere examine	Normal	Abnormal	Abnormal rate (%)
LH-RH	48	37	11	22.9
PMSG/hCG	16	10	6	37.5

# PMSGによるラット移植卵巣の卵胞発育

Effect of PMSG on follicular development in transplanted rat ovary

利部 聰・萬場光一・牧田登之

KAGABU Satosi, MAMBA Kouichi & MAKITA Takashi

山口大学農学部獣医学科家畜解剖学教室

Department of Veterinary anatomy, Yamaguchi University

## [目的]

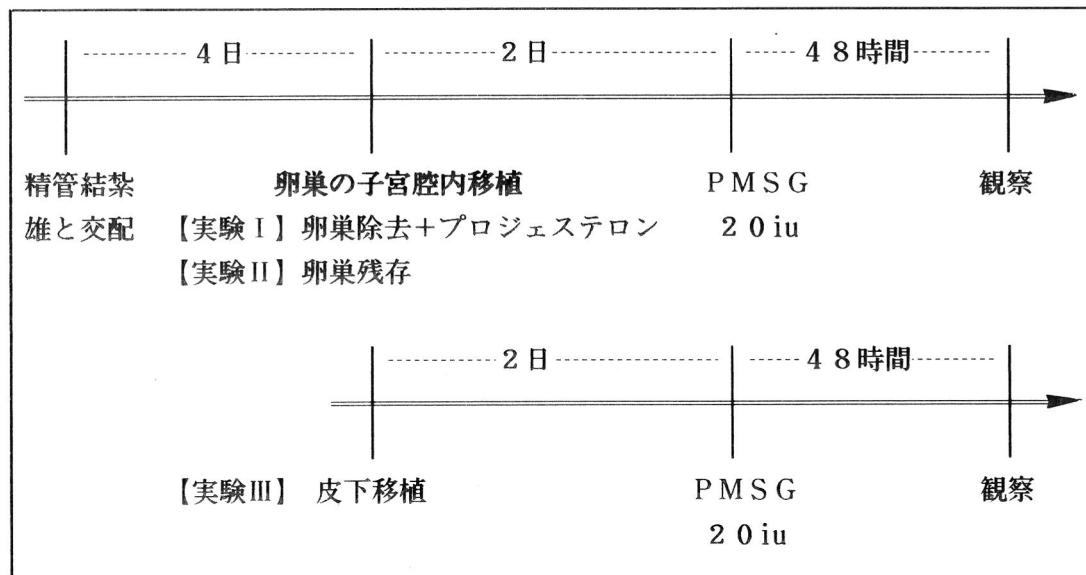
一時期子宮腔内は移植片にたいして「治外法権」になることを利用して、卵巣の偽妊娠ラット子宮腔内移植を試み、異個体ラット卵巣の生着に成功している<sup>1)</sup>。さらにニホンザル、ハムスター、ウサギ、マウス等の異種動物卵巣の生着が可能であることが確かめられている<sup>2)</sup>。この方法を用いた生着卵巣の小型卵胞を人為的に発育させられれば、本技術の応用範囲はさらに拡がると考えられるが現在までのところ生着卵巣がPMSGに反応して卵胞が発育することは確かめられていない。そこで、本実験では、PMSGによる生着卵巣の卵胞発育の可能性を調べた。

## [方法]

実験に用いた動物はドナー、レシピエントともウイスター・今道系ラットである。ドナーとして大型卵胞の存在しない21日齢<sup>3)</sup>、一方レシピエントとして12週齢・未経産の4日型発情周期を3回以上繰り返した健康な雌ラットを用いた。【実験I】では発情前期の夜に精管結紮雄ラットと同居させ翌日腔栓を確認した偽妊娠ラットをレシピエントとした。腔栓確認日を0日として偽妊娠4日目に卵巣を移植した。ペントバルビタール・ソディウム(5mg/ラット)で前麻酔、ジエチルエーテルで追麻酔しておいたレシピエントの子宮角を露出して、子宮角中央部反間膜側に小孔をピンセット(INOX7番)で開け、移植直前に麻酔下で摘出した卵巣をそのまま挿入した。挿入後直ちに眼科用縫合糸で子宮角の小孔を縫い合わせ、続いて腹壁を縫合し移植を終了した。

【実験II】として投与されたPMSGがレシピエント側卵巣の卵胞を発育させることも容易に考えられ本実験の目的からそれるので、両卵巣を除去し持続性プロジェステロン(ルテウムデポー)を0.2ml筋肉内投与した実験区も設けた。

さらに【実験III】では単に卵巣を除去しただけのレシピエントを用いて皮下移植した実験も行った。移植24時間後にPMSG 20iuを筋肉内注射し、その後48時間で剖検した。3つの実験区とも採材後常法に従いパラフィン連続切片を作製して染色後検鏡した。生着の判定は、おおむね Braw & Tsafiriri<sup>4)</sup>の判定基準によった。すなわち、果粒層細胞に核濃縮が認められないこと、果粒層細胞に分裂増殖像が認められることをもって生着卵巣とみなした。閉鎖卵胞や黄体などは観察対象から除外した。



## [結果と考察]

卵巣を残したままのレシピエントに PMSG を投与すると移植卵巣は全例で消失したが、卵巣を摘出しさらにプロジェステロンを投与した実験区の少数のものに PMSG に反応した卵胞が観察された。また、皮下移植卵巣は 2 例で PMSG に反応した大型卵胞を認めた。

【II】の卵巣除去 + P\* 群に卵胞発育が認められ、【I】の卵巣残存群に発育卵胞が認められなかったがこの違いは、卵巣残存群では、レシピエント側の卵巣が PMSG に反応して卵胞が発育したことによる生着卵巣の子宮環境の変化によるものと推察される。

表、移植卵巣の PMSG に対する反応

	PMSG に反応した 卵胞を保有したラット数
【I】 卵巣残存	0
【II】 卵巣除去 + P*	4
【III】 皮下移植	2

標本数10頭、\*: ルテウムアボ-0.2ml

## 主要文献

- 1) 利部聰・萬場光一・石田哲也：ラット子宮腔へのラット卵巣の同種間移植、日不妊会誌、36、185-188、1991
- 2) 利部聰・萬場光一：ニホンザル、ゴールデンハムスター、マウス、ウサギ卵巣のラット子宮腔への異種間移植、日不妊会誌、投稿中
- 3) 利部聰：ラット卵胞数と過排卵処理後の排卵数との定量形態学的研究、日不妊会誌、28、505-507、1983
- 4) BRAW, R. H. & TSAFRIRI, A.: Effect of PMSG on follicular atresia in the immature rat ovary, J. Reprod. Fert., 56, 267, 1980

# チャイニーズハムスターの過排卵誘発法

Superovulation in Chinese Hamster

飯沢禎之・柳田薰・星和彦・上口勇次郎\*・美甘和哉\*

Yosiyuki IIZAWA, Kaoru YANAGIDA, Kazuyuki HOSHI  
Yujiro KAMIGUCHI\*, Kazuya MIKAMO\*

福島県立医科大学産科婦人科教室、旭川医科大学生物学教室\*

Department of Gynecology and Obstetrics, Fukushima Medical College  
Department of Biology, Asahikawa Medical college\*

**【目的】** チャイニーズハムスターは、初期発生の研究、配偶子・受精卵の研究において非常に有用な動物であるが、過排卵誘発の方法が確立されていないためか、実験動物として用いられることは少なかった。これまでチャイニーズハムスター過排卵誘発の本格的な研究は、1987年のRoldanらの報告だけであるが、かれらは一般的なhCG (human chorionic gonadotropin) の代わりに入手困難なPLH (pituitary lute-nizing hormone) を用いている。かれらは同時にhCGでのデータも報告しているが満足な結果は得られていない。我々は、他の多くの齧歯類と同様にPMSG (pregnant mare serum gonadotropin) とhCGを用いてチャイニーズハムスター過排卵誘発法を試みた。

**【方法】** 実験動物は旭川医科大学生物学教室で改良された早熟・多産型のチャイニーズハムスター (CHA) で、4日型性周期の確認された生後約60日の成熟雌を用いた。性周期1日目(排卵日)の14:00に1回目のPMSG、43時間後(3日目の9:00)に2回目のPMSG、その7時間後(3日目の16:00)にhCGを投与した。hCG投与18時間後(4日目の10:00)に開腹し、排卵数、卵巢に残った未配卵濾胞数を記録した。ホルモン投与方法、hCG投与量によって実験群を3群に分けた。

**【結果】** 自然排卵の約2倍である20卵以上排卵した場合を過排卵成功例とし、成功例の排卵数・未排卵濾胞数の平均を求めた。Table 1に各群の結果を示したが、hCG投与量が0.9IU/g体重の群より、1.2IU/g体重の群の方が排卵成績は良かった。また、腹腔内投与より皮下投与の方が確実に過排卵を誘発できることがわかった。Group 3の平均過排卵数 ( $58.8 \pm 16.5$ 卵/動物) は自然排卵数 ( $10.2 \pm 1.4$ ) の5倍以上であり、RoldanらがhCGを用いた場合の結果 ( $23.2 \pm 12.8$ ) に比べるかによい成績であった。また、発育した濾胞数(平均63.1個)、発育濾胞のうち排卵に至った率(93.2%)を比較しても彼らの方法(42.2個、55.0%)よりよい成績であった(Table 2)。

**【考察】** PMSGの過剰投与が排卵数を逆に減少させることが他の動物で報告されているが、成熟チャイニーズハムスターにもこの現象がみられ、その限界は0.3IU/g体重、30卵程度であった。過剰投与例の卵巢

の観察から、この現象の原因は早期のLHサージであると推測され、その解決策としてPMSGの2回投与を試みた。1回目のPMSG投与量は早期のLHサージを起こさない量として決定した。2回目のPMSG投与時間は卵胞を十分に発育させ、かつhCG投与までにLHサージを起こさないよう、hCG投与7時間前とした。2回目のPMSG投与量は十分な排卵数を得られる最小限の量とした。一般的に成熟動物は未成熟動物に比べ過排卵の成績が悪いことが知られている。この原因がやはり早期のLHサージである可能性もあり、今後そういった動物においてもPMSGの回投与法の有効性を試してみたい。

#### 主要文献

- Roldan E, Horiuchi T, Yanagimachi R (1987): Superovulation in immature and mature Chinese hamsters. Gamete Res., 16:281-290.
- Wilson ED, Zarrow MX (1962): Comparison of superovulation in the immature mouse and rat. J. Reprod. Fertil., 3:148-158.

Table 1: 各グループのホルモン投与スケジュール及びその排卵成績

投与方法	Group 1	Group 2	Group 3
	腹腔	腹腔	腰部皮下
PMSG 1回目 時間・量		Day 1 14時 0.3 IU/g体重	
PMSG 2回目 時間・量		Day 3 9時 0.4 IU/g体重	
hCG 時間・量	Day 3 16時 0.9 IU/g体重	Day 3 16時 1.2 IU/g体重	
過排卵成功動物数 成功率 (%)	11/17 (64.7%)	13/20 (65.0%)	43/43 (100%)
排卵数 mean±S.D. (range)	47.9±23.5 (20-99)	60.2±22.5 (25-110)	58.8±16.5 (38-99)
成熟未排卵濾胞数 mean±S.D. (range)	26.7±20.3 (8-67)	10.7±8.4 (1-33)	4.3±3.4 (0-12)

Table 2: 過排卵誘発成績の比較

	我々の方法 成熟雌 (8-9週齢) PMSG-PMSG-hCG	Roldanらの方法 成熟雌 (5-8週齢) PMSG-hCG	Roldanらの方法 未成熟雌 (5-6週齢) PMSG-PLH
動物数 (n)	43	6	6
排卵数 : A	58.8±16.5	23.2±12.8	46.4±9.2
未排卵濾胞数 : B	4.3±3.4	19±9	8±2
発育濾胞数 : A+B	63.1	42.2	54.4
排卵率 : A/A+B	93.2%	55.0%	85.3%

# マウス顆粒膜細胞間のGap Junction

## Gap Junctions of Mouse Granulosa Cells

小池数与・渡辺皓\*・外崎昭\*・広井正彦  
Kazutomo KOIKE, Hiroshi WATANABE\*,  
Akira TONOSAKI\*, Masahiko HIROI

山形大学医学部産科婦人科学教室・\*同解剖学教室

Department of Gynecology and Obstetrics, \*Department of Anatomy,  
Yamagata University School of Medicine

**目的：**顆粒膜細胞のギャップ結合(GJ)による細胞間連絡は、顆粒層全体を合胞化し、卵母細胞への栄養供給、減数分裂再開の抑制などに関与する<sup>1)</sup>。顆粒膜細胞のGJ膜は、卵胞の発育と共に増加し、排卵直前にGJの細胞内取込みを伴って、著明に減少するといわれる<sup>1)</sup>。我々は、GJ膜の更新過程の解明を目的として、GJ蛋白のひとつである心臓GJ由来のコネクシン(Cx)43に対する抗体の免疫組織化学的反応性をもとに、マウス顆粒膜細胞のGJの細胞内取込み・分解・形成過程について、電子顕微鏡による形態学的検討を行なった。

**方法：**24-27日令のICR雌マウスを用い、PMS投与48h後にhCGを投与する過程内の、PMS投与前を含む幾つかの時期の卵巣を摘出し、種々の成熟過程の卵胞を観察した。1)蛍光抗体法；1%パラホルムアルデヒド(PFA)固定後の凍結切片に、抗Cx43抗体(日本新薬)とFITC二次抗体を反応させ、蛍光顕微鏡で観察した。2)超薄切片法；2.5%グルタルアルデヒド(GA)で固定後、四酸化オスミウムで後固定、脱水、エポン樹脂包埋の後、超薄切片を作製し、電顕観察を行なった。3)凍結割断レプリカ法；2.5%GA単固定後、30%グリセロールまたは40%メタノールで置換し、凍結割断後あるいはディープエッティング後、回転蒸着し、レプリカ膜を作製し、電顕観察した。4)アクチン細糸のS-1修飾法；1%PFA固定後、マイクロスライサーで約100μmの厚さの切片を作製し、ミオシンS-1を含む溶液中で反応させ、樹脂包埋した。5)酸性磷酸化酵素証明法；2%GAで固定後の厚さ約40μmの切片を、塩化セリウムを含む溶液中で反応させた後、樹脂包埋した。6)免疫電顕法；1%PFA固定後の厚さ約40μmの切片を、抗Cx43抗体に反応させた後、金コロイド標識二次抗体を反応させ、二重固定し樹脂に包埋した。

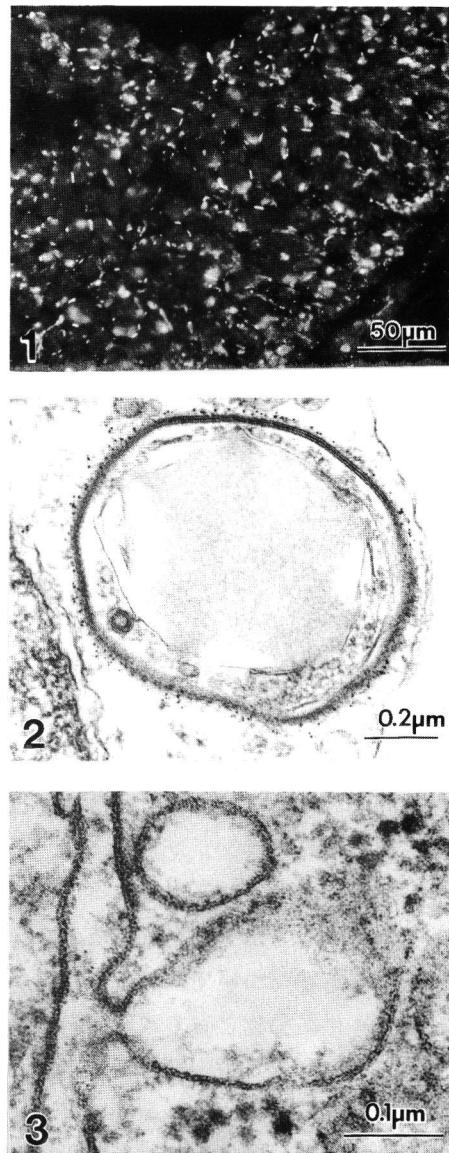
**結果：**1)蛍光抗体法。反応性は、顆粒膜細胞、卵母細胞の周囲などに斑状、線状、点状に認めた。顆粒膜細胞の反応性は、一次卵胞では微弱であり、二次卵胞ではやや増大した。PMS投与48h後とhCG投与1h後(図1)の成熟卵胞顆粒層では、特に強い反応性を呈したのに対して、hCG投与5h後では、反応性が低下した。2)顆粒膜細胞GJの電顕像。一次卵胞では少数の細胞表面GJが観察され、二次卵胞では細胞表面のGJが数、面積ともに増加した。PMS投与48h後とhCG投与1h後の時期の成熟卵胞の果粒膜細胞内には、表面のGJとそれに連続して細胞内に蛇行して伸びる細管状GJ、および細胞内のannular GJが存在した。hCG投与5h後では、表面のGJは著しくその数が減少し、細胞内には、様々な分解過程を

示すGJを認めた。細管状GJの近傍には、常に微細な線維構造が密に存在した。これらの線維は、S-1により修飾され、アクチン細糸の存在を確認した。また、annular GJの一部には、酸性磷酸化酵素の活性を認めた。3)免疫電顕法。顆粒膜細胞表面のGJには、細胞質側に金粒子の結合を認め、annular GJにも(図2)反応性を認めた。しかし、分解過程のGJには、抗体の反応を認めなかった。4)顆粒膜細胞の形質膜更新に関する観察。成熟卵胞の顆粒膜細胞では、形質膜直下に粗面小胞体(RER)が発達していた。また、RERの末端部が膨らみ、小胞状にくびれる像や、RER由来の小胞が形質膜に癒合し、Ω状に開口する形態変化を示す像も確認した(図3)。これらの一連の形態は、PMS投与48h後およびhCG投与1h後の成熟卵胞で、比較的高頻度に出現したが、hCG投与後5hでは稀であった。

**考察:**マウス顆粒膜細胞のGJは、他の哺乳類と同様に、卵胞の発育と共に細胞表面のGJが増加し、排卵直前にGJの細胞内取込みを伴って、著明に減少することを確認することができた。今回観察した複雑に蛇行した細管状GJの存在は、これまでに知られていない。この構造は、常にアクチン細糸主体の線維により密に覆われておらず、annular GJを形質膜からくびり取る際に、その狭窄部がアクチンによって強く絞めつけられて形成したものと考えられる。抗Cx43抗体の反応性から、分解前のannular GJではGJ蛋白の構造は保たれており、その後、一部は水解小体により分解されるものと解釈される。文献的には、GJ蛋白は糖鎖をもたないとされ<sup>2)</sup>、免疫電顕的に、GJ蛋白の形質膜直下のRER局在性が、神経細胞において証明されている<sup>3)</sup>。のことより、RER由来の小胞が直接形質膜に癒合しΩ状に開口する一連の形態変化は、RERで合成されたGJ蛋白が、ゴルジ装置を経由せずに、直接形質膜に組込まれる可能性を想像させる。

#### 文献:

1. Larsen, W. J., et al. (1991). Expansion of the cumulus-oocyte complex during the preovulatory period: Possible roles in oocyte maturation, ovulation, and fertilization. In: Ultrastructure of the Ovary, Edited by G. Familial, S. et al. Kluwer Academic Publishers, pp. 45~61
2. Gilula, N. B. (1984). The biosynthesis of gap junctions. Fed. Proc., 43, 2678~2680
3. Yamamoto, T., Hertzberg, E. L. and Nagy, J. I. (1990). Epitopes of gap junctional proteins localized to neuronal subsurface cisterns. Brain Res., 527, 135~139



# ヤギにおけるPMSG-PG処置後の卵胞発育

Follicular growth after PMSG-PG treatment in the goat

青島 義明, 佐々田比呂志, 菅原 七郎

Yoshiaki AOSTIMA, Hiroshi SASADA & Shichiro SUGAWARA

東北大学 農学部 家畜繁殖学

Lab. Animal Reproduction, Faculty of Agriculture, TOHOKU University

目的：牛および豚では屠場由来の卵巣を用いて卵胞卵子の体外受精や受精卵の培養について研究が行われているが、ヤギでは材料の入手に制限がありヤギ卵子を用いた体外受精一培養についての報告は少ない。一般に、供試動物から一度に多数の成熟卵子を得るために姉馬血清性性腺刺激ホルモン（PMSG）などのFSH製剤の投与や、同時に黄体退行を引き起こすためにプロスタグランジンF<sub>2</sub>α（PG）の投与が行われている。しかしながら、動物種やホルモン製剤によって反応が異なることが知られている。そこで、本研究では、ヤギにおける省力的で簡易的な方法を確立するために、繁殖季節および非繁殖季節にPMSGおよびPGの効率的な投与方法について検討した。

方法：供試動物として本研究室で飼育中の日本ザーネン種雌ヤギを用いた。PMSGとしてセロトロピン（帝国臓器）を用い、1000 IUの1回あるいは500 IUの2回筋肉内投与を行った。PGはアナログ剤であるエストラメイト（住友製薬）を263 μg 1回筋注した。動物を発情周期に関係なく任意に4つの処置群に分けた。すなわち、群1はPG単独投与区、群2はPMSG-PGの同時投与区、群3はPMSGをPG投与の48時間前に投与する区および群4はPMSGをPG投与の48と24時間前に2回投与する区であった。実験は非繁殖季節の5月から6月と繁殖季節の9月から2月にかけて行った。PG投与後毎日発情を試情により検査した。動物の剖検は、PG投与後4日目に動物を屠殺してを行い、卵巣内の排卵点、大、中および小卵胞数を記録した。卵胞は、直径8mm以上のものを大、3mm以下のものを小とし、その中間のものを中卵胞と分類した。

結果：非繁殖季節に行った群1および群2では、発情出現率はそれぞれ25（3/12）と40%（2/5）であった。発情個体での平均排卵数は群1で2個、群2で5個であり、最大排卵数はそれぞれ3および7個であった。また、平均大卵胞数はそれぞれ0.3および4個で

あつた。繁殖季節に行った処置群の成績を Table 1 に示した。発情は PG 投与後 48 ないし 72 時間後に集中した。4つの処置群での発情出現率は群1で 100 (4/4)、群2で 83 (5/6)、群3で 83 (5/6) および群4で 0% (0/7) であった。一方、排卵点を示した頭数はそれぞれ 4/4、6/6、4/6 および 3/7 であった。平均排卵数は群1、2、3 および 4 でそれぞれ 2、6、9.3 と 3.7 個で、1頭での最大排卵数は 2、13、29 と 7 個であった。大、中および小卵胞数は処置群で大きな差は見られなかった。群3および4で一部に卵胞囊腫が観察された。

以上の結果から、成熟ヤギを発情周期を考慮せず任意に PMSG および PG で処置する場合、同時に投与することが効率的であることが示唆された。

### 主要文献

1. Moor, R.M., Kruip, Th.A.M. and Green, D. (1984) Theriogenology, 21:103-116
2. 浜野光市、佐々田比呂志、菅原七郎、正木淳二 (1985) 家畜繁殖学雑誌、31:32p-39p
3. Younis, A.I., Zuelke, K.A., Harper, K.M., Oliveira, M.A.L. and Brackett, B.G. (1991) Bio. Reprod., 44:1177-1182

Table 1. Follicular development after treatments with PMSG and PGF<sub>2</sub>α in the goat.

Treatment	Interval between treatments (h)	No. of does used	No. of ovulations on average (Maximum per doe)	No. of follicles per ovary		
				large (Max)	middle (Max)	small (Max)
PG	-	4	2 (2)	0 <sup>A</sup> (0)	6.1 <sup>A</sup> (15)	≤10(7) <sup>B</sup> >10(1)
PMSG-PG	0	6	6 (13)	1.7(5)	1.7(4)	≤10(7) >10(3)
PMSG-PG	-48	6	9.3 (29)	1.4(6)	0.5(3)	≤10(7) >10(5)
PMSG-	-48	7	3.7 (7)	1.1(3)	2.2(6)	≤10(8)
PMSG-PG	-24					>10(6)

A on average

B No. of ovaries evaluated

# 早発卵巣不全患者におけるGnRH agonistを用いた排卵誘発

## Induction of ovulation using GnRH agonist in patient with premature ovarian failure.

河野康志・櫛原久司・吉松 淳・松井尚彦・宮村研二・宮川勇生

Yasushi KAWANO, Hisashi NARAHARA, Jun YOSHIMATSU  
Naohiko MATSUI, Kenji MIYAMURA, Isao MIYAKAWA

大分医科大学産科婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology Oita Medical University

目的：早発卵巣不全（POF）は35歳あるいは40歳未満の続発性無月経で、gonadotropin高値、estrogen低値の閉経後と同じ内分泌動態を示す卵巣機能不全である。卵巣は病理学的にはほぼ正常の形態のものから萎縮状で、fibrousな間質からなるものまであり、原始卵胞の存在するものとしないものとに分類される。前者はgonadotropin resistant-ovary syndromeと呼ばれ治療により排卵、妊娠の可能性が残されているが、後者では生理的閉経後の卵巣と同じであり排卵は難しい。

従来、この両者の鑑別のために試験的卵巣切除が必要とされてきたが、卵巣の極く一部の切除では両側卵巣の全体を表現できず、かえって誤った診断になることや手術に伴う危険性、また、その後の治療方針が変わらないことから試験的卵巣切除は必ず

しも有用でない。我々は、非観血的に原始卵胞の存在を確認するためにGnRH agonist (GnRHa)を用いた方法を検討し、また原始卵胞が存在すると思われる症例に対して排卵誘発を試みた。

方法：年齢34～38歳で続発無月経および挙児希望を主訴として当科外来を

受診し、hypergonadotropic hypogonadism ( $LH > 18 \text{ mIU/ml}$ ,  $FSH > 55 \text{ mIU/ml}$ ,  $E_2 < 20 \text{ pg/ml}$ )を呈し、POFと診断された5症例を対象とした（図1）。Estrogen progestogen cyclic therapy (EPCT)による消退出血開始後3日目より4～8週間、GnRH (buserelin acetate)  $900 \mu\text{g/day}$  の投与を行い、投与中および投与中止後4～6週間、毎週LH, FSH, E<sub>2</sub>の測定、経腔的超音波断層法による卵胞径計測を行いながら経過を観察した。また、GnRHa

症 例	年 齡	G-P	LH (mIU/ml)	基 础 値 (mIU/ml)	E <sub>2</sub> (pg/ml)
1. K.Y.	38	0-0	45.9	72.5	15
2. K.N.	35	0-0	18.2	76.4	<10
3. T.Y.	35	0-0	18.5	106.7	<10
4. H.N.	34	0-0	18.0	68.6	<10
5. K.A.	36	2-1	37.3	92.7	18

図 1. 早発卵巣不全と診断した5症例

の投与中止後の内因性Gnの上昇に反応してE<sub>2</sub>の上昇が認められた症例に対しては、原始卵胞が存在するとして自然排卵を期待した。次周期では、月経後あるいは消退出血を起こし、GnRHa投与のもとにhMG-hCGにて排卵誘発を試みた。

成績：GnRHa投与中に、LH, FSHの値は低下し、5例中1例のみが、E<sub>2</sub> 50pg/ml以上となった。GnRHa投与中止後、5例中3例にE<sub>2</sub>の上昇が認められ、その3例中2例に経腔的超音波断層法で卵胞発育が確認できたが排卵には至らなかった。GnRHa投与のもとにhMG-hCG療法を行い排卵誘発を試み、このうちの1例に妊娠が確認されたが初期流産に終わった（図2）。

考察：POFにGnRHaを投与し、Gnを低下させ、投与中止後からの内因性Gnの上昇とそれに反応したE<sub>2</sub>の上昇を指標として、原始卵胞の有無の非観血的な確認を試みた。結果としてE<sub>2</sub>が50pg/ml以上上昇した症例では卵子の存在が示唆された。加えてPOFの一部には、Gnを低下させることにより卵巣機能が回復する症例が存在することを明らかにした。

このようにGnRHaを利用した方法を用いることで試験開腹術、腹腔鏡による観血的な卵巣組織診を避けることができ、また原始卵胞を確認できた症例に対しては排卵誘発を行うことで妊娠する可能性があり、今後症例を重ねて検討する必要性があると同時に、本法の有用性が期待される。

#### 主要文献：

1. 宮川勇生、山尾裕道、小池弘幸、他：早発閉経の内分泌学的研究、産婦人科の実際、1987;36(13):2045-2052
2. 宮川勇生、橋原久司：早発閉経の病因と治療、臨床婦人科産科、1991;45(4):472-474
3. Friedman, C. L., Barrows, H., and Kim, M. H.: Hypergonadotropic hypogonadism. Am. J. Obstet. Gynecol. 1983; 145:360-372
4. Aiman, J. and Smentek, C.: Premature ovarian failure. Obstet. Gynecol. 1985;66:9-14
5. Coulaam, C. B., Adamson, S. C., and Annegers, J. F.: Incidence of premature ovarian failure. Obstet. Gynecol. 1986;67:604-606

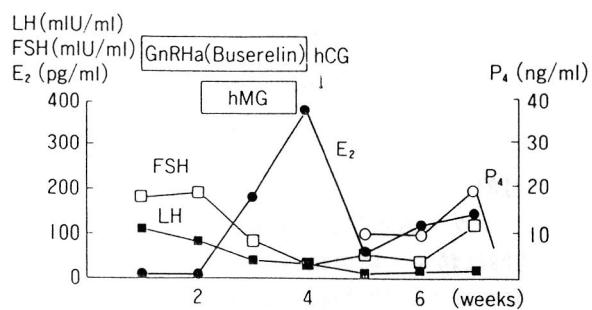


図 2. GnRH-hMG-hCG療法で排卵誘発に成功し妊娠したが、初期流産に終わった早発卵巣不全症例の経過

# マウス透明帯構成糖タンパク質ZP3の発現に関する 組織化学的解析

Molecular Cytochemistry of Mouse Zona Pellucida  
Component Protein (ZP3)

木村順平<sup>1</sup>・小瀬村伊久美<sup>2</sup>・佐藤嘉兵<sup>2</sup>・月瀬 東<sup>1</sup>・岡野真臣<sup>1</sup>

Junpei KIMURA<sup>1</sup>, Ikumi KOSEMURA<sup>2</sup>, Kahei SATO<sup>2</sup>, Azuma TSUKISE<sup>1</sup> and Masaomi OKANO<sup>1</sup>

日本大学農獸医学部獣医解剖学研究室<sup>1</sup>・動物細胞学研究室<sup>2</sup>

Department of Veterinary Anatomy<sup>1</sup> and Cell Biology<sup>2</sup>

College of Agriculture and Veterinary Medicine

Nihon University

## 目的

マウス透明帯は3種類の糖タンパク質ZP1, ZP2およびZP3より構成されている。このうちZP3は精子・卵の結合におけるprimary ligandとして働いていると考えられている<sup>1)</sup>。本研究ではこのZP3発現の卵成熟過程における消長について、ZP3cDNAをプローブに用いたin situ hybridization法およびZP3に対する单クローン抗体を用いた免疫組織化学により解析した。また精子リセプターとしてガラクトースあるいはマンノースなどの糖鎖が機能していることが示されているので<sup>2)</sup>、透明帯の糖鎖レベルでの解析もレクチン組織化学により行った。

## 方法

組織標本：胎齢14、17および生後1-24日齢のマウスの卵巢を摘出しカルノア氏液で固定後、常法に従いパラフィン切片とした。

In situ hybridization：プラスミドpGEM2にサブクローンングされたZP3.3cDNA(Dr. J. Deanより供与)を制限酵素EcoRIおよびHindIIIで切り出し、低融点ゲルにより電気泳動後、GELase<sub>TM</sub>を用いゲルからDNAを回収した。このZP3.3cDNAにランダムプライマー法により、ジゴキシゲニン標識し、パラフィン切片上で、15~17時間ハイブリダイズ後、アルカリワスクターゼあるいはペルオキシダーゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体を用いて、組織内ZP3mRNAの局在を可視化した。

免疫組織化学：抗マウスZP3单クローン抗体を用い、酵素抗体法間接法によりZP3の組織内局在を可視化した。

レクチン組織化学：ペルオキシダーゼ標識レクチニージアミノベンチジン法を上記パラフィン切片に適用した。用いたレクチンはConA, PNAおよびGS-Iである。

## 結果および考察

ZP3mRNAのシグナルは13日齢以前のマウス卵巢では、卵母細胞の核内に凝縮像として、また卵胞上皮細胞にも認められた。16日齢の卵巢の卵母細胞では細胞質に確認され、21日齢以降シグナルの認められる卵母細胞が増加し、誘起排卵処置を施した卵巢においては一切片上で観察される全ての卵母細胞細胞質にZP3mRNAのシグナルが認められた。また、卵胞上皮の最内層の細胞にもシグナルが認められる場合もあった。排卵された卵管内卵ではシグナルが認められなかった。抗ZP3抗体に対する陽性反応は胎仔期および生後1日齢迄の卵巢には認められず、3日齢から卵母細胞を取り囲む薄い透明帯にて陽性反応が出現した。

5日齢以降は卵の成熟に伴い陽性反応が増強し、卵母細胞細胞質や卵丘細胞の特に細胞間にも弱～中程度の陽性反応が観察された。排卵された卵管内卵においても透明帯に陽性反応が認められた。PNAおよびGS-Iにおいては、3日齢のいくつかの卵母細胞の透明帯および細胞質に弱～中程度の陽性反応が出現し、4日齢以降では透明帯に強い陽性反応を示し、細胞質でも弱陽性反応が観られた。ConAでは21日齢以降、微弱な反応が透明帯に観察されたが、それ以前の日齢では陽性反応は認められなかった。

以上の結果から、ZP3mRNAは13日齢～16日齢頃、卵母細胞の核から細胞質に移行し、卵成熟に伴い量が増え、その局在が卵母細胞に限局する事が示された。即ち、16日齢以降ではZP3は卵母細胞で合成される事が判明したが、3日齢～13日齢に存在するZP3の合成については今後の検討が必要と思われた。また、透明帯におけるガラクトースなどの糖鎖の出現はほぼZP3の出現と同調していることが示された。

### 参考文献

- 1) Wassarman P. M. (1992) Mouse Gamete Adhesion Molecules. Biol. Reprod. 46. 2. 186-191.
- 2) Tulsiani D.R.P., Nagdas S.K., Cornwall G.A. and Orgebin-Crist M-C. (1992) Evidence for the Presence of High-Mannose/Hybrid Oligosaccharide Chain(s) on the Mouse ZP2 and ZP3. Biol. Reprod. 46. 1. 93-100.

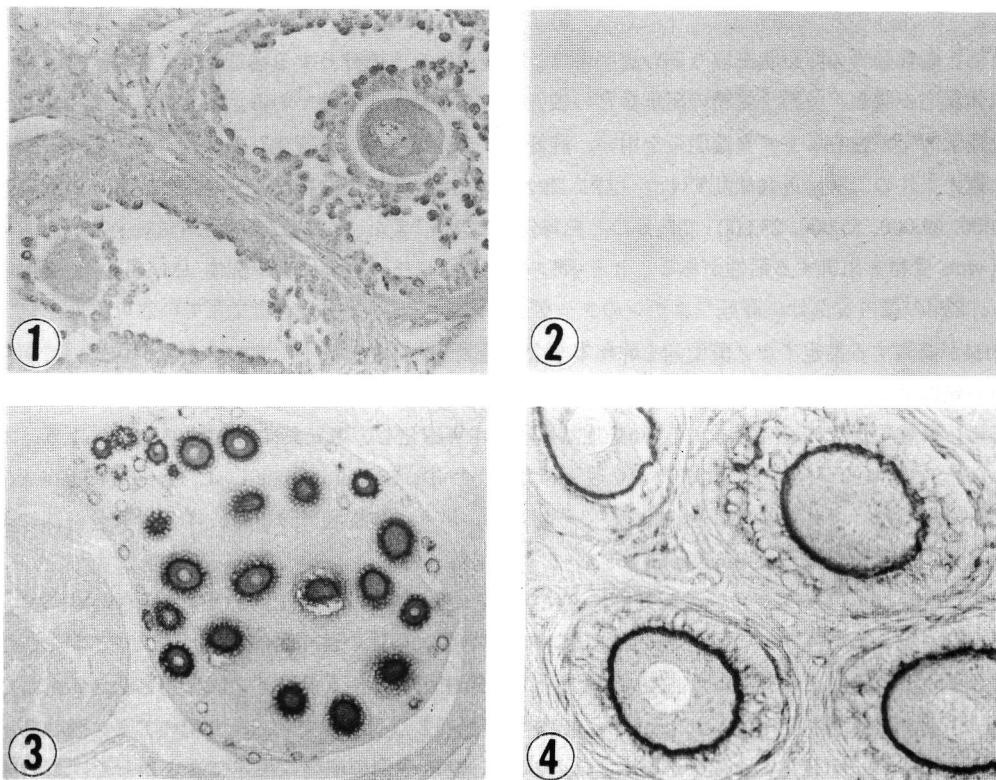


Fig. 1 & 2 : In situ hybridization of 24-day-old mouse ovary section with (Fig. 1) and without (Fig. 2) digoxigenin labeled ZP3cDNA. x320.

Fig. 3 : Immunohistochemical staining of 13-day-old mouse ovary section with anti mZP3 monoclonal antibody. x125.

Fig. 4 : PNA staining of 16-day-old mouse ovary section. x500.

# ブタ透明帯糖質蛋白質(ZP4)のアミノ酸配列について

## Amino Acid Sequence Analysis of a Porcine Zona Pellucida Glycoprotein (ZP4)

長谷川昭子・井上みゆき・香山浩二・磯島晋三

Akiko HASEGAWA, Miyuki INOUE, Koji KOYAMA, Shinzo ISOJIMA

兵庫医科大学産科婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology, Hyogo Medical College

【目的】哺乳動物の卵細胞を取り囲む透明帯は、糖蛋白質を主成分とする構造物で、受精の際、精子の接着、先体反応の誘起、多精子受精の阻止などの機能をもつことが知られている。我々は以前より、ヒト透明帯と免疫学的交差性を示すブタ透明帯を用い、避妊ワクチンへの応用を研究してきた。その結果、ブタ透明帯は、還元条件の二次元電気泳動で4つ(ZP1, ZP2, ZP3, P4)の糖蛋白質群に分離され、各々の平均分子量は92,000, 69,000, 55,000, 23,000であることを報告した(1)。また、ZP1とZP3とZP4に対する抗血清に、ヒトの*in vitro*受精を阻害する活性があることを示し(2)、さらにモノクローナル抗体(MAb-5H4)を用いた実験から、ZP4の蛋白質部分に避妊ワクチンのターゲットとして有効な成分が含まれている可能性を見い出し、MAb-5H4が認識する推定アミノ酸配列を昨年本学会で発表した(3)。今回、ZP4の全配列について明らかにしたので報告する。

【方法】単離したブタ透明帯を70°C、30分加熱処理して可溶化し、還元条件のSDS-PAGEにより、ZP4を精製した。S-Sをピリジルエチル化法により還元した後、CNBr, Endoproteinase LysC, Endoproteinase AspNを用いて断片化した。生じた断片は逆相HPLCで分離した。アミノ酸配列の分析は、エドマン分解法による気相式シーケンサー(Applied Biosystems 477A)を用いて行った。

【結果】精製ZP4のN末端アミノ酸配列はエドマン分解による解析から、IGVNQLV...とGVNQLVN...の配列を含んでいることが明らかになった。しかしこの2種の配列の違いはN最末端にI(イソロイシン)が存在するかしないかの違いだけであった。ZP4を断片化し、断片化ペプチドのアミノ酸配列をalignmentした結果、Fig 1-(a)に示す配列が得られた。No.1からNo.110までの配列と二重下線で示した9個のアミノ酸残基からなる配列にはオーバーラップする部分がなく、この2つのペプチド間の配列は決定できなかった。この未決定配列は、合成DNAプローブを用いて、ブタ卵巣cDNAライブラリーからPCRを行うことにより推定した。その結果、増幅したDNA配列から、これら2つのペプチドにオーバーラップする配列が得られ、peptide mappingで得られなかつたアミノ酸配列はFig 1-(b)にドットで示す配列であることが明らかになった。

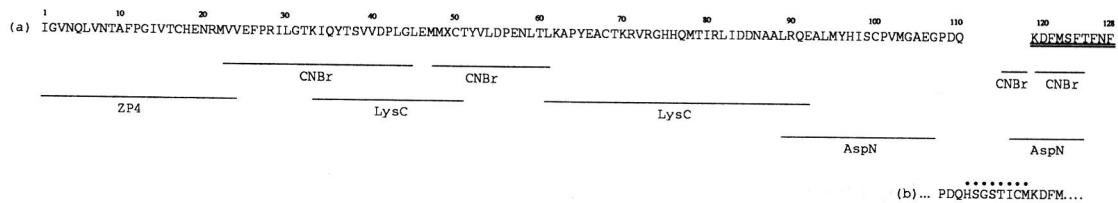


Fig 1 Alignment of amino acid sequences of porcine ZP4 peptide fragments

- (a) Amino acid sequence obtained from peptide mapping
- (b) Amino acid sequence deduced from DNA sequence

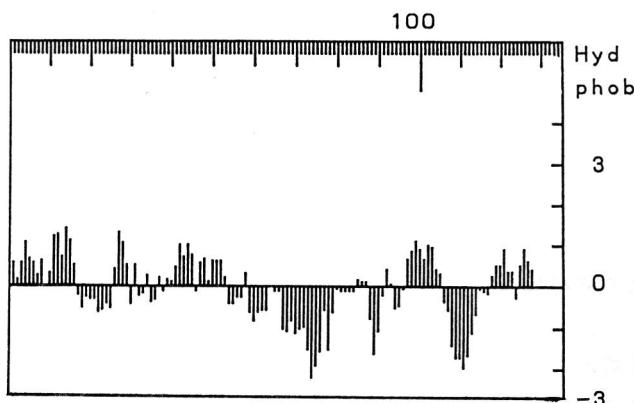


Fig 2 Hydropathicity plot of porcine ZP4

【考察】今回決定した128アミノ酸残基の配列は、分子量14,579で、従来SDS-PAGEで求めていた値とは一一致し、現在のところこれがZP4の全アミノ酸配列であると考えられる。Hydropathicity plotからは、No.70-No.79とNo.106-No.114に比較的強い親水領域が認められ(Fig 2) 二次構造の予測からは、いくつかの局所的なhelix, sheet構造が存在することが示された。この配列はすでに報告されている(4)マウスのZP2のアミノ酸配列と40%の相同意を示した。

【文献】

- (1) Koyama, K., Hasegawa, A. and Isojima, S. (1991) Further characterization of the porcine zona pellucida antigen corresponding to monoclonal antibody (3A4-2G1) exclusively cross-reactive with porcine and human zonae pellucidae. *J. Reprod. Immunol.* 19:131-148.
  - (2) Hasegawa, A., Koyama, K. and Isojima, S. (1991) Isolation of four major glycoprotein families (ZP1, ZP2, ZP3, ZP4) of porcine zona pellucida and characterization of antisera raised to each glycoprotein family. *Acta Obst. Gynaec. Jpn.* 43(2):221-226.
  - (3)長谷川昭子、井上みゆき、香山浩二、磯島晋三 (1991) 受精阻害抗透明帯モノクローナル抗体 (5H4) が認識するペプチドのアミノ酸配列について 哺乳卵学誌 8(1):79-80
  - (4) Liang, L., Chamow, S. M. and Dean, J. (1990) Oocyte-specific expression of mouse ZP-2: Developmental regulation of the zona pellucida genes. *Mol. Cell Biol.* 10(4):1507-1515.

ニホンハタネズミ精子のマウス及びハムスター  
卵子透明帯通過について

On the ability of vole spermatozoa to pass through  
the zona pellucida of mouse and hamster ova.

若山照彦・正田陽一・

圓山悠子\*・小泉伸夫\*・今村憲吉\*・福田勝洋\*

T. Wakayama, Y. Shoda,

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

茨城大学農学部 \*家畜衛生試験場

Faculty of Agriculture, Ibaraki University,

\*National Institute of Animal Health

目的：哺乳動物の種特異的な卵子と精子の相互作用は、体外受精技術の発達により直接調べられるようになった。その結果同科別属間では受精は起こりうるが、別亜科間以上はなれると精子は卵子透明帯をほとんど通過出来なくなるとされ、わずかにシロアシネズミ精子だけがラット卵子(14%)<sup>1)</sup>およびマウス卵子(20~21%)<sup>2)</sup>の透明帯を通過したと報告されている。我々はこれまでに、ニホンハタネズミ(*Microtus montebelli*) 精子がマウス及びハムスター卵子透明帯を高率に通過できる知見を得た<sup>3)</sup>。今回、ニホンハタネズミ精子のマウス及びハムスター卵子透明帯通過について詳細に検索した。

方法：卵子は過排卵させたマウス及びハムスターの卵管膨大部を流動パラフィン下で裂いて取り出し、 $100\mu l$ のラットの受精用培地mKRB<sup>4)</sup>内に導入した。卵子の一部はヒアルロニダーゼで顆粒細胞を除去した。精子は家畜衛生試験場で繁殖維持しているニホンハタネズミの精巢上体尾部を切開して取り出し、 $100\mu l$ のmKRB内に導入した。精子濃度を測定後、前培養は行なわず、最終精子濃度が $2 \times 10^7/ml$ になるように卵子の入った培地に $5\sim 10\mu l$ を添加した。媒精された卵子は $37^\circ C$ 、 $5\%CO_2$ - $95\%air$ の条件下で、マウス卵子では2, 4, 6, 8時間、ハムスター卵子では4, 8, 12, 22時間培養した。培養後団卵腔内の精子の存在を倒立位相差顕微鏡下で確認し、2.5%グルタルアルデヒド-10%中性ホルマリン溶液で固定後0.25%アセトラクモイドで染色して前核の有無を確認した。

結果：マウス及びハムスター卵子団卵腔内へのニホンハタネズミ精子の侵入の経時的变化を表に示す。マウス卵子への侵入は媒精2時間後から見られ、時間の経過と共に一定の割合で増加し、8時間後には100%近く侵入した。顆粒細胞を除去すると侵入時間は短くなった。ハムスター卵子への侵入は媒精8時間後から観察されたが、22時間後でも卵子への侵入は56%にすぎなかった。しかし顆粒細胞を除去すると4時間後から侵入がみられ22時間後には100%侵入した。マウス、ハムスターのいずれの卵子においても、精子の侵入はすべて多精子侵入になり、団卵腔内に多数の精子が存在していた。染色後2個以上の前核を有する卵子はマウスでは7個(媒精8時間後、3%)、ハムスターでは73個(媒精22時間後、団卵腔への侵入

Penetration of perivitelline space of mouse and hamster eggs  
by Japanese field vole spermatozoa

Species of eggs	Treatment	No. of penetrated eggs / No. of eggs examined (%)					
		Incubation time (h)					
		2	4	6	8	12	22
Mouse	Intact	45/200 (22.5)	95/228 (41.7)	160/236 (67.8)	217/226 (96.0)		
	Cumulus free	27/49 (55.1)	27/51 (52.9)	40/44 (90.9)	48/49 (98.0)		
Hamster	Intact		0/68 (0.0)		10/61 (16.4)	5/43 (11.6)	20/36 (55.6)
	Cumulus free		3/53 (5.7)		59/82 (72.0)	42/49 (85.7)	25/25 (100.0)

は確認せず染色だけ行なった。41%) 確認されたが、精子が細胞質内に侵入した証拠となる精子尾部や膨化精子頭部は観察されなかった。

考察：同種間で体外受精を行なうと大部分の卵子では一定時間内に精子が侵入し<sup>5)</sup>、透明帯反応 (Zona reaction) により多精子侵入はあまり起こらず、顆粒細胞を除去すると受精率が低下することが知られている<sup>6)</sup>。我々はニホンハタネズミ精子が強い運動性を持つことを明らかにしたが<sup>7)</sup>、今回の観察からニホンハタネズミ精子は別亜科のマウス及びハムスター卵子透明帯をほぼ 100% 通過でき、その全てが多精子侵入で、個々の卵子への侵入時間が大きく変異し、顆粒細胞の存在により侵入が妨害されることが認められた。こうしたことからニホンハタネズミ精子のマウス及びハムスター卵子透明帯通過は同種間の正常な受精とは異なり、透明帯反応がニホンハタネズミ精子の侵入に対して生じないのか、あるいは透明帯反応が生じてもニホンハタネズミ精子の強い運動性により強引に侵入して多精子侵入になったものと考えられる。

#### 参考文献

- 1) Hanada, A. and C. Chang, (1978). J. Exp. Zool. 203:277-286.
- 2) Fukuda, Y., M. B. Maddock, and M. C. Chang, (1979). J. Exp. Zool., 207:481-490.
- 3) 若山照彦・正田陽一・圓山悠子・小泉伸夫・今村憲吉・福田勝洋. (1991). 草食家畜用実験動物, 16:29-33.
- 4) Toyoda, Y. and C. Chang. (1974). J. Reprod. Fert., 36:9-22
- 5) 豊田裕・横山峯介・星冬四郎. (1971). 家畜繁殖誌, 16:152-157.
- 6) Itagaki, Y. and Y. Toyoda, (1991). J. Mamm. Ova Res., 8:126-134.
- 7) 若山照彦・正田陽一・圓山悠子・小泉伸夫・今村憲吉・福田勝洋. (1991). 第84回日畜学会講演要旨, P30.

# 卵丘除去マウス卵子の体外受精に及ぼす 豚卵胞液画分の効果

Effect of a fraction from porcine follicular fluid on in vitro  
fertilization of mouse eggs after removal of cumulus oophorus

石川和男・F.P.DAEN・内藤邦彦・豊田裕

Kazuo ISHIKAWA,F.P.DAEN,Kunihiro NAITO,Yutaka TOYODA

東京大学医科学研究所獣医学研究部

Department of Animal Pathology, Institute of Medical Science, University of Tokyo

**目的：**卵丘除去マウス卵子の体外受精では、排卵後の未処理卵子のそれに比べ受精率が低下し、変動も大きいことが知られている<sup>1)</sup>。この受精成績向上のために低濃度のヒアルロニダーゼで穏やかな裸化処理を行う、または、受精用培地のカルシウム濃度を高めることが有効であることが板垣ら<sup>2)</sup>によって示されているが、受精における卵丘細胞層の役割について十分に明かにされていない。

一方、豚卵胞液が卵子成熟促進作用、特に雄性前核形成能を高める作用を有することが内藤ら<sup>3)</sup>によって示されているが、最近、当研究室において、卵胞液を超遠心処理した最上層の画分に有効因子が含まれていることが明かにされた。(DAENら、未発表)

そこで本実験ではこの画分を卵丘除去マウス卵子の体外受精に応用することを試み、その効果について検討した。

**方法：**雌雄とともにICR成熟マウスを用いた。雌マウスはPMSGおよびhCGを7.5IUずつ48時間間隔で腹腔内投与し、過排卵を誘起した。hCG投与後15~16時間にそれぞれの雌マウスを頸椎脱臼で殺し、卵管より卵丘細胞層に包まれた卵子塊を取り出し、ヒアルロニダーゼ150IU/mlを含むTYH培地に導入した。卵丘が分離し始めたところで卵子をガラス毛細管ビペットで拾いあげ、TYHで3回洗浄し、TYHと豚卵胞液画分を10%含むTYHとに分配し、30分間インキュベーター(37°C, CO<sub>2</sub>: 5%)に放置した。続いて、TYHで2時間以上前培養した精巣上体精子を添加した。添加量は150~200/ $\mu$ lの範囲とした。精子添加後6時間以降にホールマウント標本を作成し前核の形成により受精判定をした。豚卵胞液は37000rpm, 48時間の超遠心処理により4層に分画し、そのうち最上層の画分を用いた。

**結果：**Table 1に示すとおり12個体の結果のいずれも、TYHのみで受精させた区よりも、受精用培地に豚卵胞液画分を加えた区のほうが受精率が高く、全体では前者の56.9%に対して後者の86.3%の値が得られた。受精率の範囲は前者で25.0%~86.7%、後者は

55.6%~100.0%であった。また、TYHのみで受精させた区の卵子の透明帯には多数の精子が付着していたが、受精用培地に豚卵胞液画分を加えた区ではそれがほとんど見られなかった。多精子受精の割合は、TYHのみで受精させた区で6.9%、豚卵胞液画分を加えた区で4.4%であった。

**Table 1 In vitro fertilization of mouse denuded oocytes in TYH or TYH with a fraction of porcine follicular fluid**

Mouse	No. of eggs inseminated in					
	TYH			TYH with a fraction of porcine follicular fluid		
	examined	fertilized	poly- spermic	examined	fertilized	poly- spermic
1	29	16 (55.2)	0	28	22 (78.6)	1
2	14	5 (35.7)	0	20	18 (90.0)	0
3	14	5 (35.7)	3	21	19 (90.5)	1
4	10	3 (30.0)	0	9	6 (66.7)	0
5	6	5 (83.3)	0	9	8 (88.9)	1
6	6	3 (50.0)	0	5	3 (60.0)	0
7	7	4 (57.1)	0	9	9 (100)	1
8	4	1 (25.0)	0	9	5 (55.6)	0
9	11	9 (81.8)	3	12	11 (91.7)	1
10	7	5 (71.4)	0	12	10 (83.3)	2
11	15	13 (86.7)	0	21	20 (95.2)	0
12	30	18 (60.0)	0	28	27 (96.4)	0
Total	153	87 (56.9)	6	183	158 (86.3)	7

**考察：**豚卵胞液画分が卵丘除去マウス卵子の受精率向上に有効であることが確認された。卵丘内には受精に対して促進的に働く物質の存在が推定される。今後その物質の正体に迫ってゆこうと思う。

#### 主要文献：

- 1) 板垣佳明,東貞宏,R.B.Abdullah,豊田裕(1989):  
マウス卵子の体外受精における卵丘細胞層の役割の再評価,哺乳卵研誌,6,59~60
- 2) 板垣佳明,豊田裕(1991):  
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,哺乳卵学誌,8(2),126~134
- 3) Naito,K.,Fukuda,Y. and Toyoda,Y.(1988)  
Effects of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured in vitro  
Gamete Res.,21,289~295

# Epidermal growth factor (E G F) のマウス胚 DNA および RNA 合成に及ぼす影響

Effects of epidermal growth factor on DNA and RNA  
synthesis in mouse embryos

高尾成久・原田省・大野原良昌・見尾保幸・寺川直樹

TAKAO Naruhisa, HARADA Tasuku, ONOHARA Yoshimasa,  
MIO Yasuyuki, TERAKAWA Naoki

鳥取大学医学部産科婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology, Tottori University School of Medicine

[目的] 細胞成長因子は胎児発育に重要な役割をになっていることが知られているが、着床前初期胚においても、その発生・分化を制御している可能性が示唆されている。本研究では、Epidermal growth factor (EGF) がマウス初期胚に及ぼす影響をDNA およびRNA 合成を指標として評価した。

[方法] B6C3 F<sub>1</sub> 雌マウスに、PMS-hCG で過排卵処理を行い、同系の雄と交配後、hCG 注射から44時間後に2細胞胚を卵管より採取した。2細胞胚は 0、0.1、1、5、10、20、または 50ng/ml の EGF を含む BWW 培養液中 (BSA 1mg/ml 添加) で 5%CO<sub>2</sub> in Air にて、48時間培養し、胚盤胞へ発育後、[<sup>3</sup> H] thymidine (50 μCi/ml) あるいは [<sup>3</sup> H] uridine (50 μCi/ml) を含む BWW 培養液中で 4時間培養した。[<sup>3</sup> H] thymidine および [<sup>3</sup> H] uridine の取り込み値 (incorporation) は前回の報告に準じて 3 から 5 個ずつ液体シンチレーションカウンターにて測定した。なお、各測定値はそれぞれ [<sup>3</sup> H] ラベルした前駆物質中の培養 0 時間値を差し引いて算出した。

[結果] 胚盤胞の thymidine 取り込みは、1、5、10、20ng/ml の EGF 添加で、EGF 無添加に比較して有意に促進された。他方、uridine 取り込みは 10ng/ml の EGF 添加でも促進されず、逆に 20 または 50 ng/ml の EGF 添加で有意に抑制された (Table 1)。

Table. 1 Effect of EGF on thymidine and uridine incorporation in mouse embryos

EGF (ng/ml)	Incorporation (dpm/embryo) of	
	Thymidine	Uridine
0	1800 ± 112	4682 ± 275
0.1	1775 ± 164	ND
1	2099 ± 106**	ND
5	2112 ± 114**	ND
10	2118 ± 121**	4551 ± 380
20	2258 ± 124*	2827 ± 118*
50	2071 ± 126	2981 ± 207*

Values are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM).

\*\*:p<0.05, \*:p<0.01 (vs EGF 0), ND: not determined

〔考察〕 本実験で、1から20ng/ml濃度のEGFがマウス胚のDNA合成を促進すること、さらに20および50ng/mlの高濃度のEGFが胚のRNA合成を抑制する事を明かにした。Colverらは、各種成長因子の着床前胚に対する作用を、2細胞期から胚盤胞への発育と胚盤胞の細胞数を指標として評価し、その効果が見られなかったと報告している。一方、Woodらは、本研究と同様の濃度のEGFが胚の蛋白合成を促進することを報告している。この結果は今回の我々のRNA合成の結果と矛盾するがその理由は明かでない。今後さらに胚におけるEGF受容体の証明およびその発現時期とDNA合成促進作用との関連を検討することが必要と考えられる。

#### 〔主要文献〕

1. 原田省、谷川正浩、大野原良昌、見尾保幸：体内および体外発育マウス胚におけるDNA・RNA合成の検討。哺乳動物卵子学会誌 8巻 1号：61，1991。
2. Colver RM et al: Influence of growth factors in defined culture medium on in vitro development of mouse embryos. Fertil Steril, 55, 194, 1991.
3. Wood SA and Kaye PL: Effects of epidermal growth factor on preimplantation mouse embryos. J Reprod Fertil, 85, 575, 1989.

# 卵管液中基質濃度とラット受精卵の体外培養

In vitro development of rat 1-cell embryos in chemically defined media modified with substrate in oviductal fluids.

松本浩道 · 菅原七郎

Hiromichi MATSUMOTO, Shichiro SUGAWARA

東北大学農学部 家畜繁殖学教室

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

【目的】哺乳動物受精卵を 1細胞期から体外で培養すると発生が停止する。この時期は動物種によって異なり、ラットでは 2-4細胞期におきる。この発生阻害の原因については多くの報告があり、解除するためのいくつかの方法があげられている。しかし、ラットでは他の種に比べ研究が少なく、1細胞期からの体外培養系は確立されていない。そこで本研究では、受精卵子の体内環境である卵管液中の基質濃度を測定し、それに基づいた培養液を作製してラット 1細胞期胚の体外培養を試みた。

【方法】供試動物として本研究室で系統維持されているWistar系成熟ラットを用いた。正常な 4日周期を示した雌を発情前期の夕方に雄と同居させ、妊娠させた。腔栓またはスメア中の精子の存在の確認した日を妊娠第 1 日とした。1 細胞期胚は妊娠第 1 日目の12:00-13:00hに卵管を灌流することにより回収した。回収した胚は0.2%ヒアルロニダーゼ-PBS(-)液で処理し顆粒膜細胞を除去した。卵管の灌流および回収卵の洗浄はPBS(-)で行った。胚は発生用培養液で 3回洗浄し、ミネラルオイルをかぶせた 0.1mlのドロップ中で培養した。基礎培養液は Czbとアミノ酸を MEM amino acidsにおきかえた HECM-1を用いた。演者らが先に測定した妊娠第 1 日目のラット卵管液中の乳酸、ピルビン酸およびグルコースの濃度はそれぞれ 179.93、44.57および9.14mMで、相対比 ( Rat Oviductal Fluid Ratio、ROF ) は 1:0.248:0.051であった(第85回日畜講演要旨)。発生培地は基礎培養液の乳酸濃度を原法と同じにし、ROFに基づき他の 2つの基質濃度を修正した。また、乳酸、ピルビン酸およびグルコースの比を 0.051:0.248:1としたものをROF(-)とし、基礎培養液のピルビン酸濃度をHECM-1では 0.5mM、Czbでは0.27mMにし、他の 2つの基質濃度を調整した発生培地を用いた。control区は原法の基質濃度を用いた。培養条件は37.5°C、5%CO<sub>2</sub>-95%airとし、発生段階を24時間ごとに観察し記録した。

【結果】 Czbを基礎培養液とした場合、ROF区では 4細胞期への発生がみられたが (3/40)、桑実胚期以降へは発生せずROF(-)区および control区では発生しなかった(それぞれ、0/32、0/40)。

HECM-1を基礎培養液とした場合の結果は Table 1に示した。全ての区で 4細胞期へ発生し、低率な

がら胚盤胞への発生もみられた。しかし、基質濃度を修正した ROF区およびROF(-)区では 4細胞期への発生率はいずれも control区よりも低かった。

Table 1. Effect of modification of the substrates in HECM-1 on in vitro development of rat 1-cell embryos.

Medium	No. of 1-cell embryos used	No. of embryos developed to		
		≥4-cell at 96hr	≥morula at 120hr	blastocyst at 144hr
ROF	88	10(11.4) <sup>a</sup>	4( 4.5)	1( 1.1)
ROF(-)	82	5( 6.1) <sup>a</sup>	4( 4.9)	2( 2.4)
control	120	27(22.5) <sup>b</sup>	8( 6.7)	5( 4.2)

The parentheses in columns indicate % estimated from No. of embryos used.

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

【考察】ラット卵管液中基質濃度をもとに修正した培養液での 1細胞期胚の発生能を検討した。その結果、 ROFの効果は基礎培養液により異なった。すなわち、HECM-1を基礎培養液とした場合 control区で 4細胞期までの発生がみられ、低率ながら胚盤胞へも発生した。しかしながら、今回用いた基質濃度を修正した ROF区およびROF(-)区では発生率の改善はみられなかった。一方、CZBを基礎培養液とした場合、control区と異なり ROF区で 4細胞期への発生がえられ、基質修正による発生率の向上がみられた。グルコースを除去した基礎培養液を用いることにより、ハムスターでは発生阻害の解除、マウスでは発生率が向上することが報告されている。しかし、本研究では基礎培養液にHECM-1を用いた ROF区およびROF(-)区では、グルコースを含むにもかかわらず胚盤胞への発生がみられた。このことから発生阻害の機構を解明するうえで、ラット受精卵の初期発生に対する基質の作用については今後更なる検討が必要であると思われる。また、CZBでは ROF区の結果がHECM-1と異なったことから、他の成分、リン酸等の無機塩類、アミノ酸などについて検討が必要であることが示唆された。

- 【文献】1) 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., 39, 1183-1192.  
 2) Chatot, C. L., Ziomeck, 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.  
 3) 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一, 哺乳卵学誌, 8, 21-26.

# ハムスター体外受精胚における 2-cell block 現象起因因子の検討

Analysis of factors causing two-cell block to development of cultured hamster embryos fertilized in vitro

中山貴弘・野田洋一・馬岡 陽・森 崇英

Takahiro NAKAYAMA, Yoichi NODA, You UMAOKA  
Takahide MORI

京都大学医学部婦人科産科学教室

Department of Gynecology and Obstetrics Faculty of Medicine, Kyoto University

**目的：**ハムスターは *in vitro* 胚培養において 2 細胞期および 4 細胞期に極めて厳しく胚発生停止が成立する系として知られ、これまで体外受精胚において 4 細胞期胚への発生の報告は認められない。われわれはこれまでに、マウスやラット胚において低酸素気相下培養や SOD 添加培養の胚発生促進効果を確認し、初期胚培養において酸素毒性から胚を保護することは種をこえて必要であることを指摘してきた<sup>1)</sup>。今回、このような観点からハムスター体外受精胚において 2-cell block 現象の解除を試みると同時に、2-cell block 現象起因因子について検討を行った。

**方法：**培養液として、精子の capacitation および体外受精には Modified Tyrode's solution (TALP-PVA) を用いた。また Sperm motility 維持のため PHE (D-penicillamine 20 μM, Hypotaurine 100 μM, Epinephrine 1 μM) を添加した<sup>2)</sup>。受精胚の培養には HECM1<sup>3)</sup> と TALP-PVA に 4 種のアミノ酸 (Glutamine 1.0 mM, Isoleucine 0.2 mM, Methionine 0.05 mM, Phenylalanine 0.1 mM) を添加したもの<sup>2)</sup> の 2 種類を使用し、両者における胚発生率の差を検討した。精子は成熟雄の精巣上体尾部より採取し、懸濁液を作成の後、5% CO<sub>2</sub>, in air, 37°C にて 3.5 時間 Capacitration を行った。また 膨脹の確認された 6 から 8 週齢の雌に、PMSG 20 IU および HCG 25 IU を 57 時間間隔で 腹腔内投与し過排卵処理を行った。HCG 投与 18 時間後に卵管膨大部を Scratch し、胚を採取した。これを体外受精培養液に移し、媒精を行った。この間の時間（採卵所要時間）を 3 分または 10 分に設定し、胚発生効率を検討した。体外受精胚は培精 96 時間後まで培養を行った。これらの操作は 2 種類の 培養気相、すなわち 基本気相 (5% CO<sub>2</sub>, in air, 37.0°C) と 低酸素気相 (5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>, 37.0°C) にて行い、両者において胚発生効率を検討した。この間、培精後 4 時間、24 時間、48 時間、72 時間に胚観察操作を行い、操作が胚発生効率に及ぼす影響について検討した。観察にはオリンパス IMT-2 倒立型顕微鏡を用い、観察時間は 1 分とした。観察板における光度は、顕微鏡光源より 14000 lux, 室内燈光源より 540 lux であった。

**結果：**表1に培養気相と採卵所要時間が胚発生効率に与える影響を示した。低酸素気相下培養でしかも採卵所要時間が3分の場合にのみ、120個中10個(8%)の胚において2-cell block現象が解除され4細胞期胚への発生が認められた。培養中の胚観察操作の影響を表2に示した。媒精後4時間の前核期に初回の観察を行った群では2細胞期胚への発生率は94個中2個(2%)と、この時期に観察を行わなかった他の4群に比べ低率であり、以後の胚発生も認められなかった。媒精後24時間の2細胞期に初回の胚観察を行った群では2細胞期で胚の発生は停止し、同様に、4細胞期、8細胞期においても初回の胚観察を行ったstageで胚発生は停止した。以上より、観察操作による胚発育抑制効果が示唆された。培養液の影響を表3に示した。培精48時間後にHECM-1では4細胞期胚への発生が認められたのに対し、TALP-PVAでは4細胞期胚へ発生したものではなく、厳格に2-cell block現象が発生した。

**考察：**2-cell block現象起因因子として培養気相、採卵および胚観察時の光刺激、培養液成分の関与が明らかとなった。この中でも光刺激は光増感と呼ばれる過程によってO<sub>2</sub> radicalを発生し、これを介した細胞毒性効果が、すでに確認されている<sup>4)</sup>。培養液成分については以前よりそのblock現象への関与が指摘されてきたが、今回、新たに明らかにされた低酸素気相下培養、光刺激からの胚の保護の有効性はいずれも酸素毒性からの胚の保護という観点から説明が可能であり、ハムスターに限らず、初期胚発生に重要な意義を持つものと思われる。

#### 主要文献：

1. Noda, Y., Matsumoto, H. and Mori, T.: Involvement of superoxide radicals in mouse 2-cell block phenomenon. *Molec. Reprod. Devel.* 1991;28:356-360.
2. Bavister, B.D.: A consistently successful procedure for in vitro fertilization of golden hamster eggs. *Gamete Res.* 1989;23:139-158.
3. Schini, S.A. and Bavister, B.D.: Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. *Biol. Reprod.* 1988;39:1183-1192.
4. Peak, J.G., Peak, M.J. and MacCoss, M.: DNA breakage caused by 334-nm ultraviolet light is enhanced by naturally occurring nucleic acid components and nucleotide coenzymes. *Photochem.* 1984;39:713-716.

表1 ハムスター体外受精胚発生に及ぼす培養気相と採卵所要時間の影響

培養 <sup>a</sup> 気相	採卵所要 時間(分)	実験 回数	培養 胚数	発生胚数 (%)	
				2-cell	4-cell
基本気相	3	10	116	39(34)	0
	10	10	118	31(26)	0
低酸素気相	3	10	120	42(35)	10(8)**
	10	10	117	29(25)	0

媒精48時間後に判定。培養液：HECM-1。

<sup>a</sup> 基本気相：5%CO<sub>2</sub> in air, 37.0°C.低酸素気相：5%CO<sub>2</sub>, 5%O<sub>2</sub>, 90%N<sub>2</sub>, 37.0°C.\*\* : P < 0.01 ( $\chi^2$  test).

表2 ハムスターの体外受精胚発生に及ぼす胚観察操作の影響

観察 回数	初回観察時の 胚発生段階	実験 回数	培養 胚数	胚発生数 (%)			
				2-cell	4-cell	8-cell	>8-cell
4	前核期	7	94	2(2)**	0*	0	0
3	2-cell	7	98	30(31)	0*	0	0
2	4-cell	7	102	26(25)	7(7)	0	0
1	8-cell	4	81	23(28)	5(6)	4(5)	0
0	>8-cell	4	79	24(30)	5(6)	3(4)	0

採卵所要時間 3分。低酸素気相下培養：5%CO<sub>2</sub>, 5%O<sub>2</sub>, 90%N<sub>2</sub>。

培養液：HECM-1。

観察における光度 室内燈光源：540lux

顕微鏡光源：14000lux

\*\*\* : P < 0.001. \* : P < 0.05 ( $\chi^2$  test).

表3 ハムスターの体外受精胚発生に及ぼす培養液の影響

培養液	実験 回数	培養 胚数	胚発生数 (%)			
			2-cell	4-cell	8-cell	>8-cell
HECM-1	4	79	24(30)	5(6)	3(4)	0(0)
TALP-PVA (4種アミノ酸素添加)	6	96	25(26)	N.D.	0(0)	0(0)

採卵所要時間 3分。低酸素気相下培養：5%CO<sub>2</sub>, 5%O<sub>2</sub>, 90%N<sub>2</sub>。

胚観察操作省略。

N.D.: not significant. \* : P < 0.05 ( $\chi^2$  test). 媒精96時間後に判定。

# ミドリザルの卵胞発育誘起と体外受精

Superstimulation and in Vitro Fertilization  
in the African Green Monkey (*Ceropithecus aethiops*)

山海 直、井田 聰\*、若林庸夫\*、長 文昭

Tadashi SANKAI, Satoshi IDA\*, Tsuneo WAKABAYASHI\*, Fumiaki CHO

国立予防衛生研究所・筑波医学実験用霊長類センター

Tsukuba Primate Center for Medical Science,  
The National Institute of Health

\*エーザイ(株)・実験動物研究センター

Laboratory Animal Research Center, Eisai Co. Ltd.

目的：サル類における体外受精は、約200種いるサルのうち、リスザル、ヒヒ、カニクイザル、アカゲザル、チンパンジーの5種類で成功しているに過ぎない。発生工学的手法は、すべてのサル種に共通のものではなく、それぞれの種に適した方法を開発することが肝要である。国立予防衛生研究所・筑波医学実験用霊長類センター（TPC）では、実験用サル類の開発、疾患モデルサル類の開発、あるいは野生サル類の遺伝子保存などを目的として、カニクイザルを用いて発生工学的検討を進めてきた。今回は、カニクイザルと同様に繁殖に季節性がなく月経周期が33±8日のミドリザルを用いて卵胞発育誘起、体外受精を試みた。

方法：実験動物には、TPCで繁殖・育成された6～10才のミドリザル5例を用いた。ミドリザルは、メンス時の出血量が少ないため、連日、ケタミンによる全身麻酔下で陰嚢内に綿棒を挿入し、付着した血液を確認することでメンス初発日を調査した。その日を第1日として数えて3、5、7、9、11、12、13、14日目の計8回（A群）、あるいは3、5、7、9、11、12日目の計6回（B群）、PMSG（帝国臓器）200IU／回を筋肉内投与した。PMSG最終投与の翌日にhCG（帝国臓器）4,000IUを1回筋肉内投与した。その後、約28時間目に開腹手術を行い卵巣サイズを測定したのち、23Gの注射針をつけたシリンジでていねいに卵胞液を吸引した。卵胞液は、血液凝固防止のためにheparinを添加したWhitten's mediumで希釈したのち、卵胞卵を検索した。精子は、用指法により採取し90%パーコールで遠心、洗浄したのち、CaffeineとDBc-AMPを添加したTYH mediumにより前培養を施した。その4～6時間後にハイパー・アクチベーションを確認した精子を体外受精に用いた。媒精時のmediumは、Whitten's mediumを基本培地とし、Caffeineあるいはheparinを添加した試験区を設けた。GVが確認された未成熟卵は、10%FCS添加TCM199で約24時間の成熟培養を試み、第1極体の放出を認めたもののみ体外受精に供した。

いずれも授精後約18時間目に、採卵時に採取した卵丘細胞を含んだ10%FCS添加Whitten's mediumに卵子を移して共培養した。

結果：PMSGおよびhCGにより卵胞発育誘起を施したときの結果は、Table 1に示すとおりである。1頭あたりの平均発育卵胞数は、

A群59.5個、B群54.3個で、平均採取卵子数は、A群43.5個、B群38.7個であり、試験群による差よりも個体差のほうが大きかった。しかし、回収された卵子は、A群では卵丘細胞のついていない裸化卵子が多く含まれておりそのすべてが第1極

体を放出していた。B群においても裸化卵子が回収されたがGV期のものが多かった。体外受精の結果は、Table 2に示すとおりである。A群では、前核が3つ以上認められる多精子受精が多く、発育培養では8細胞期以前に発育は停止した。B群では、媒精時にheparinを添加したWhitten's mediumを用いた群で拡張胚盤胞までの発育を認めた。両群ともに裸化卵子で多精子受精が多かった。

考察：ミドリザル卵巣は、PMSGにきわめてよく反応した。A群では、第1極体を放出した裸化卵子が回収された。また、体外受精により多数の多精子受精を認めたことから、回収卵の過熱が疑われた。PMSGの投与回数を少なくし、卵子の回収時期を早くしたB群では、未成熟卵が含まれていた点でA群と異なっており、発育培養において低率ではあるが拡張胚盤胞へ発育させることができた。本研究により、ミドリザルは体外受精に成功した6番目のサル種となった。

謝辞：実験にご協力いただいた（社）予防衛生協会の鈴木通弘、冷岡昭雄両氏に感謝します。

Table 1 State of ovaries and collected eggs after treatment with PMSG and hCG

Groups	Anim. No.	Ovarian size (mm)	No. of follicles	No. of eggs collected		
				Total	Eggs with cumulus cell	Eggs without cumulus cell
A	3118108016	R: 18.3 X 16.8 L: 18.3 X 14.3	15 13	27	16	11
	3118412022	R: 19.5 X 15.9 L: 29.7 X 18.0	37 54	60	20	40
	3118507007	R: 21.3 X 19.3 L: 24.1 X 18.7	35 41	51	32	19 (GV 19)
B	3118212027	R: 23.3 X 18.5 L: 19.1 X 19.1	32 22	46	37	9 (GV 1)
	3118209020	R: 22.2 X 13.0 L: 15.7 X 13.1	23 10	19	13	6

R : Right L : Left  
Group A : 8 times treatment with PMSG  
B : 6 times treatment with PMSG

Table 2 Results of in vitro fertilization

Recipient groups	Media for IVF	Cumulus cell of eggs examined	No. of eggs examined	No. of eggs fertilized	No. of polyspermy eggs	No. of eggs cleaved	No. of eggs developed into			
							2 cell	4 cell	8 cell	~M Br EBr
A	added caffeine	+ covered with cumulus cell	36	27	9	12	1	6	5	
		-	5	4	3	1			1	
	Intact	-	43	29	14	11	4	3	4	
B	added caffeine	+ Intact	7	4	0	1			1	
		-	6	6	6	0				
	added heparin	+ Intact	40	27	8	18	1	8	5	4
		-	8	7	4	3	2		1	
	added heparin	+ Intact	35	18	0	18	2	8	5	1
		-	12	4	0	0			2	

M: Morula Br: Brastocyst EBr: Expand brastocyst  
Group A : 8 times treatment with PMSG  
B : 6 times treatment with PMSG

# 豚体外受精卵の発生に及ぼす豚血清、卵胞液 および卵管灌流液の影響

Effects of Pig Serum, Follicular Fluid and Oviductal Perfusate  
on Development of Pig Follicular Oocytes Fertilized In Vitro

戸津川 清・今 千賀子・斎藤 英文

Kiyoshi TOTSUKAWA, Chigako KON, Hidehumi SAITO

山形大学農学部畜産学教室

Laboratory of Zootechnical Science, Faculty of Agriculture,

Yamagata University

目的：豚の体外受精は受精卵を胚盤胞まで発生させることが困難であり、培養方法の改善が求められている。ウシと比べて報告例は少ないが、卵胞液の添加が胚盤胞への発生に有効であると報告<sup>1)</sup>されている。本研究では胚盤胞への発生率をより高めることを目的として、豚血清、卵胞液及び卵管灌流液を添加し、発生に及ぼす影響について比較検討した。

方法：卵胞内卵子は屠場で採取した卵巣の1～4mmの卵胞と5mm以上の卵胞に分け別々に採取した。A-顆粒膜細胞及び卵丘細胞の付着した卵子、B-卵丘細胞だけ付着した卵子、C-裸化卵子の3区に分けた。卵胞液は採取時の上澄みを遠心分離して用いた。卵管灌流液は卵管あたり修正TCM-19 91mlで灌流し、3000rpmで遠心分離し、上清を使用した。卵子の成熟培養は基礎培地として10%FCSを含む修正TCM-199を使用し、

200μl中に10～15個の卵子を投入し、5%CO<sub>2</sub>、95%Air、38.5℃の条件下で48～50時間行った。精子の前培養は射出精子をPBSで洗浄後、基礎培地（10%FCS含）に入れ、37℃で4～5時間培養することによった。体外受精は前培養の終わった精子を最終濃度 $2 \times 10^6$ cell/mlになるよう媒精することにより行った。媒精後7時間に卵子を発生培地で洗浄し、発生培地に移した。

<実験1>成熟培地に12.5%卵胞液及び10%豚血清を添加し、卵丘細胞複合体の膨潤率を検討した。

<実験2>発生培養時に12.5%卵胞液、10%豚血清及び25%卵管灌流液を添加し、発生に及ぼす影響を検討した。<実験3>成熟培養時に卵胞液及び豚血清を添加し、発生培養時に卵管灌流液を添加し、添加効果を検討した。

結果：<実験1>1～4mmの小卵胞液添加では膨潤するものは認められなかった。他方、5mm以上の卵胞液添加により94%のものが膨潤した。豚血清添加により98%以上が膨潤し、これは成熟培地の場合(89%)よりも有意に高い結果であった。<実験2>成熟培地、卵胞液添加及び豚血清添加区では、2細胞、4細胞、8細胞、16細胞及び桑実胚までの発生には差がみとめられなく、胚盤胞まで発生するものは認められなかった。一方、卵管灌流液添加区では、16細胞期及び桑実胚への発生率は他の区と比べて有意に高い(P<0.05)結果であった。（表1）。<実験3>成熟培地、卵胞液添加及び豚血清添加区の2細胞期及び4細胞期への発生率はいずれもA、B間に有意差が認められた。豚血清添加区A区を除いた他の区では、いずれも胚盤胞までの発生が認められた。卵胞液添加A区が7.5%と最も良い発生率であった。（表2）。

表1. 卵胞液、豚血清及び卵管灌流液の添加による発生成績 (%)

処理方法	2 cell ≤*	4 cell ≤	8 cell ≤	16 cell ≤	Morula ≤	Blastocyst
成熟培地	A 55.9 (33/59) <sup>c1)</sup>	22.0 (13/59)	6.8 (4/59)	3.4 (2/59) <sup>b</sup>	3.4 (2/59) <sup>b</sup>	0.0 (0/59) <sup>b</sup>
	B 43.0 (77/179) <sup>c</sup>	22.3 (40/179)	18.4 (33/179)	8.8 (15/179) <sup>b</sup>	5.0 (9/179) <sup>b</sup>	0.0 (0/179) <sup>b</sup>
卵胞液添加培地	A 52.1 (25/48) <sup>c</sup>	25.0 (12/48)	16.7 (8/48)	8.3 (4/48) <sup>b</sup>	4.2 (2/48) <sup>b</sup>	0.0 (0/48) <sup>b</sup>
	B 45.0 (54/120) <sup>c</sup>	20.8 (25/120)	12.5 (15/120)	6.7 (8/120) <sup>b</sup>	2.5 (3/120) <sup>b</sup>	0.0 (0/120) <sup>b</sup>
豚血清添加培地	A 58.8 (30/51) <sup>c</sup>	33.3 (17/51)	17.6 (9/51)	13.7 (7/51) <sup>b</sup>	2.0 (1/51) <sup>b</sup>	0.0 (0/51) <sup>b</sup>
	B 48.6 (68/140) <sup>c</sup>	18.6 (26/140)	12.1 (17/140)	6.4 (9/140) <sup>b</sup>	2.9 (4/140) <sup>b</sup>	0.0 (0/14) <sup>b</sup>
卵管灌流液添加 添加培地	A 55.5 (20/36) <sup>a</sup>	36.1 (13/36)	19.4 (7/36)	8.3 (3/36) <sup>a</sup>	5.5 (2/36) <sup>a</sup>	2.8 (1/36) <sup>a</sup>
	B 28.7 (35/122) <sup>b</sup>	21.3 (26/122)	19.7 (24/122)	17.2 (21/122) <sup>a</sup>	9.8 (12/122) <sup>a</sup>	4.1 (5/122) <sup>a</sup>

1) 異符号間に 5% 水準で有意差あり

\* A B 間に 5% 水準で有意差あり

表2. 成熟培養時での卵胞液及び豚血清の添加による発生成績 (%)

処理方法	2 cell ≤*	4 cell ≤*	8 cell ≤	16 cell ≤	Morula ≤	Blastocyst
成熟培地	A 55.5 (20/36)	36.1 (13/36)	19.4 (7/36)	8.3 (3/36)	5.5 (2/36)	2.8 (1/36)
	B 28.7 (35/122)	21.3 (26/122)	19.7 (24/122)	17.2 (21/122)	9.8 (12/122)	4.1 (5/122)
卵胞液添加培地	A 45.0 (18/40)	35.0 (14/40)	30.0 (12/40)	27.5 (11/40)	17.5 (7/40)	7.5 (3/40)
	B 28.9 (33/114)	22.8 (26/114)	19.3 (22/114)	12.3 (14/114)	9.6 (11/114)	4.4 (5/114)
豚血清添加培地	A 28.6 (10/35)	25.7 (9/35)	14.3 (5/35)	14.3 (5/35)	5.7 (2/35)	0.0 (0/35)
	B 33.3 (28/84)	22.6 (19/84)	17.9 (15/84)	13.1 (11/84)	9.5 (8/84)	3.6 (3/84)

\* A B 間に 5% 水準で有意差あり

考察：本研究により、胚盤胞への発生率を高めるためには、成熟培養時に卵胞液を添加し、さらに発生培養時に卵管灌流液の添加が有効であることが明らかになった。受精卵の体外培養において、卵管液が胚盤胞への発生率を高めることが報告<sup>2)</sup>されており、卵管灌流液で置き換えるか検討が必要である。

## 文 献

1) 永井卓也ら (1991)、豚体外受精卵の体外培養による孵化。第84回日本畜産学会大会発表要旨。

2) Archibong, A.E. et al. (1989). Development of porcine embryos from one-and two-cell stage to blastocyst in culture medium supplemented with porcine oviductal fluid. Biol. Reprod. 41:1076.

# 牛胚の胚盤胞期への発生に関する 血清分画について

The stimulatory effect of serum fractions on the development of bovine embryos to blastocyst stage

建本秀樹・堀内俊孝・山田 學

Hideki TATEMOTO, Toshitaka HORIUCHI, Manabu YAMADA

広島県立大学生物資源学部生物資源開発学科

Department of Bioresources, Hiroshima Prefectural University

【目的】 牛初期胚は、体外発生培養において8~16-cell stageで発生を停止する(8-cell block)。この8-cell blockは、胚培養時に卵丘細胞や卵管上皮細胞と共に培養を行ったり、卵管上皮細胞の培養で作製したcondition mediumを発生培地に用いることで解除される<sup>1, 2)</sup>。しかし、共培養細胞や血清が胚発生に及ぼす要因には、不明な点が多い。最近、牛胚発生培養液に一般に用いられているTCM-199(複雑な組成)の代わりに、HECM(比較的単純な組成)を使用することで、牛初期胚は共培養細胞を必要とすることなく8-cell blockを解除し胚盤胞期まで発生することが報告された<sup>3)</sup>。そこで本研究では、比較的単純な組成であるmTyrode(glucose-free)にアミノ酸を添加した培養液に血清分画を添加することで牛胚発生に対して有効な血清要因の検索、及び共培養細胞と牛胚発生の関係を検討した。

【方法】 体外成熟には、屠場で入手した卵巢の小卵胞(直径1~5mm)を吸引採取することで得た、卵丘細胞に密に覆われた卵子だけを供試した。成熟培養はTCM-199に10% CSと0.12IU/ml FSHを添加した培養液中で22時間行った。体外受精は、mTyrodeに5mM caffeine、10μg/ml heparinと10mg/ml BSAを添加した培養液を用い、常法に従って行った。

血清(CS)は微量限外濾過法により、分子量<5,000、<10,000、<30,000、<100,000、<300,000と300,000残渣の6区に分けた(以下5K、10K、30K、100K、300K、残渣300K)。発生培養液にはmTyrode(glucose-free、25mM hepes含)にMEM必須アミノ酸、MEM非必須アミノ酸と3mg/ml BSAを添加したものを用いた。卵丘顆粒層細胞の除去は媒精後7時間にvortexを用いて行い、胚盤胞期の割球数は螢光染色で測定した。

実験1では発生培養時に卵丘顆粒層細胞との共培養系と共に培養を用いない系のそれぞれに血清無添加区、CS区(10%添加)、6種類の血清分画(10%添加)の計8区を設け牛胚発生に有効な血清分画と、それに伴う共培養細胞との関係を検討した。

実験2では、牛胚発生に有効に働いた血清残渣300Kの要因のひとつと考えられた細胞外マトリックスである超高分子のfibronectin(50μg/ml)(分子量240Kの二量体)を発生培養液に添加することで、

その要因を検討した。

【結果】牛胚の2-cell stageへの分割率、72時間後の8-cell stage以上への発生率、そして胚盤胞期への発生率は、共培養細胞の有無に影響されなかった。又、5K、10K、30K、100Kと300Kの血清を添加した場合72時間迄の発生には有意差を認めなかつたものの、胚盤胞期への発生率は有意に抑制された( $P<0.01$ )。胚盤

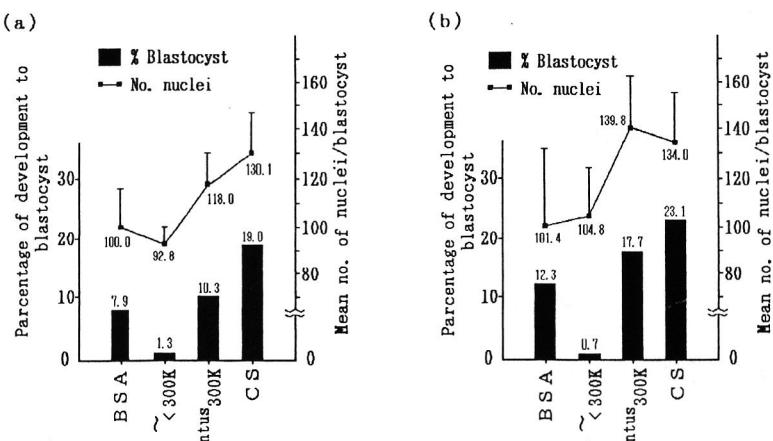


Fig. Development to blastocyst of bovine 1-cell embryo  
(a) coculture system (b) non-coculture system

胞期への発生は血清無添加区、残渣300K区、CS区で共培養に関係なく認められたが、割球数は血清無添加区で押さえられた(Fig)(実験1)。血清無添加の発生培地へのfibronectinの添加は血清無添加区と比較して分割率、72時間後の8-cell stage以降への発生率、胚盤胞期への発生率のどの値にも差が認められなかつた。しかし、fibronectinを添加することで胚盤胞期の割球数が増加する傾向を認めた(実験2)。

【考察】牛初期胚を体外で培養する際に問題となる8-cell blockは、glucoseを含まないTyrode 培養液により共培養細胞がない条件でも解除された。この事はこのblockにはglucose代謝が関与しているとの報告と一致した<sup>4)</sup>。又、分割率や媒精後72時間迄の発生は、どの血清分画でも同様な結果を示したことからこの時期迄の発生は血清に影響されないものと思われた。胚盤胞期への発達は分子量300K以下の血清分画で抑制され、残渣300Kの血清分画は逆に有効であった。しかし、この発生率は未分画の血清を添加した場合より低く、しかもfibronectinの添加だけでは発生率を向上させることはなかった。一方、胚盤胞期の割球数増加には残渣300K分画やfibronectin添加は有効であった。以上のことから、共培養細胞(卵丘顆粒層細胞)は牛胚発生に対して有効な物質を分泌しているのではなく、むしろ培養液中に含まれる胚発生に阻害的な要因を除去する働きをしているものと思われた。更に、分子量300K以上の血清分画中に牛胚の胞胚腔形成に有効な物質があることが認められたが、この物質だけでより高率な牛胚発生を維持するのは難しく、実際には単独では発生に阻害的に作用する分子量300K以下の血清中の低分子との相乗効果が必要であるものと推察された。

### 【主要文献】

- 1) Eyestone WH and First NL: J Reprod Fert 1989; 85: 715-720
- 2) Fukuda Y et al.: Biol Reprod 1990; 42: 114-119
- 3) Pinyopummintr T and Bavister BD: Biol Reprod 1991; 45: 736-742
- 4) Ellington et al.: Biol Reprod 1990; 43: 97-104

# 共焦点レーザー走査型顕微鏡によるマウス卵母細胞表層の LCA（レクチン）レセプターの観察

Distribution of the site of LCA (Lectin) receptors in the cortical surface of mouse oocyte using confocal laser-scanning microscopy

岡田詔子・三島真喜子・川村 良・永江 毅・猪俣賢一郎

Akiko OKADA, Makiko MISHIMA, Makoto KAWAMURA, Takeshi NAGAE, Kenichirou INOMATA,

東邦大学医学部第二解剖・第二産婦人科  
帝京大学医学部附属溝口病院産婦人科

Department of 2nd Anatomy · 2nd Gynecology and Obstetrics, Toho University School of Medicine

Department of 2nd Anatomy Gynecology and Obstetrics, Teikyo University School of Medicine, University Hospital Mizonokuchi

**目的：**受精刺激による表層顆粒（CG）の放出により透明帯（ZP）が変化して多精子受精を防御している事はよく知られた事実である。一方、マウスの未受精卵では2回の減数分裂中期に受精の刺激なしにCGを放出し、その結果分裂装置が偏在する表層に限局してCGの欠損領域を形成する<sup>1,2)</sup>。演者らは共焦点走査型レーザー顕微鏡を用いて細胞線維系とCGの分布や放出との関係、動物種による相似性や差異等を調べる目的で今回はマウス卵の減数分裂過程に於けるCGの分布の変動を観察した。マウス、ハムスター卵のCGがLCA（レンズ豆）レクチンでラベルされる事が蛍光顕微鏡により観察されている<sup>3)</sup>ので FITC-LCA を用いてCGの分布を、さらに Propidium iodide（PI）を用いて核を染色する二重染色法でその変化を観察した。

また人工的にCGを放出させて LCA レクチンがCGの内容物をラベルしているか否かを LCA Gold ラベルにより検討した。さらに成熟卵の DMSO 处理でCGが放出することが知られているので全放出機構の成立時期などについても検討した。

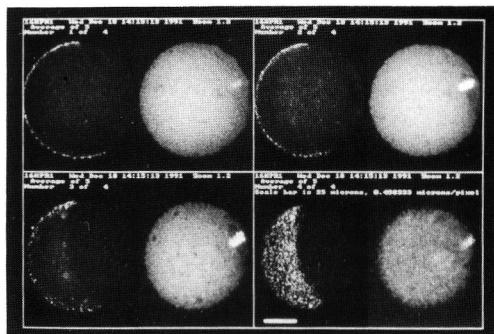
**方法：**成熟雌マウスに PMSG と HCG 5iu 投与した後1—16時間後に卵胞或いは卵管より卵を回収し Hyaluronidase と Pronase 处理したものと、機械的に卵丘細胞を除去したものを用いた。回収卵は 4% paraformaldehyde で固定後 DPBS に Glycine と BSA を添加した液で洗浄し 0.1% Triton X 100 处理後再洗浄した。その後 FITC-LCA 10 μg/ml で染色しさらに PI 20 μg/ml で再染色し共焦点顕微鏡（BI0-RAD Lab の MRC-600 型）を用いて観察した。LCA レクチンがCGの内容物をラベルしているか否かは成熟卵を 8% エタノール 4 分間処理して CG の放出を誘起した後に Lowicryl K4M 樹脂で包埋して Gold conjugated LCA

で染色しTEMで観察した。

**結果：** 1) HCG 投与後1時間の回収卵は PI 染色により大きな卵核胞期の核が認められ、FITC の緑色蛍光が卵の全表層に一様に存在することが断層像により認められたが、その蛍光強度はこの時期が最も微弱であった。

2) HCG 投与後8時間の回収卵は PI 染色により赤色蛍光に染色された染色体が認められ第一減数分裂中期であった。この時期の核板上の表層は FITC の蛍光が欠損していることが断層像により明瞭に観察された。

3) HCG 投与後13-16時間の回収卵は第二減数分裂中期で第一極体の中には FITC の蛍光はほとんど認められなかつた。中期の核板上の表層には FITC の蛍光が欠損している領域が明瞭にみとめられた。（写真は四断面の組写真で各組の右は PI, 左は FITC）。卵丘細胞の除去方法や ZP の除去の有無による LCA の染色の差は認められなかつた。 4) DMSO 处理では FITC の蛍光が第一減数分裂中期に、希に認められるのみで大半の蛍光物質は消失していた。 5) エタノールで処理した成熟卵の表層には CG はごく希に認められ、その周卵腔内には所々に銀粒子を認めたがその分布は比較的少なかつた。



**考察：**エタノールで CG を放出させた卵で周卵腔内に LCA の銀粒子が認められた事。また卵核胞期には LCA の蛍光が卵の全表層に一様に認められたのに、第一と第二減数分裂中期の核板上の表層では欠損していた事からこの蛍光物質は CG であることが確かめられた。DMSO 处理により第一減数分裂中期で大半の蛍光物質が消失した事から CG の全放出の機構はこの時期にすでにほぼ完成しているものと推測される。 Vincent らは<sup>4)</sup> DMSO 处理で卵表層のアクチン網が損傷されると報告しているので アクチン網と CG の部分放出との関係が示唆される。今後さらにこの関係について検討したい。

## 文献

- 1) Okada et al : Premature cortical granule release and partial zona reaction of mouse oocyte. proc. Int. Symposium In "Fertilization in mammals" Serono Symposia P453 1990
- 2) Ducibella T. et al : Precocious loss of cortical granules during mouse oocyte meiotic maturation and correlation with an egg-induced modification of the zona pellucida. Dev Biol 137: 46-55. 1990
- 3) Ducibella T. et al : Quantitative studies of changes in cortical granule number and distribution in the mouse oocyte during meiotic maturation. Dev Biol 130: 18-197. 1988
- 4) Vincent C. et al : Dimethylsulphoxide affects the organisation of microfilaments in the mouse oocyte. Mol Reprod Dev 26: 227-235. 1990

# マウス卵子の Laser Scanning Microscope による観察

## Observation of Mouse Eggs by the Laser Scanning Microscope

横田秀夫<sup>1</sup>・木村順平<sup>2</sup>・佐藤嘉兵<sup>1</sup>

Hideo YOKOTA<sup>1</sup>, Junpei KIMURA<sup>2</sup> and Kahei SATO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>日本大学農獸医学部動物細胞学教室

<sup>2</sup>日本大学農獸医学部獣医解剖学教室

Department of Cell Biology<sup>1</sup> and Department of Veterinary Anatomy<sup>2</sup>,  
College of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon University

**目的：**最近、共焦点レーザー走査顕微鏡(Laser Scanning Microscope、LSM)が実用化され、生物学的研究に威力を発揮し始めている。LSMでは、標本内の焦点面からの光のみを抽出し画像化が可能で、厚い標本内の任意のレベルで薄い光学的切片をつくり観察することができるところから細胞、組織内部の立体的構造を解析することができる。この様な機能を有するLSMは生物学・医学の分野で活用が大いに期待されている。我々はすでに卵成熟に伴う透明帯の末端糖鎖に対するレクチン結合性およびマウス透明帯タンパク質mZP3の発現について検討してきた。今回、 $\alpha$ -Galに特異的に結合するレクチンである peanut agglutinin (PNA)およびmZP3に対する单クローニング抗体を用いた組織化学により、透明帯における $\alpha$ -Gal糖鎖およびmZP3の局在を可視化しLSMを用いて観察を行った。

**方法：**実験には6Wのddy系雌マウスを用いた。PMSG5IUを腹腔内に投与し、その48時間後にhCG7IUを投与し、12-14時間後に卵管灌流法により採卵した。排卵卵子に付着している卵丘細胞はヒアルロニターゼを用いて除去し、2% glutaraldehydeで1hr固定し、PBSで3回洗浄した。mZP3の局在を観察するものでは、卵子を抗mZP3单クローニング抗体に30min反応させ、PBSで3回洗浄を行なった。その後、FITC標識抗ラットIgGで30min反応させPBSで3回洗浄を行った。 $\alpha$ -Gal糖鎖の局在を観察するものでは卵子をFITC標識PNAに10min反応させPBSで3回洗浄を行った。それぞれの反応を終えた卵子をPBSでホールマウント標本を作成し、即座に共焦点レーザー顕微鏡(オリソバ LSM-GB200)で観察を行った。観察は、レーザー波長488nm、X-Y-Zスキャンで行ないmZP3の局在については画像解析装置により疑似カラーをつけて観察した。

**結果および考察：**PNAで反応したものでは透明帯の外層と内層に明瞭な陽性反応が認められ、中間層では反応が全く観察されなかった(Fig. 1)。次に抗mZP3抗体を反応したものでは透明帯の最外側から12 $\mu$ mの部位で急激に蛍光輝度が上昇し透明帯の内層に向かうに従って緩やかに減少した(Fig. 2, 3)。

以上、今回の観察結果から透明帯における $\alpha$ -Gal糖鎖は、明らかに透明帯の両側の表層に分布していることが確認された。この結果はパラフィン切片を用い従来の光学顕微鏡で観察した場合には明瞭に確認できなかったものである。一方、mZP3は透明帯全域にわたり幅広くその分布が認められた、特に外側より多く分布していることが明らかとなった。

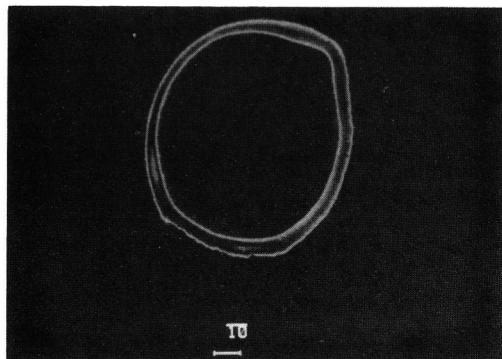


Fig. 1

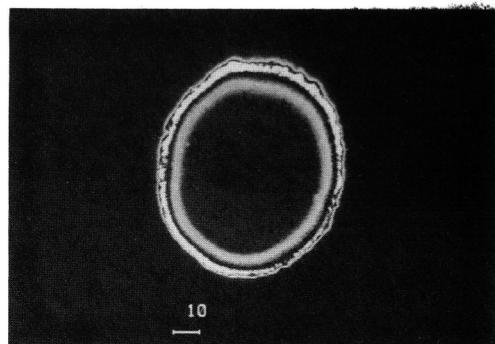


Fig. 2

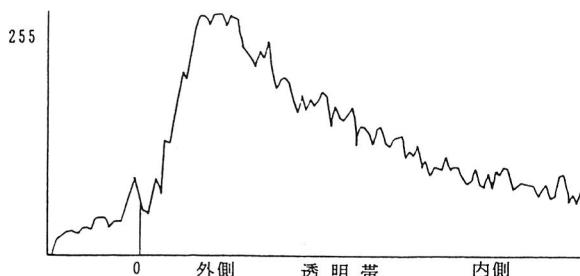


Fig. 3

Fig. 1 FITCラベルPNAの透明帯への結合  
Fig. 2 FITCラベル抗mZP3単クローニング抗体の透明帯への結合（疑似カラー処理画像）  
Fig. 3 mZP3に結合したFITCの蛍光輝度

#### 文献：

- 1) 加藤一夫、村上徹(1991). 共焦点レーザー走査顕微鏡：全載標本の観察、細胞、23.3. 6-10
- 2) Gard, D. L. (1991). Organization nucleation and acetylation of microtubules in *xenopus-laevis* oocytes a study by confocal immunofluorescence microscopy. Dev. Biol. 143(2). 346-362.
- 3) Kimura, J., Sato, K., Tsukise, A. and Okano, M. (1991). Appearance of lectin binding affinity to the zona pellucida during hamster oocyte maturation. Cell. Mol. Biol., 37(6), 623-629.
- 4) Kimura, J., Sato, K., Tsukise, A. and Okano, M. (1991). Detection of zona pellucida component protein in mRNA level by non-isotopic in situ hybridization in the hamster ovary. Biol. Reprod., 44, 77.

# ハムスター卵母細胞における 表層粒の卵胞発育に伴う変化

Changes in cortical granules in hamster oocytes  
during the folliculogenesis

細江実佐・新村末雄・石田一夫

Misa HOSOE, Sueo NIIMURA and Kazuo ISHIDA

新潟大学農学部農業生産科学科

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Niigata University

目的：表層粒は、透明帯反応や卵黄遮断を引き起こす物質を含んでおり、多精子受精の防御に役割を果たす事が知られている。従来、各種哺乳動物の卵母細胞における表層粒の出現と分布については主として電顕を用いて調べられている。すなわち、表層粒は一次あるいは二次卵胞の卵母細胞に出現し、その後卵胞の発育とともに数が増して細胞質表層に分布するようになるが、表層粒の分布は卵母細胞内で一様ではなく、とくに、成熟分裂を再開した卵母細胞では表層粒が存在する領域(CGD)とそれを欠く領域(CGFD)が識別されるという。しかしこれまでに、卵母細胞に含まれる表層粒の数と分布について、卵胞発育に伴う変化は詳細に調べられていない。最近、胞状卵胞内卵母細胞でビオチンあるいは蛍光色素を標識した*Lens culinaris agglutinin*(LCA)を用いて、表層粒の数と分布の変化を調べることが可能になってきている<sup>1-3)</sup>。そこで本実験では、原始卵胞から胞状卵胞までのハムスター卵母細胞について、卵母細胞に含まれる表層粒の数と分布が卵胞発育および成熟分裂の過程でどのように変化するかを、FITCを標識したLCAを用いて調べた。

材料および方法：卵母細胞は、原始卵胞、一次卵胞、小型二次卵胞および大型二次卵胞と排卵前87、63、39、15、12、9、6および3時間の胞状卵胞から採取した。また、排卵後0および3時間に採取した卵母細胞も観察に用いた。表層粒を観察するために、採取した卵母細胞をDucibellaらの方法<sup>2)</sup>に従って処理した。すなわち、卵丘細胞と透明帯を除去した卵母細胞をバラホルムアルデヒドを3.7%含むPBSに室温で30分間固定した後、TritonX-100を0.1%含むPBSに5分間浸漬し、透過処理を施した。次いで、PBS 1ml中にLCA(E-Y Laboratories, U.S.A.) 10μg、TritonX-100 0.1μlおよびBSA 3mgを含む液に20℃で30分間浸漬し、染色した。なお対照として、LCAを含まない液に浸漬した卵母細胞と

$\alpha$ -メチルマンノシドで処理した卵母細胞を用いた。これらの処理を施した卵母細胞は落射蛍光顕微鏡で観察した。

結果：卵母細胞をFITCを標識したLCAで処理すると、細胞質に表層粒の存在を示す蛍光顆粒が認められた（図1a）。この蛍光顆粒は、主として細胞質表層に分布していたが、LCAを含まない液に浸漬した卵母細胞と $\alpha$ -メチルマンノシドで処理した卵母細胞にはみられなかつた（図1b）。LCA陽性の表層粒は、原始卵胞と一次卵胞の卵母細胞にはみられなかつたが、小型二次卵胞のものに初めて少数出現し、その後増加して胞状卵胞のもので最大となつた。また、表層粒は小型二次卵胞から排卵前9時間の胞状卵胞までの卵母細胞では細胞質表層全域に分布していたが、排卵前6時間から排卵後3時間までの卵母細胞の細胞質には明瞭なCGFDが出現し、CGDと識別された。なお、CGFDは出現後時間の経過に伴つてやや拡大する傾向がみられた。

考察：ハムスターの卵母細胞において、表層粒は顆粒層が2層の二次卵胞の時期に出現し、その数は胞状卵胞形成まで変化なく少ないままであったといふ<sup>4)</sup>。また、hCGを注射して成熟分裂を再開させると、CGFDはhCG注射後13ないし14時間に出現し、hCG注射後17時間の排卵されたものではCGFDの細胞質に占める割合は当初の2倍以上に拡大することが<sup>5)</sup>、それぞれ電顕を用いて観察されている。LCAを用いた本実験の結果と上述の電顕観察の結果を比較すると、表層粒の出現時期は一致していたが、その後の数の変化に相違がみられた。また、CGFDの出現時期は本実験の方がやや早いように思われたが、出現後の変化は一致していた。

#### 主要文献

- Cherr, G.N., Drobis, E.Z. and Katz, D.F. (1988). J. Exp. Zool., 246, 81-93.
- Ducibella, T., Anderson, E., Albertini, D.F., Aalberg, J. and Rangarajan, S. (1988). Dev. Biol., 130, 184-197.
- Ducibella, T. (1991). Elements of Mammalian Fertilization, Vol.1 (Wasserman, P.M., ed.), CRC Press, pp. 205-231.
- Selman, K. and Anderson, E. (1975). J. Morpho., 147, 251-274.
- Okada, A., Yanagimachi, R. and Yanagimachi, H. (1986). J. Submicrosc. Cytol., 18, 233-247.

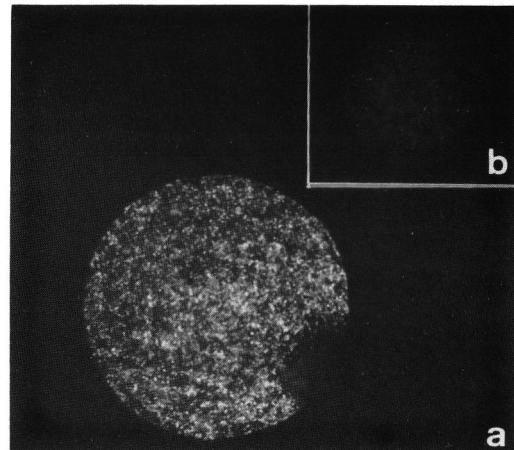


図1 FITC標識LCAで処理した排卵前6時間のハムスターの卵母細胞(a)と対照の卵母細胞(b).

# ハムスターの卵成熟分裂にみられる卵表層の アクチンの分布の変化

Cortical changes in actin distribution during  
the meiotic maturation in the hamster egg

平 尾 幸 久・山 崎 尚

Yuki-hisa Hirao & Hisashi Yamasaki

和歌山県立医科大学 生物学教室

Department of Biology, Wakayama medical College

目的：ほ乳動物卵は排卵された時、成熟分裂の第2の中期に達している。このような卵では必ず卵の一部に大きく微絨毛を欠く部域が見られたり（Rat や Mouse）, また円錐形の太い微絨毛をもつ比較的小さな部域が見られる（Hamster）。これらは第1極体放出の跡であることが良く知られている（1,2,4,7）。このことは次のような疑問を抱かせる。1) 第1極体はいつの時点から放出する場所が決っていくのか。2) 精子の侵入によって第2極体の放出が始まるが、その場所は第1極体の放出の場所とどんな関係になっているのか。3) 精子の侵入する場所はどこか。これらを明らかにするために、特にアクチンの局在性に注目して、これに走査電顕（SEM）の観察をあわせて行い興味ある知見が得られたので報告する。

方法：ゴールデンハムスターの雌（8-16週令）の発情周期の第1日目の午前にPMSGを（30 I.U.），次いで第3日目の夕方が、第4日目の午前にhCG（25 I.U.）を腹腔内に注射した。成熟第1分裂の過程の卵を得るために、hCGの注射時を0時間として、各時間毎に卵巣を切り出し、卵胞を針で破って卵子を得た。第2成熟分裂の過程にある受精卵を得るために、hCGの注射後12時間目に、雄の精巣上体尾部から精子を取り、その精子懸濁液を子宮に注入する人工媒精を行った。媒精後5時間目から各時間毎に、輸卵管を切り出しそこから受精卵を得た。Rh-Phalloidin と Hoechst 33342 の二重染色には、Zona-freeの卵を7%のFormalinで固定した。固定後 Saponinで30分処理し、Rinseしたあと、Rh-phalloidin 液で60分処理した。次いで Rinse したあと、Hoechst 33342 に移し核の染色を行った。30分後に蛍光顕微鏡で観察した。一方、走査電顕（SEM）による観察には、Zona-free 卵を2.5% Glutaraldehydeで固定し、予め Poly-L-Lysin に浸しておいたガラス片（8×8mm）に乗せた。ガラス片はアセトンで脱水し、臨界点乾燥を行った。観察には日立の走査電顕（S2300型）を用いた。

結果：hCGの注射後2-3時間後に卵巣卵は卵核胞の崩壊（GVBD）が起り、5-6時間後には Prometa-I, 7-8時間後には Meta-I, 9時間で Telo-I, 10-11時間で第

1極体の放出が完了する。そして12時間目にはMeta-IIに達する。卵表層に見られるアクチンはGVBDからPrometa-Iまでは均一に分布していた。しかしながらPrometa-Iの分裂装置が卵表近くに移動すると、必ずその卵表層に強い蛍光を示す部位が初めて見られた。Meta-Iの分裂装置を覆う卵表層部には太い微絨毛がSEMで観察され、ここは特に強い蛍光を示した。第1極体の放出はこの部位で始まり、極体と卵に連なる卵表層の一部には強い蛍光を発し、この卵表層下にはTelo-Iの染色体が位置していた。第1極体の放出が完了するとその放出跡に強い蛍光を発する部位が残り、この卵表層下には決ってMeta-IIの分裂装置が位置した。蛍光を発する部位の先端はギザギザ状を呈し、これはSEMによる微絨毛を欠き太い突起を持つ部位と一致した。一方、精子頭が卵表に付着して、膜融合が始まると、第2極体の放出が先の強い蛍光を発する部位で生じた。精子頭が卵細胞質中に取り込まれ膨化が始まると、その卵表層上に強い蛍光を発する部位が形成された。SEMで見るとこの部位には第1極体放出跡に見られたと同様の太い微絨毛の突起が生じた。第2極体の球体部は一度くびれた後さらにもう一度くびれ、細い原形質糸で卵と連なりやがて切り放された。雄性前核が形成されるころには精子侵入部位の卵表は再びもとの状態に戻った。

考察：ハムスターの成熟分裂を通じてPrometa-Iの分裂装置が卵表に移動し始めたとき、それを覆う卵表層部に強い蛍光を示す部位が現われた。その部位はF-アクチンが局在することを意味し、その後もこのような卵表層下には決って第1及び第2の成熟分裂の装置が位置していた。これはマウスの観察と良く一致した(3,4)。SEMの観察で明かのようにその部位は太い微絨毛の突起を形成していたが、恐らく極体になる部分の膜の材料を提供する現象と考えられよう(5)。本観察から第1極体の放出部位と第2極体の放出部位とが同じ位置になることが明かとなった。又精子の侵入部位には強い蛍光を発する部位が生じ、雄性前核の形成の頃に元の状態に戻った。これは精子の侵入による卵表層の乱れを修復する現象なのかも知れない(4)。しかし精子の卵への侵入部位が特定されるかどうかは明かではなかった。

#### 主要文献：

1. Ebensperger,C and C.Barros, 1984. Gamete Res. 9:387-397.
2. Hirao,Y and J.Hiraoka, 1987. Develop. Growth and Differ. 29(2):123-132.
3. Maro,B.,M.H.Johnson,S.J.Pickering and G.Flach, 1984. J. Embryolexp.Morph.81: 211-237
4. Maro,B., 1990. BioEssay, 3(1):18-21.
5. Okada,A.,R.Yanagimachi and H.Yanagimachi, 1986. Submicr.Anat.18(2):233-247.
6. Shalgi,R.,D.M.Phillips and P.F.Kraicer, 1978. Gamete Res. 1:27-37.
7. Shalgi,R. and D.Phillips, 1980. J.Ultrastruct Res. 71:154-161.

# 卵の成熟過程における表層顆粒の動態に関する検討

## Studies of Cortical Granuels in the Process of Oocyte Maturation

小関みづほ・南郷周児・木村裕幸・大庭三紀子\*\*・  
倉澤滋明\*・鈴木秋悦・野澤志朗

Mizuho KOSEKI, Shuji NANGO, Hiroyuki KIMURA,  
Mikiko OBA\*\*, Shigeaki KURASAWA\*, Shuetsu SUZUKI,  
Shiro NOZAWA

慶應大学医学部産婦人科学教室, \*南多摩病院, \*\*森永乳業生科研

Department of Obstetrics and Gynecology School of Medicine,  
Keio University, \*Minamitama Hospital, \*\*Biochemical Research  
Laboratory, Morinaga Milk Industry Co. Ltd.

目的：受精にともなう卵の表層反応を明らかにすることは、体外受精、配偶子卵管内移植法などの臨床応用が行われる中で、さらに基礎的な検討を要する課題である。また、受精に伴い卵細胞膜下の表層顆粒は exocytosis によって、卵黄腔に放出される。その結果、透明層反応がおこり多精子受精を防御すると考えられている。本研究では、受精までの卵成熟過程における表層顆粒の動態について、形態学的、組織学的に観察を行い、排卵卵、未成熟卵(卵胞卵)の成熟過程、排卵卵のステロイド産生抑制下における表層顆粒の変化について検討することを目的とした。

方法：4-8週のマウスにPMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) 5 IUを腹腔内投与し、48時間後にHCG (Human Chorionic Gonadotropin) 5 IUを腹腔内投与して、その15時間後、卵管を摘出して過排卵卵を採取した。また、卵胞卵は、上記PMSG投与48時間後に卵巢を摘出し卵胞を穿刺して採取し、MEM+Bicarbonate 37°Cで培養した。排卵卵・卵胞卵・*in vitro* 培養卵、各々について、0.25% Proteaseで透明層を除去した後、3% Para-formaldehyde 溶液で固定した。その後0.05% Triton X-100で処理しレンズマメ凝集素(LCA)蛍光染色法にて検討した。次に、4-8週のハムスターの性周期にあわせ、PMSG 30IUを腹腔内投与し60時間後にHCG 30IUを投与し15時間後に過排卵卵を採取した。さらに $10^{-6}$ - $10^{-8}$  Trilostane ( $4\alpha$ 5-epoxy- $17\beta$ -hydroxy-3-oxo- $5\alpha$ -androstane- $2\alpha$ -carbonitril) solutionで1時間培養し、Gold-conjugated LCAで、染色し、電顕的にTrilostane非培養卵と比較した。

成績：マウス排卵卵の表層顆粒の細胞内の分布については、蛍光染色法で、表層顆粒の分布が認められる部分と、認められない部分に分かれ、部位的差異があることがわかった。マウス卵胞卵については、卵全体に一様に

表層顆粒が分布していた。マウス *in vitro* 培養後3時間で Germinal Vesicle Break Down が起り、表層顆粒は卵胞卵よりも多く染色された。電顕による観察では、ハムスター排卵卵の表層顆粒は、卵細胞膜付近、あるいは卵細胞膜下に卵円形を呈して存在した。ハムスター Trilostane 処理卵については、非処理卵に比べ、凹凸を呈した顆粒となり、濃染された。表層顆粒の大きさは、両者とも同一であり、分布の位置ならびに、その数も類似していた。

考察：マウスの卵蛍光染色により、表層顆粒の卵全体における分布傾向が明らかとなった。マウス排卵卵は、第一極体を放出し、第2減数分裂中期で停止している。これらの卵の染色体をとりまく領域には、表層顆粒が存在しないといわれているが、本研究においても、同様の所見を得た。マウス卵胞卵は、第1減数分裂の途中で胚胞が存在する時期に相当し、核自体は休止期に当たる。この時期の表層顆粒は、卵細胞膜下に均一に存在している。Ducibella らは *in vivo* ならびに *in vitro* の卵成熟過程の研究報告の中で、第1減数分裂胚胞期から第2減数分裂中期の第1極体放出期までの表層顆粒の分布の変化を報告している。それによると、表層顆粒の空白領域と存在領域があることが明らかにされている。本研究では、*in vitro* 培養卵であるが、類似の結果が得られ、核、染色体の変化にともない表層顆粒の分布も変化し、細胞質の変化も同時に起こることが明らかとなった。ハムスター排卵卵の Trilostane 処理および非処理の比較においては、前記の如くであるが、我々はハムスター排卵卵内因性のステロイド  $A^5\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase ( $A^5\beta$ -HSD) の阻害剤である Trilostane が、卵子内ステロイド合成抑制を起こし、表層顆粒内容物の放出、透明層反応過程に影響し、多精子受精を起こす可能性について、報告している。本研究でも、Trilostane が、卵細胞質に変化をもたらし、表層顆粒にも影響を与えていることが、推測された。今後、ステロイド合成阻害剤が卵成熟過程の表層顆粒にどのように作用し、如何なる変化をもたらすのかを検討して行きたいと思う。

#### 主要文献：

- Cherr, G. N., Drobnis, E. A., and Katz, D. F. (1988). Localization of cortical granule constituents before and after exocytosis in the hamster egg. *J. Exp. Zool.* 246, 81-93.
- Ducibella, T., Kurasawa, S., Rangarajan, S., Kopf, G. S., and Schultz, R. M. (1990). Precocious loss of cortical granules during mouse oocyte meiotic maturation and correlation with an egg-induced modification of the zona pellucida. *Deval. Biol.* 137:46-55.
- Suzuki, S., Endo, Y., Miura and Iizuka, R. (1984). Biological effects of trilostane *in vitro* on oocyte maturation and fertilization in the hamster. *Experientia*. Vol. 40, №.11:1214-1217.

# 体 内 で 成 熟 し た マ ウ ス 卵 子 の 単 為 発 生 誘 起 条 件 の 檢 討

Studies on the parthenogenetic activation  
of mouse oocytes matured in vivo

中川 明・坂本裕敬・川島一成・菅 徹行

Akira NAKAGAWA, Hiroyoshi SAKAMATO, Kazunari KAWASHIMA, Tetsuyuki SUGA

山口大学農学部家畜臨床繁殖学教室  
Laboratory of Theriogenology, Faculty of Agriculture,  
Yamaguchi University

【目的】マウス卵子の排卵後の経過時間および単為発生誘起方法が、卵子の誘起率および誘起後の卵子の単為発生パターンにどのような影響をおよぼすかを調べる目的で以下の実験を行った。

【材料と方法】Jcl:MCH(ICR)（6～12週齢）およびF<sub>1</sub>(C57BL/6NCrj×CBA/JNCrj)（8～16週齢）のマウスにPMSGとhCGで過剰排卵を誘起し、hCG投与14～22時間後に卵管膨大部より卵丘細胞・卵子複合体を採取した。卵丘細胞はヒアルロニダーゼ溶液(300IU/ml)で除去した。単為発生誘起は5uMイオノフォアA23187(IA)あるいは7%エタノールでそれぞれ5分間処理した後、M16培養液(Whittingham, 1971)を用いて、5%CO<sub>2</sub>・95%空気の加湿気相下で5時間培養し、単為発生の有無および単為発生パターンを記録した。採卵から単為発生誘起までは、DulbeccoのPBS(+)を用いた。

【結果と考察】(Table参照) (1) 単為発生誘起率について: IAおよびエタノールいずれの誘起方法においても、誘起率はhCG投与14時間後は0%、時間が経過するとともに増加し、18～22時間で最高値に達した(Kaufmann, 1978)。ICRとF<sub>1</sub>のマウス系統間およびcumulus-enclosed卵子とcumulus-free卵子の間にそれぞれ誘起率の差は認められなかった。(2) 単為発生パターンについて: 今回の実験では、IAあるいはエタノールにより単為発生誘起された卵子の64.3%～91.6%に第2極体の放出が認められた。エタノールによる誘起の場合、体外培養5時間後に分割している(immediate cleavage)卵子の割合は、hCG投与後18～20時間の群に比べて、22時間の群の方が高く、排卵後の時間が経過するとimmediate cleavage卵子の割合が増加する傾向が認められた(Kaufmann, 1978)。

## 【主要文献】

1. Kaufmann, M. H. (1978). The Experimental Production of Mammalian Parthenogenetic Embryos. In Method in Mammalian Reproduction, Edited by J. C. Daniel, Jr. New York, Academic Press, P21.
2. Whittingham, D. G. (1971). Culture of mouse ova. J. Reprod. Fertil., Suppl. 14, 7-21.

Table Activation response and in vitro development of mouse oocytes

Treatment mouse hours post hCG	activated(%) /treated	Morphological classification (%) <sup>#</sup>			
		1PN-2nd PB	OPN-2nd PB	2PN-non 2nd PB	Imme.Cle.
<b>I - A (cumulus-enclosed)</b>					
F <sub>1</sub>	14h	0/21 (0 )			
	16h	10/54 (18.5)	80.0	10.0	10.0
	20h	30/38 (78.9)	83.3	6.7	6.7
	22h	53/76 (69.7)	71.7	3.8	11.3
ICR	14h	0/23 (0 )			
	20h	27/33 (81.8)	88.9		11.1
	22h	27/38 (71.1)	77.8	11.1	11.1
<b>I - A (cumulus-free)</b>					
F <sub>1</sub>	20h	22/30 (73.3)	90.9		9.1
	22h	24/30 (80.0)	83.4	8.3	8.3
ICR	20h	20/32 (62.5)	55.0	20.0	25.0
	22h	24/33 (72.7)	66.7	12.5	20.8
<b>Ethanol (cumulus-free)</b>					
F <sub>1</sub>	20h	36/40 (90.0)	72.2	5.6	11.1
	22h	32/36 (88.9)	81.3		11.1
					18.7
ICR	14h	0/23 (0 )			
	16h	2/24 (8.3)		100	
	18h	28/30 (93.3)	75.0	3.6	10.7
	20h	33/35 (94.3)	87.9		12.1
	22h	41/45 (91.1)	68.3		31.7

# : Activated=100%

1PN-2nd PB : 1 pronucleus with 2nd polar body

OPN-2nd PB : no pronucleus with 2nd polar body

2PN-non 2nd PB : 2 pronuclei without 2nd polar body

Imme.Cle. : immediate cleavage

# ハムスター卵胞卵の卵核胞崩壊と体外成熟に及ぼすプロテインキナーゼ阻害剤の影響

Effects of protein kinase inhibitors on germinal vesicle breakdown and in vitro maturation of hamster follicular oocytes

堀内俊孝・建本秀樹・山田 學

Toshitaka HORIUCHI, Hideki TATEMOTO, Manabu YAMADA

広島県立大学 生物資源学部 生物資源開発学科

Department of Bioresources, Hiroshima Prefectural University

目的：哺乳動物の卵胞卵は、卵胞から遊離され適切な条件で培養されると、卵核胞の崩壊(GVBD)を生じ成熟分裂を再開する。その過程において、顆粒膜細胞と卵子の間で情報伝達が行なわれ、正常な卵成熟が起こる。最近、プロテインキナーゼによる蛋白リン酸化反応が細胞分裂の制御に関与していることが明らかにされ、成熟分裂過程における蛋白リン酸化の重要性が示された<sup>1)</sup>。

そこで、本研究はチロシンプロテインキナーゼ阻害剤Genistein、Ca<sup>2+</sup>-リン脂質依存性プロテインキナーゼ(PK-C)阻害剤H 7、サイクリックAMP依存性プロテインキナーゼ(PK-A)阻害剤 H 8を用いて、これら阻害剤がハムスター卵胞卵のGVBDと成熟に及ぼす影響を検討し、卵成熟におけるプロテインキナーゼの役割を明らかにすることを目的とした。

方法：発情周期第1日目の午前中にPMSG 35-40iuを成熟雌ゴールデンハムスターの腹腔内に注射した。PMSG投与後56～72時間に採取した卵胞卵をFSH(0.12iu/ml)とMEMアミノ酸添加Hepes-mTyrode培養液(glucose- & phosphate-free; PVP-40 1mg/ml)に移し、37°C空気下5%CO<sub>2</sub>の気相条件で培養した。卵胞卵は 卵丘細胞-卵子複合体または卵丘細胞除去卵子を用い、卵丘細胞の除去はピペッティングによる物理的な方法で行なった。(1)GVBDへの影響：Genistein(0, 10, 20, 30, 40 μg/ml)、H 7及びH 8(0, 25, 50, 75, 100 μM)加培養液で6時間培養後、卵子の核相をラクモイド染色し、鏡検した。また、卵丘細胞除去卵子を培養5時間まで経時的に観察し、GVBDの起こる時間を調べた。(2)成熟率への影響：H 7及びH 8(0, 25, 50, 75, 100 μM)加培養液で16時間培養後、卵丘細胞に囲まれた卵子と卵丘細胞除去卵子の核相を調べた。

結果：(1)GVBDへの影響：①卵丘細胞-卵子複合体では、Genisteinを0, 10, 20, 30, 40 μg/mlの濃度で添加したときGVBDの割合が各100%, 75%, 58%, 35%, 0%となり、卵丘細胞除去卵子と同様、添加量が増するに従ってGVBDは 抑制された( $ED_{50}=21.4\mu g/ml$ )。H 7とH 8は、0～100 μMまでの濃度ではGVBDを抑制しなかった。②卵丘細胞除去卵子のGVBD時間に及ぼす Genistein、H 7及びH 8の効果は、Fig. 1 に示した。Genisteinは、添加量の増加に従いGVBDの時間を遅延させ、40 μg/mlの濃度では

GVBDを完全に抑制した。H7とH8は、添加量に従いGVBDを多少遅延させるが、GVBDを抑制することはなかった。

(2)成熟率への影響：H7とH8の卵丘細胞-卵子複合体と卵丘細胞除去卵子の成熟率に及ぼす影響は、Fig. 2に示した。卵丘細胞-卵子複合体での

MⅡの割合は対照区(0μM/ml)で64.3%、H7の25, 50, 100μM添加で13.3%, 0%, 0%、H8の25, 50, 100μM添加で40.0%, 1.6%, 0%となり、H7またH8はMⅡへの成熟を抑制した。卵丘細胞除去卵子でのMⅡの割合は、対照区(0μM/ml)で91.7%、H7の25, 50, 100μM添加で43.3%, 10.0%, 2.3%、H8の25, 50, 100μM添加で50.0%, 60.9%, 22.6%と両者とも抑制的に働き、H7はH8より低濃度でMⅡ率を低下させた。

考察：本研究は、ブタ<sup>2)</sup>やマウス<sup>3)</sup>と同様ハムスター卵胞卵のGVBDがチロシンプロテインキナーゼ阻害剤Genisteinで抑制されることを示した。そ

して、蛋白リン酸化阻害によってもGVBDが阻害される<sup>4)</sup>ため、GVBDにチロシン蛋白リン酸化反応が関与することが考えられる。また、蛋白リン酸化阻害によるGVBD抑制の詳細な観察から、核膜は消失しないがクロマチンは凝縮することがブタ<sup>2)</sup>とマウス<sup>4)</sup>で認められた。しかし、ハムスターでは両者とも抑制された。H7とH8はGVBDより成熟(MⅡ率)に影響し、卵丘細胞の存在で成熟率の抑制は大きくなかった。また、H7による成熟率の低下が著しいため、MⅠからMⅡへの移行過程におけるPK-Cの役割(H7は一部PK-A阻害作用がある)が考えられる。今後、成熟に伴う蛋白合成やリン酸化の詳細な検討が必要である。

#### 主要文献：

- 1) Motlik J, Kubelka M.: Molec Reprod Develop, 27:366-375, 1990.
- 2) Jung T, Lee C, Moor RM.: J Reprod Fert, Abstr Seri, 7: P.33, 1991.
- 3) Kimura H, Endo Y, Fukuyama R, Obe M, Shimizu N, Suzuki S, Nozawa S.: Human Reprod, Abstr 7th World Congr IVF Assisted Procreation.: P.121.
- 4) Motlik J, Rimkevicova Z.: Molec Reprod Develop, 27:230-234, 1990.

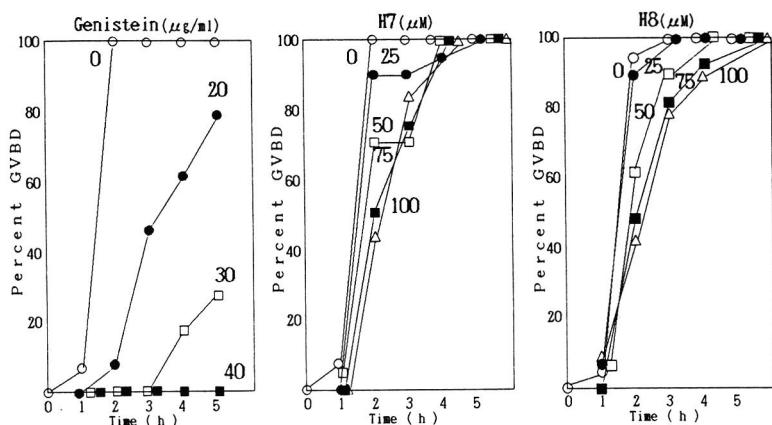


Fig. 1. Effects of genistein, H7 and H8 on GVBD of cumulus-free hamster oocytes

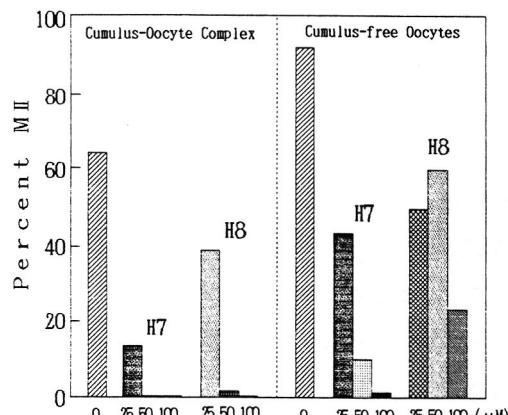


Fig. 2. Effects of H7 and H8 on the maturation rate of hamster oocytes

# 犬卵子の体外成熟

In Vitro Maturation of Canine Oocytes

山田秀一・島津美樹・川野裕子・内藤邦彦・豊田 裕・

Shuichi YAMADA, Yoshiaki SHIMAZU, Yuko KAWANO,  
Kunihiro NAITO, Yutaka TOYODA

\*株式会社富士生物科学研究所, \*\*東大医科研 獣医

\*Fuji Life Science Inc., \*\*Institute of Medical Science, Tokyo University

目的：体外培養による卵子の成熟誘起は、Pincus and Enzmanのウサギでの報告以来、多くの動物種で培養条件が好適であれば、卵核胞の崩壊に続き第2成熟分裂中期へ移行することが知られている。犬卵子の体外成熟は、演者らの体内成熟卵胞由来卵子の体外成熟とMahi and Yanagimachiの発情周期とは無関係に得た卵子の体外成熟があるのみである。彼女らは、得た卵子を72時間20%FCS加TCM-199培地で培養する事で第1成熟分裂中期と第2成熟分裂中期合せて25%と報告しているが、その詳細については不明の点が多い。そこで本実験では、発情休止期および黄体期のビーグル犬由来卵子を用いて、体外成熟を試みたので報告する。

方法：麻酔下のビーグル犬から外科的に卵巣を摘出し、硫酸ゲンタマイシン（50mg/L）を含む37°C生理食塩内で洗浄後、BSA 4mg/mlを含むPBS内で卵巣を細切し卵胞をパンクチャーする事で卵子を回収した。卵子は、卵丘細胞が密に5層以上あるものを選択した。得られた卵子は、新鮮培地で3度洗浄後、400ulの培地に約20個の卵子を入れ、37°C、5%CO<sub>2</sub>-95%空気の気相下で培養した。卵子の成熟用培地は、TYHの抗生素（ペニシリンGカリウム、硫酸ストレプトマイシン）を硫酸ゲンタマイシン（30mg/L）に修正し、10%のFCSを添加した培地を基礎培地（m-TYH）として用いた。

卵子の観察は、培養開始後0、24、48、72、96、120および144時間で倒立顕微鏡による卵丘細胞層の発育と膨化を指標として行った。さらに卵子のホールマウント標本をそれぞれの時間で作成し、酢酸：エタノール：クロロホルム（3:6:1）で脱脂、酢酸：エタノール（3:1）固定後、0.75%のオルセインを含む45%酢酸で染色し、卵子の成熟状態を調べた。卵子成熟における性腺刺激ホルモンの影響を調べる目的で、eCG（セロトロピン：帝國臓器）をm-TYHに10、20および40i.u./mlとなるように添加し、24時間毎に外観の観察を行い、培養後144時間で同様に染色標本を作成し検査した。eCG 20i.u./ml添加培地では、成熟速度を調べる目的でm-TYHと同様に培養後144時間まで24時間毎に観察および染色標本を作成し検査した。統計処理はχ<sup>2</sup>-testにて行った。

結果：m-TYHでの成熟率は、0～144時間の各時間で0～12%と低率に推移し、各時間群で有意差は認められなかった。卵丘細胞層の発育はシャーレ表面に平面的に発育するのみで、膨化は顕著に認められなかった。m-TYHに10、20および40i.u./mlのeCG添加培地144時間での卵丘細胞の膨化は、各添加群とも明瞭に認められ、卵子の成熟率は、それぞれ32.3、44.8および16.7%であった (Table 1)。eCG 20i.u. 添加培地での成熟率は他の実験群に比較し有意に高かった。eCG 20i.u. 添加培地での経時的観察では、第2成熟分裂中期に達する時間が培養開始後144時間であることが知られた (Table 2)。

考察：本実験で犬未成熟卵子を他の哺乳動物種と同様に卵胞から取り出し培養することによって成熟分裂を低率ながら再開させることができた。これはMahi and Yanagimachiの報告を確認したものである。さらに性腺刺激ホルモン (eCG) の添加によって卵丘細胞層の膨化を惹起し、成熟率が有意に高まることが明らかとなった。犬の排卵卵子は、卵核胞を有し卵管内で2～3日間経過した後に所謂、成熟卵（第2成熟分裂中期）になる特殊な動物であるため、今後さらに種々の性腺刺激ホルモンやステロイド等の卵子成熟におよぼす影響について検討を加えることによって犬の特殊な繁殖生理機構解明の手掛りになると考へる。

#### 主要文献：

1. Pincus, G. and E.V. Enzmann :The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. 1. The activation of ovarian eggs. J. Exp. Med. 1935; 62:665～675
2. Mahi, C.A. and Yanagimachi R. :Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes in vitro. J. Exp. Zool. 1976; 196:189～196
3. Yamada S. Shimazu Y. Kawaji H. Nakazawa M. Naitou K. Toyoda Y. :Maturation, fertilization, and development of dog oocytes in vitro. Biol. Reprod. 1992; 46:Accepted.
4. Toyoda Y. Yokoyama M. Hoshi T. :Studies of fertilization of mouse eggs in vitro. I. In vitro fertilization of eggs by fresh epididymal sperm. Jap. J. Anim. Reprod. 1971; 16:101～109

Table 1 In vitro maturation of canine oocytes in m-TYH

Culture period (h)	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes reached				
		Germinal vesicle	Metaphase I	Anaphase I	Telephase I	Metaphase II
24	95	90 (94.7)	3 (3.2)	0	0	2 (2.1)
48	91	84 (92.3)	0	1 (1.1)	0	7 (7.7)
72	107	92 (86.0)	2 (1.9)	0	0	13 (12.1)
96	86	82 (95.3)	0	0	0	4 (4.7)
120	88	80 (90.9)	1 (1.1)	0	0	7 (8.0)
144	79	72 (91.1)	0	0	0	7 (8.9)

Table 2 In vitro maturation of canine oocytes in m-TYH with 20i.u./ml eCG

Culture period (h)	No. of oocytes examined	No. of oocytes reached				
		Germinal vesicle	Metaphase I	Anaphase I	Telephase I	Metaphase II
24	24	24 (100)	0	0	0	0
48	28	28 (100)	0	0	0	0
72	43	35 (81.4)	0	0	0	8 (18.6)
96	43	35 (81.4)	1 (2.3)	0	0	7 (16.3)
120	30	23 (76.7)	0	2 (6.7)	0	5 (16.7)
144	116	64 (55.2)	2 (1.7)	1 (0.9)	0	52 (44.8)

# 豚卵胞卵子の体外成熟に及ぼすPMSGとhCGの影響

## Effects of PMSG and hCG on the Maturation of Pig Oocytes In Vitro

上田大・康承律・高木優二・保科和夫\*・辻井弘忠

Masaru UEDA, Seung-yul KAN, Yuji TAKAGI  
Kazuo HOSINA, Hirotada TSUJII

信州大学農学部生物資源開発学講座  
\*長野県畜産試験場

Division of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shinshu University  
\*Nagano Prefectural Animal Industry Experiment Station

**目的：**卵子の成熟において、成熟率及びその後の受精率を考慮すると、核の成熟だけでなく細胞質の成熟の重要性が示されている。一般に、*in vitro*での成熟培養に性腺刺激ホルモンを利用する場合には、FSHやLHが主として使われ、それぞれが単独であるかは同時に培養液に添加されている。

そこで本研究では、FSH様作用、LH様作用を持つとされているPMSGとhCGを*in vitro*での豚卵胞卵子の成熟培養に用い、成熟率およびその後の受精率に及ぼす影響について調べた。また、*in vivo*成熟卵子の採取時と同様に、PMSGとhCGを間隔的に卵子に投与するために、PMSGを添加した培養液で培養した後、hCGを添加した培養液に移しかえて培養した時の成熟率や受精率について調べた。

**材料及び方法：**ト場で入手した卵巣を、37℃に保温したPBS中に入れて研究室へ持ち帰った。直ちに直径2-5mmの卵胞から、18Gの針をつけた注射筒で卵胞卵子を吸引採取し、試験管に集めた。5-10分間静置した後、上澄みを捨て、新しくPBSを加えてガラスシャーレ上で顆粒膜細胞に緊密に包まれた卵母細胞のみを採集した。採集した卵母細胞はPBS及びTCM199中へ移しかえることによって洗浄し、任意に選抜して流動パラフィン下に用意した各実験区の培養液0.4ml中へ入れ、37℃、5%CO<sub>2</sub>、95%空気の条件下で72時間成熟培養を行った。各実験区の培養液は、TCM199+3mg/mlBSA+10%FCSを基礎培養液(BM)とし、これにPMSG(ピーメックス：三共ゾーキ)15IU、hCG(ペベローゲン：三共ゾーキ)15IUを添加する組み合わせによって以下の5つを設けた。(1)BMのみ(control(-))、(2)BM+PMSG+hCG(control(+))、(3)BM+PMSG(PMSG区)、(4)BM+hCG(hCG区)、(5)BM+PMSGで48時間培養した後、BM+hCGに移し替え、さらに24時間培養した(P-h区)。成熟培養終了後、一部はホールマウント法による標本を作成し、アセトアルコールにいれて固定した。

媒精には、長野県畜産試験場で種雄として使われているランドレース由来の射出凍結精液を用いた。解凍後、遠心分離による洗浄を3回繰り返した後、4×10<sup>8</sup>/mlの濃度で前培養を3時間行った。各実験区の卵子を流動パラフィン下の受精用培養液(BO液+5mMカフェイン+3mg/mlBSA)に移し、これに前培養した精液を2×10<sup>6</sup>/mlになるように導入して媒精を行った。卵子は、媒精後8時間目に発生培養液(TCM199+3mg/mlBSA+10%FCS)に移し変えた。媒精後15-18時間目にホールマウント法による標本を作成し、アセトアルコール中で固定した。成熟培養後及び媒精後にそれぞれ固定した卵子は、1%アセトオルセインで染色し頭

微鏡観察を行って成熟率及び精子侵入率を判定した。

**結果：**成熟率は、全供試卵中 AIから MIに成熟した卵子の割合で求めた(表1)。control(-)12.5%(2/16)、control(+)49.8%(48/98)、PMSG52.5%(32/61)、hCG31.1%(19/61)、P-h51.6%(33/64)となりcontrol(-)に比べ、他の処理区での成熟率は有意に高かった( $P<0.001$ )。また、hCG区に比べ、control(+)区、PMSG区、P-h区はそれぞれ有意に高かった( $P<0.05$ )。

精子の侵入率を表2に示した。control(+)61.4%(43/70)、PMSG36.8%(14/38)、hCG81.0%(34/42)、P-h81.3%(52/64)となり、PMSG区に比べ他の3つの処理区は有意に高かった( $P<0.05$ )。また、control(+)とhCG及びP-hの間にも有意差が見られた( $P<0.05$ )。

精子が侵入した卵は、その侵入精子数によって、単精子侵入卵(Mono sperm)と多精子侵入卵(Poly sperm)に分け、多精子侵入率を求めた(表3)。結果は、control(+)51.2%(22/43)、PMSG42.9%(6/14)、hCG64.7%(22/34)、P-h59.6%(31/52)となり、各実験区に有意な差は見られなかった。

**考察：**成熟培養において、PMSG及びhCGを添加しなかった培養液では成熟率が有意に低かったことから、PMSG、hCGの培養液への添加が豚卵胞卵子の成熟を促進することが示された。また、hCG区での成熟率はcontrol(+)、PMSG、P-hの各区よりも低かった。

これについては、LHサージが卵胞卵子の減数分裂を開始させることを考えると、さらに検討する必要があると思われる。

精子の侵入率は、PMSG区が他の区より有意に低く、成熟培養中のhCGの存在が受精率を促進すると考えられる。多精子侵入率には各区間で有意差がなかったことから、精子の侵入には卵子の成熟段階は影響しないことが示唆された。また、多精子侵入を防ぐためには、今回の研究で培養液に添加したBSA、FCS、PMSG、hCG以外の成分が関与すると考えられ、今後検討する必要がある。

PMSG添加培養液からhCG添加培養液への移し替えの試みは、成熟率においてcontrol(+)区及びPMSG区と有意差がなかったが、精子侵入率はcontrol(+)区、PMSG区よりも有意に高く、発生可能な正常受精卵を多く得るために有効であると考えられる。

今後は、全体的な成熟率を向上させるために、採集した卵胞卵子の選抜、さらにBSAやFCSのロット別の判定などについて検討する必要があると思われる。

#### 主要文献：

1. M. Mattioli, M.L.Bacci, G.Galeati and E.Seren :Effects of LH and FSH on the Maturation of Pig Oocytes In Vitro :Theriogenology 1991,36,95-105
2. K.Naito, Y.Fukuda and Y.Toyoda :Effects of Porcine Follicular Fluid on Male Pronucleus Formation in Porcine Oocytes Matured In Vitro: Gamete Research 1988,21,289-295

表.1 培養液の違いによる成熟率の比較

実験区	成熟率 (成熟卵/供試卵)
control(-)	2/16 (12.5%) <sup>c</sup>
control(+)	48/98 (49.0%) <sup>a</sup>
PMSG	32/61 (52.5%) <sup>a</sup>
hCG	19/61 (31.1%) <sup>b</sup>
P-h	33/64 (51.6%) <sup>a</sup>

ab ( $P<0.05$ ); ac, bc ( $P<0.001$ )

表.2 培養液の違いによる受精率の比較

実験区	受精率 (受精卵/供試卵)
control(+)	43/70 (61.4%) <sup>b</sup>
PMSG	14/38 (36.8%) <sup>c</sup>
hCG	34/42 (81.0%) <sup>a</sup>
P-h	52/64 (81.3%) <sup>a</sup>

ab ( $P<0.05$ ); bc ( $P<0.05$ ); ac ( $P<0.001$ )

表.3 培養液の違いによる多精子侵入率の比較

実験区	単精子 侵入卵	多精子 侵入卵	多精子 侵入率(%)
control(+)	21	22	22/43 (51.2%)
PMSG	8	6	6/14 (42.9%)
hCG	12	22	22/34 (64.7%)
P-h	21	31	31/52 (59.6%)

# 豚卵子の成熟分裂における $p34^{cdc2}$ キナーゼの活性化

Activation of  $P34^{cdc2}$  protein kinase activity  
in meiotic maturation of porcine oocytes

内藤邦彦<sup>1</sup> 青木不学<sup>2</sup> 崔 泰生<sup>2</sup> 東 貞宏<sup>1</sup>

山下正兼<sup>3</sup> 長濱嘉孝<sup>3</sup> 河本 馨<sup>2</sup> 豊田 裕<sup>1</sup>

Kunihiro NAITO, Fugaku AOKI, Taesaeng CHOI, Sadahiro AZUMA  
Masakane YAMASHITA, Yoshitaka NAGAHAMA, Kaoru KOHMOTO, Yutaka TOYODA

1 東京大学医科学研究所, 2 東京大学農学部, 3 国立基礎生物学研究所

1. Institute of Medical Science, University of Tokyo

2. Faculty of Agriculture, University of Tokyo, 3. National Institute for Basic Biology

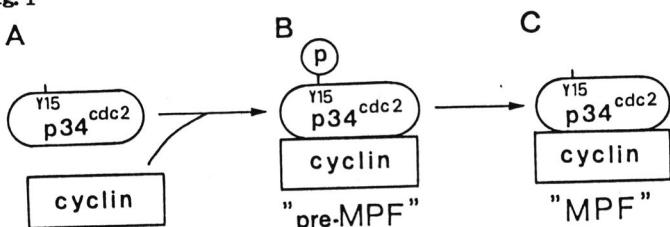
目的：哺乳動物の卵胞卵は、LH刺激あるいは卵胞から単離して培養することにより卵核胞崩壊(GVBD)を起し成熟することは多くの種に共通である。しかしGVBDに要する時間は種によって大差があり、マウスでは2時間であるのに対し豚では約24時間と著しく長い。また蛋白質合成を阻害した場合、マウスでは正常にGVBDが起るが豚ではGVBDが起らないことが知られている。これらはGVBDの制御に関し、動物種により違いがあることを示しているが、その実態は明かではない。本実験はこれらの違いの原因となる卵細胞内の相違を探ることを目的とする。

近年、減数分裂を含めた細胞分裂周期は成熟促進因子(MPF=ヒストンH1キナーゼ)により制御されていることが酵母やカエル、海産生物の卵子で明かとなってきた。即ち MPF活性の上昇が GVBD、さらには metaphaseを誘起し、この活性低下が metaphaseを脱出し anaphase に進むための必要十分条件であるとされ哺乳動物も例外ではない(1-2)。MPF は、キナーゼ活性ドメインを持ち細胞周期によって細胞内含量が変化しない  $p34^{cdc2}$  と細胞周期により含量が変動するサイクリンの2つの成分よりなる(Fig. 1;C)。MPF活性が現れるためには遊離の  $p34^{cdc2}$ (Fig. 1;A) がサイクリンと結合することが必要であるが、一般にサイクリンと結合すると、直ちに  $p34^{cdc2}$  の15番のチロシン(Y15) がリン酸化され不活性型の pre-MPFとなり(Fig. 1;B)，この Y15からリン酸がとれることによって活性型となる(Fig. 1;C)。従って Y15の脱リン酸化が MPF活性出現の調節段階となっている。これまでに調べられたマウス、カエル、海産生物の成長過程を終了した未成熟卵は pre-MPFを蓄えており、GVBDは Y15の脱リン酸化により引起されることが知られている。そこで

本実験では、成熟過程における豚卵子の  $p34^{cdc2}$  のリン酸化の状態を調べた。

方法： $p34^{cdc2}$  はそのリン酸化の状態によって SDS-PAGE の移動度が異なることが報告されている(1)。そこで成熟時間を追って豚卵子を SDS-PAGE にかけ

Fig. 1



抗 p34<sup>cdc2</sup>(PSTAIR)抗体によるimmunoblottingにより p34<sup>cdc2</sup>の移動度の違いを調べた。豚卵子の採取、成熟培養は既報(3)に従った。培養液には豚卵胞液(PMSG 1.0U/ml 添加)を用いた。培養開始後 0, 6, 12, 18, 24 時間後のGV卵、30, 36 時間後の第1減数分裂の中期(Met I), 36時間後の後期と終期(AT I), 及び48時間後の第2減数分裂の中期(Met II)の卵をヘキスト33342(10μl/ml)で染色後、蛍光顕微鏡で観察することによって選別した(2)。それぞれ20個の卵を1サンプル(30μl)とし、常法に従って処理した後SDS-PAGEにかけ、その後 Choi et al. (1)に従いimmunoblottingを行った。

結果: Fig. 2 に示した。採取

直後のGV卵は1本のバンドしか見られないが(lane 1), 時間を追って次第に移動度の遅いバンドが2本現れ(lane 2-4)24時間後には明らかに3本のバンドが見られた(lane 5; 上からU, M, Lとする)。GVBD後にはUが消え、MとLの2本になり(lane 6)

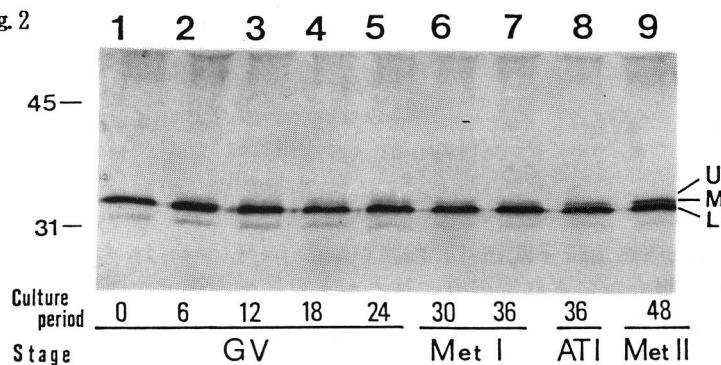
その後Mが次第に濃くなる傾向が見られたが、Met IIまでUが再び現れることはなかった(lane 7-9)。

考察: SDS-PAGEで見られた p34<sup>cdc2</sup>の3本のバンドのうち、U, Mは脱リン酸化酵素処理により消失することからリン酸化型であり、Lは脱リン酸化型であることが報告されている(1)。採取直後の豚未成熟卵ではLしか見られないことは、p34<sup>cdc2</sup>のY15がリン酸化された pre-MPFはこの時ほとんど存在しないことを示している。これは p34<sup>cdc2</sup>が遊離型(Fig. 1; A)で存在することを示唆しており、サイクリンが存在しないためと考えられる。その後次第にU, Mが現れてくることはリン酸化型の出現を示しており pre-MPFが産生されてくることを示唆している。Y15のリン酸化はサイクリンと結合した後でないと起らないことが知られているので、これは同時にサイクリンの産生を示すものと思われる(Fig. 1; B)。一方マウスでは採取直後の未成熟卵に、既に本実験の培養開始24時間後のものと極めて類似した3本のバンドが存在しており、その後培養2時間後には本実験同様Uが消失することが報告されている(1)。即ちマウスでは採取直後にすでにサイクリンを持っており、豚卵子の培養24時間後に相当する状態にあると考えられる。UとMがいかなるリン酸化状態の p34<sup>cdc2</sup>であるのか、また成熟に伴いMが増加することがどのような意味をもつかは現在の所不明である。MPF活性の上昇(GVBD)と共にUが消失することから、Uが実際の pre-MPFであると考えているが、これらの点は今後さらに検討する予定である。また第一減数分裂終了後にpre-MPF(U)が現れないことは既にマウスで報告されているが(1), 今回豚でも確認され、減数分裂の特徴と考えられ興味深い。

以上より、マウス未成熟卵には既に pre-MPFが存在するが豚では pre-MPFが存在せず、サイクリンの産生に伴ってこれが出現することが示唆された。成長過程を終了した未成熟卵が pre-MPFを持たない例はこれまで報告がなく、今回の豚が初めてである。このことはGVBDに要する時間がマウスの2時間に対し豚では約24時間であること、マウスでは GVBD に蛋白質合成を必要としないが豚では必要であることを説明し得るであろう。

#### 主要文献:

- Choi T., Aoki F., Mori M., Yamashita M., Nagahama Y. and Kohimoto K.: Activation of p34<sup>cdc2</sup> protein kinase activity in meiotic and mitotic cell cycles in mouse oocytes and embryos. Development 1991; 113: 789-795.
- Naito K. and Toyoda Y.: Fluctuation of histone H1 kinase activity during meiotic maturation in porcine oocytes. J. Reprod. Fertil. 1991; 93: 467-473.
- Naito K., Fukuda Y. and Toyoda Y.: Effects of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured in vitro. Gamete Res. 1988; 21: 289-295.



# 卵子形成過程における c-mos の発現に関する組織化学的解析

## Histochemical Analysis of c-mos Expression during Oogenesis

小瀬村伊久美<sup>1</sup>・大塚麻里子<sup>2</sup>・木村順平<sup>2</sup>・佐藤嘉兵<sup>1</sup>  
Ikumi KOSEMURA<sup>1</sup>, Mariko OHTSUKA<sup>2</sup>, Junpei KIMURA<sup>2</sup> and Kahei SATO<sup>1</sup>

日本大学農獸医学部 <sup>1</sup>動物細胞学研究室 <sup>2</sup>獣医解剖学研究室

<sup>1</sup>Department of Cell Biology and

<sup>2</sup>Department of Veterinary Anatomy

College of Agriculture and Veterinary Medicine

Nihon University

### 目的

c-mos原癌遺伝子産物は、細胞抑制因子(cytostatic factor:CSF)として生理的に機能していることが明らかにされており、ほとんどの脊椎動物や一部の無脊椎動物において未受精卵を第二減数分裂中期で停止させている<sup>1), 2)</sup>。またKeshetら(1988)<sup>3)</sup>は<sup>35</sup>S標識プローブを用いたin situ hybridization法によりマウス卵巣内でのc-mosの発現を検討している。本研究では、I. 卵母細胞の形成・成熟過程におけるc-mos mRNAの発現・局在について、組織標本の詳細な観察に適した非放射性プローブであるdigoxigenin標識DNAを用いたin situ hybridization法により解析し、II. その遺伝子産物の組織内局在についてポリクローナル抗体および単クローン抗体を用いて免疫組織化学的に解析した。

### 材料および方法

#### 組織切片の作製

シリアン系のハムスター(1, 3, 4, 5, 7, 9, 16, 21および24日齢)、BALB/c系マウス(1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 13, 16, 21および24日齢)の卵巣および成熟ハムスターの全身臓器をカルノア氏液で固定後、常法に従いパラフィン包埋とし、厚さ6 μmの連続切片にした。これをpoly-L-lysineにてコーティングしたスライドグラスに載せた。

#### In situ hybridization

pSP64に挿入されたc-mos cDNAを制限酵素 HindIIIおよびAva Iにより切り出し、マルチプライムラベリング法によりdigoxigenin標識したものをプローブとして用いた。切片は脱パラフィン処理後、0.2N HClおよびproteinase K(1 μg/ml)処理、4% パラフォルムアルデヒドで再固定後、0.2% glycineで残存するアルデヒドを中和した。これにdigoxigenin標識したcDNAプローブ溶液を載せ 37°C 15時間ハイブリダイゼーションを行なった。その後 50% formamideで洗浄し、アルカリフィオスファターゼ標識抗digoxigenin抗体あるいはペルオキシダーゼ標識抗digoxigenin抗体を反応させ、各々NBTとX-phosphate, DABとH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によりハイブリダイズされた部位を発色した。

#### 免疫組織化学

上述のパラフィン切片に対して抗c-mos産物ポリクローナル抗体(c-mosタンパク質に特異な16アミノ酸残基の合成ペプチドに対する抗体: CRB社製)を一次抗体として酵素抗体法PAP法で反応させた。また単クローン抗体(マウスp39<sup>mos</sup>のC末端: DLKAFRGALGを認識する: Dr. Vande Woudeより供与)についても酵素抗体法間接法で反応させた。尚、組織中の抗原性を賦活化させるために、6M Urea, 0.1%トリプシンあるいは0.4%ペプシン処理も試みた。

### 結果

マウス卵巣の組織切片において、c-mos mRNAのシグナルは卵母細胞に限局して観察され、卵胞上皮では認められなかった。5日齢頃の卵母細胞の核から徐々にシグナルが認められ、数層の卵胞上皮細胞を有する時期からグラーフ卵胞に成熟する過程で卵母細胞の細胞質全体に強くシグナルが観察された。その後卵管内卵ではあまり認められなくなった。一方ハムスター卵巣では、

## 結果:

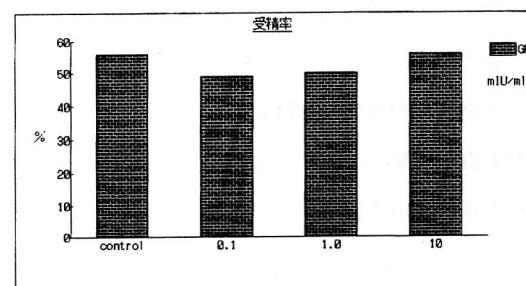
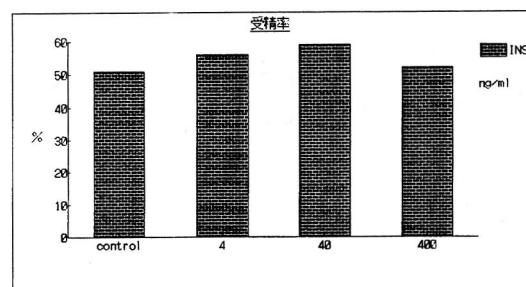
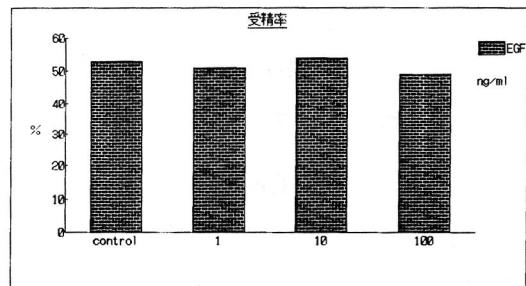
EGF添加では、対象群、EGF $1\text{ng/ml}, 10\text{ng/ml}, 100\text{ng/ml}$ の受精率はそれぞれ53%, 51%, 54%, 49%であった。insulin添加では、対象群、insulin $4\text{ng/ml}, 40\text{ng/ml}, 400\text{ng/ml}$ の受精率はそれぞれ51%, 56%, 59%, 52%であった。growth hormone添加では対象群、growth hormone $0.1\text{mIU/ml}, 1.0\text{mIU/ml}, 10\text{mIU/ml}$ の受精率はそれぞれ56%, 49%, 50%, 56%であった。対象群、EGF, insulin, growth hormoneの添加または各濃度間に有意な差を認めなかった。

## 考察:

近年、EGFやinsulinのようなgrowth factorと生殖領域の関連性が研究されてきた。人の排卵誘発・配偶子操作過程においても、growth hormoneの併用により、高い妊娠率を得たばかりでなく、健児を得た報告もある。今回、各種growth factorを用いて、マウスの成熟卵子の受精能を検討した。結果では、各濃度間に有意な差を認めず、また各種growth factor間にも有意な差を認めなかった。排卵後の成熟卵子はある一定の受精能を持ち、各種growth factorによる培養条件の変化に影響を受けない可能性がある。

## 主要文献:

- 1)Paria BC, Dey SK: Preimplantation embryo development in vitro: Cooperative interaction among embryos and role of growth factors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4756, 1990.
- 2)Early embryo development and paracrine relationships. eds. Heyner S. & Wiley LM (Wiley-Liss, New York, 1990). pp11-26, 125-136.
- 3)Colver RM, Howe AM, McDonough PG, Boldt J: Influence of growth factors in defined culture medium on in vitro development of mouse embryos. Fertil Steril 55:194, 1991.
- 4)Das K, Gagatz GE, Stout LE, Phipps WR, Hensleigh H, Leung BS: Direct positive effect of epidermal growth factor on the cytoplasmic maturation of mouse and human oocytes. Fertil Steril 55:1000, 1991.



# 受精時および単為発生時における マウス卵細胞内カルシウム濃度の変化

## Changes in Intracellular $\text{Ca}^{2+}$ in Fertilization and Parthenogenesis in Mouse Eggs

\*椎名有二・金田 誠・田中万博・土居勝彦・広井正彦

Yuzi SHIINA, Makoto KANEDA, Kazuhiro TANAKA,  
Katsuhiko DOI, Masahiko HIROI

山形大学医学部産科婦人科学教室

\*山形大学医学部第一生理学教室

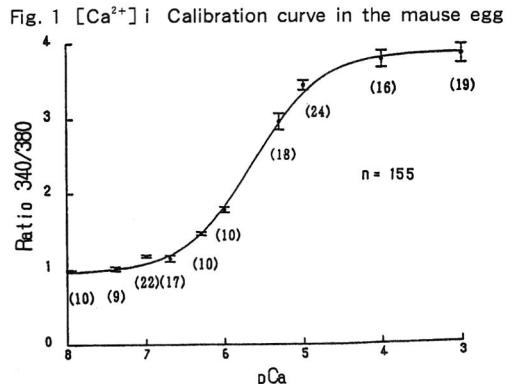
Department of Gynecology and Obstetrics Faculty of Medicine,  
Yamagata University

\*Department of Physiology of Medicine, Yamagata University

目的：哺乳動物卵細胞では、受精直後に細胞内カルシウム濃度( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ )が周期的な上昇を示すことが報告されており、この上昇が、受精初期の代謝に重要な役割を担っていると推測されている。本研究では、カルシウム感受性の蛍光色素Fura-2を用いた光学的測定法により、マウス未受精卵の受精時における $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化を直接観察した。また受精のモデルとして未受精卵を単為発生させ、この時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化と減数分裂再開の関係について検討した。

方法：B6C3F1雌マウスを過排卵させ、透明帯を除去した後に、カルシウム感受性の蛍光色素 Fura-2 AM を $5 \mu\text{M}$  30分間負荷した。この卵に340nmと380nmの励起光を照射し、得られた蛍光強度の比 (ratio) を用い、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を絶対的に観察した。ratioと $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の関係は *in vivo* calibrationによって求めた。まず細胞外カルシウム濃度( $[\text{Ca}^{2+}]_o$ )と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を ionomycin で等しい状態にし、この時の $[\text{Ca}^{2+}]_o$ と ratio の関係を求めた。Fig. 1 に示すように両者は  $p\text{Ca}_i = 5.63 + \log\{(3.87 - R)/(R - 0.95)\}$  の関係になった。受精時の変化は、媒精4分後から光学的測定を行ない測定終了後に卵の状態を観察した。単為発生の実験は、7%ethanolを3分間、あるいは $10 \mu\text{M}$ のA23187を3分間曝露し測定終了後に卵を観察した。

結果：媒精後4時間の観察では、第二極体の放出が65% ( $64/99$ ) の卵にみられた。これらの卵すべてにおいて、Fig. 2 に示すような $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の周期的な上昇が認められた。しかし極体放出のみられなかった卵においては、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に変化はなかった。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が開始するまでのタイミングは様々であったが、およそ50%の卵では30



分以内に反応が始まった。 $[Ca^{2+}]_i$ は一番最初に持続時間の長い一過性の上昇をし、その後持続時間の短い周期的な上昇を繰り返した。透明帯を除去してあり全ての卵は多精子受精になっていると考えられたが、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の型に違いは認められなかった。

7%ethanolを3分間曝露すると、90分後の観察で、46% (32/70) の卵に第二極体の放出が認められた。

Fig. 3 に示す様に、この時には曝露に一致して  $[Ca^{2+}]_i$ の一過性の上昇が認められた。別な单為発生源であるA23187を曝露した時にも、同様に曝露に一致した  $[Ca^{2+}]_i$ の一過性の上昇が認められた。しかしどちらの場合にも周期的な上昇は認められなかった。細胞外液のカルシウムを除いて同様の曝露をすると、曝露に一致して  $[Ca^{2+}]_i$ の一過性上昇が認められたが、非常に小さな上昇であった。Tab. 1 にそれぞれの反応における、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇のピーク値、持続時間、極体放出率をまとめた。

**考察：**マウスでは受精直後より、 $[Ca^{2+}]_i$ がまず一過性に大きく上昇し、その後持続時間の短い周期的な上昇を繰り返す。单為発生の実験より、第二極体の放出するわち第二減数分裂の再開には  $[Ca^{2+}]_i$ が一過性に充分大きく上昇することが必要であると考えられた。生理的な受精の過程では一番最初の持続時間の長い成分がこの減数分裂の再開に関係していると思われた。減数分裂再開に必要な  $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は、細胞外液に由来する成分と、細胞内ストアに由来する成分からなっていた。受精時ににおける  $[Ca^{2+}]_i$ の周期的な上昇は、発生の異なる機序の反映と考えられた。

#### 主要文献：

1. Cuthbertson, K.S.R. and Cobbold P.H. Phorbol ester and sperm activate mouse oocytes by inducing sustained oscillations in cell  $Ca^{2+}$ . Nature Lond. 1985; 316: 541-542
2. Igusa, Y. and Miyazaki S. Periodic increase of cytoplasmic free calcium in fertilized hamster eggs measured with Calcium-sensitive electrodes. J. Physiol. Lond. 1986; 377: 193-205
3. Miyazaki, S., Hashimoto N., Yoshimoto Y., Kishimoto T., Igusa Y. and Hiramoto Y. Temporal and spatial dynamics of the periodic increase in intracellular free calcium at fertilization of golden hamster eggs. Develop. Biol. 1986; 118: 259-267

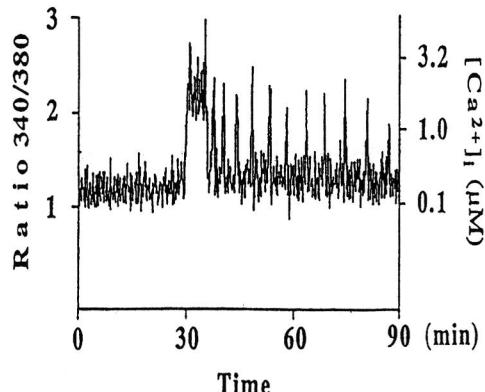
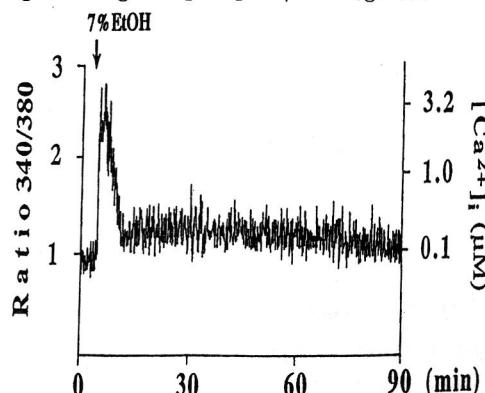
Fig. 2 Changes in  $[Ca^{2+}]_i$  in fertilizationFig. 3 Changes in  $[Ca^{2+}]_i$  in parthenogenesis

Table 1

	Peak $[Ca^{2+}]$ ( $\mu M$ )	Duration (sec)	Extrusion of 2nd Polar Body
<b>Insemination</b>			
Control	2.1 ± 1.1	320 ± 100	100 % (30/30)
<b>Ethanol</b>			
Control	3.6 ± 2.4	460 ± 70	46 % (32/70)
Ca-free HTF	0.5 ± 0.3	150 ± 20	0 % (0/20)
<b>A23187</b>			
Control	4.1 ± 2.4	540 ± 120	50 % (9/18)
Ca-free HTF	0.7 ± 0.2	360 ± 160	0 % (0/5)

# マウス胚性幹細胞の核移植の試み

Nuclear transplantation of embryonic stem cells in the mouse

角田幸雄・加藤容子

Yukio TSUNODA and Yoko KATO

近畿大学農学部畜産学教室

Laboratory of Animal Reproduction, College of Agriculture,  
Kinki University

目的：胚性幹細胞（ES細胞）は、胚盤胞から分離される細胞で、内細胞塊由来の細胞が培養条件に適応して分化が休止した状態で増殖を続けるようになったものと考えられている。ES細胞は正常な核型を維持し、多能性を有する細胞である。すなわち、胚盤胞へ注入したりあるいは8細胞期胚と集合したのち受卵雌へ移植するとキメラ個体が得られ、またその生殖系列にとりこまれる場合が多い。このことから、ES細胞に外来遺伝子を導入し、培養条件下で遺伝子が導入された細胞を選別したのち、これらの細胞を用いてトランスジェニックキメラマウスが作出されている。ついで、このキメラを他の系統のマウスと交配させてF<sub>1</sub>を得、雌雄のF<sub>1</sub>同士を交配すると25%の確立で導入遺伝子をホモに持つトランスジェニックマウスが作出される。さらに、相同遺伝子組み換え法を用いることによって、目的とする遺伝子を破壊し、遺伝子の発現や機能を調べたりあるいは多様な疾患モデルマウスが作出されている。キメラを介したトランスジェニックマウス作出法は、従来の前核へのマイクロインジェクション法に比べてきわめて有用ではあるが、生殖系列キメラの作出率が高いES細胞の樹立が容易ではなく、またF<sub>2</sub>個体を得て初めて外来遺伝子をホモに持つ個体が得られるなどの欠点がある。本研究は、核移植によってES細胞由来の個体を直接作出することを目的として、まず核移植に必要な条件設定を行ったのでその概要を報告する。

方法：樹立したES細胞（F1/1, Tokunaga and Tsunoda, 未発表）を、胎子期生殖細胞の場合と同様に除核未受精卵細胞質に不活性化HVJとPHAを用いて接着させ、エタノールによって単為発生刺激を与えたが核は全く形成されなかった。そのため、これらの処置卵にさらに電気刺激を与えた。すなわち、100～140V/mmの直流を30～100μsec 2回通電してこの処置を1時間間隔で2回繰り返した。ついで、核の形成の有無を検討し、常法に従って4日間体外培養して胚盤胞への発生能を調べた。

結果：表に示すように、核形成率は100V-30μsec区で42%と他の区の18～27%に比べて最も高かっ

た。しかしながら、再構築卵の2細胞期への発生率は100V-30μsec区で38%と他の区の53~67%に比べて逆に最も低かった。これらの再構築卵のうち 7~33%が4細胞、8細胞、桑実胚を経て胚盤胞へ発育した。

以上の結果より、最も良い電気刺激条件は100V-30μsec または100V-50μsec であることが判明した。現在、核形成率ならびに発生率をさらに高めるための工夫を継続して実施中である。

#### 主要文献

1. Tsunoda, Y., Tokunaga, T., Imai, H. and Uchida, T.: Nuclear transplantation of male primordial germ cells in the mouse. *Development* 1989, 107 : 407-411.
2. Kato, Y. and Tsunoda, Y.: Several factors affecting the nuclear formation after nuclear transfer of male fetal germ cells into enucleated eggs in the mouse. *日本不妊会誌*, 投稿中

表 マウス胚性幹細胞の核移植

電圧 (V/mm)	通電時間 (μsec)	核形成卵数/ 供試卵数(%)	発育卵数(%)	
			2細胞	胚盤胞
100	30	26/ 62(42)	10(38)	4(15)
	50	18/100(18)	11(61)	6(33)
140	30	15/ 56(27)	10(67)	1( 7)
	50	19/ 94(20)	10(53)	3(16)
	100	10/ 55(18)	6(60)	0

# ウシにおけるE S 細胞株作出の試み

An attempt for the establishment of bovine ES cells

高橋清也・今井 裕

Seiya Takahashi and Hiroshi Imai

農林水産省 畜産試験場

National Institute of Animal Industry

マウスにおける胚性幹細胞(ES cell)樹立<sup>1, 2)</sup>の報告以来、種々の動物種においてES cellの作出の試みがなされている。これまでに牛においてはES cell様の形態を持った細胞株が得られている<sup>3)</sup>が、安定的に樹立・継代可能な培養条件については不明な点が多い。本研究では、牛の胚盤胞期以降の胚を用いてES cell分離を目的とした培養条件の検討を行った。

材料および方法：常法により卵巣から採取した未成熟卵を体外成熟・体外受精・体外培養して作出した胚盤胞期以降の胚を試験に用いた。【試験1】種々の単層培養細胞上で脱出胚盤胞を培養し、胚の接着および胚細胞の増殖を観察した。用いた培養細胞は、牛卵丘細胞(BC)、マウス胎子線維芽細胞(MF)、牛胎子線維芽細胞(BF)の3種類で、MFおよびBFはマイトイシンC処理後実験に供した。培養にはLIF( $1 \times 10^3$  U/ml)を添加したマウスES cell用培養液(ES medium)を用い、39°C(BC, BF)または37°C(MF)、5%CO<sub>2</sub>、95%空気下で行った。【試験2】種々の培養液を用いて脱出胚盤胞を培養し、胚の接着および胚細胞の増殖を観察した。用いた培養液はTCM199+10%および20%牛胎子血清(FCS)(199-10および199-20)、DMEM+20%FCS(DMEM)、RPMI1640+20%FCS(RPMI)、[RPMI1640:DMEM=1:1]+20%FCS(RD)、ES medium(ES)である。培養はMFをフィーダー細胞として37°Cで行った。【試験3】脱出胚盤胞を無処置のまま、またはトリプシン処理あるいはマニピュレータによる物理的切断後ピペッティングにより細胞を分離し、その後の増殖を観察した。培養はES mediumを用いMFをフィーダー細胞として37°Cで行った。【試験4】体外受精後7-8日の拡張胚盤胞(0.5%プロナーゼにより透明帯を除去)または8-9日の脱出胚盤胞をトリプシン処理とピペッティングにより細胞を分散させ、その後の増殖を観察した。培養はES mediumを用いMFをフィーダー細胞と

して37°Cで行った。

結果：【試験1】BC上で脱出胚盤胞を培養した結果、33/38例が接着した。そのうち23例で栄養膜細胞(Tr)が円盤状に増殖し、10例で内部細胞塊(ICM)の増殖が認められた。しかしながらICMの増殖の程度は極めて緩慢で、Trとは形態的に異なる小型で細胞境界が不明瞭な細胞集落(コロニー)状に発育したものは4例のみであった。その4例を新たなBC上に継代培養したがコロニー形成は認められなかった。一方、MFおよびBF上で培養した場合、それぞれ20/25および16/18例が接着した。MF、BFいずれも14例でTrの増殖が認められ、さらに7例および3例でICMの増殖が認められた。その後コロニー状に4例および2例が増殖したが、継代培養後に消失した。【試験2】種々の培養液で脱出期胚盤胞を培養した結果、フィーダー細胞上に接着した胚の数は199-10、199-20、DMEM、RPMI、RDおよびESでそれぞれ4/6、5/7、6/8、2/4、3/5および12/12例であった。これらのうちICM細胞の増殖が認められたものは199-10の1例、199-20の2例、DMEMの2例およびESの4例で、さらにコロニー形成に至ったものは199-20およびESのそれぞれ1例のみであった。これらを培養6日目に継代培養したが、Trの増殖は認められたもののコロニーの形成は認められなかった。【試験3】脱出胚盤胞をトリプシン処理または物理的切断により分離し培養した結果、培養3-4日にTrの増殖(トリプシン処理12/12例、切断・分離6/6例)およびコロニー形成(トリプシン処理6例、切断・分離4例)が認められた。これらのコロニーを培養6日に継代したところ、それぞれ2例で再度コロニーの増殖が認められたが、継代後4-5日に上皮細胞様の形態に分化し増殖が停止した。【試験4】透明帯を除去した拡張胚盤胞および脱出胚盤胞をトリプシン処理とピペッティングにより分離し培養した結果、いずれも6/6例でTrの増殖が認められ、2例および3例でコロニー形成が認められた。しかしその後の継代によりいずれも分化あるいは消失した。

考察：牛胚性幹細胞作出のための体外培養条件についていくつかの要因を検討した。その結果、フィーダー細胞として新鮮マウス胎子線維芽細胞を用い、培養液としてTCM199+20%FCSあるいはES mediumを用いることによって効率良くコロニーの形成が認められた。また、無処置の胚を培養するよりも胚細胞を分離して培養する方がコロニーの形成が良好であることが明らかとなった。しかし、今回認められたコロニーは増殖が極めて緩慢で、さらに継代培養の途中でいずれも分化あるいは消失しており、細胞の増殖刺激を含めた培養方法および継代の時期あるいは方法についてさらに検討が必要であると考えられる。

- 1) Evans, M. J. & Kaufman, M. H. (1981) Nature 229, 154-156
- 2) Martin, G. R. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78, 7634-7638
- 3) Strehenko, N. et al. (1991) Theriogenology 35, 274

# 除核未受精卵の体外受精により作出した マウス雄性発生胚の発生能

Development of mouse androgenetic embryos produced by  
in vitro fertilization of the enucleated oocytes

河野友宏・佐藤靖弘・外丸祐介・中原達夫

Tomohiro KONO, Yasuhiro SATO, Yusuke SOTOMARU and Tatsuo NAKAHARA

東京農業大学総合研究所

NODAI Research Institute, Tokyo University of Agriculture

[目的] 哺乳動物における雄性発生胚に関する研究は、胚発生における雄性ゲノムの役割を明らかにする上で興味深い課題であるが、雌性発生胚が比較的容易に作出されるのに対し、その作出方法には問題を残している。マウスでは、前核期卵の雌性前核を除去して半数体雄性発生胚を、これに他の胚の雄性前核を核移植してヘテロ2倍体の雄性発生胚がそれぞれ作出されている<sup>1)</sup>。しかし、前核期において雌雄前核を正確に判別することは必ずしも容易ではなく、誤って雌性発生胚や雌雄両前核を持つ胚が作出されたことも報告されている。そこで、我々は、マウス雄性発生胚の作出を目的に、除核未受精卵を作出後、体外受精に供試し、精子濃度と受精率、単精子受精卵および2精子受精卵の出現率、ならびに得られた雄性発生胚の発生能について調べた。

[方法] 成熟F1 (C57BL/6JxCBA) 雌マウスに過剰排卵処置し、hCG 投与14時間目に排卵卵子（第二成熟分裂中期卵）を採取し、Hyaluronidase (300IU/ml)を含むM2液にて卵球細胞を除去した。第二成熟分裂中期卵では、染色体の存在する部位が受精丘様に突出しているので、これに隣接する透明帯の部位を正確に切断した。ついで、卵子をCytochalasin B (5μg/ml) を含むM2液に小滴中に移し、微分干渉器付き倒立顕微鏡下で、染色体を除核ピペットを用い直接吸引除去した。精子は、F1雄マウスの精巣上体精子を TYH培養液を用い1時間前培養した後、精子濃度を10、100、500および1000x10<sup>4</sup>/mlになるよう調整して、媒精に供試した。媒精4時間後に、卵子をM16培養液に移して、さらに4時間培養後に受精検査を行い、前核数により単精子受精と多精子受精を判定した。得られた雄性発生胚は、37°C、5%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>、90%N<sub>2</sub>の条件下で5日間培養し胚盤胞への発生を調べた。また、単精子受精胚を Cytochalasin B (5μg/ml) を含むM16液にて12時間培養して第一分裂を抑制するか、あるいは2細胞期に電気刺激 (150V, 100μsec x2) を与え細胞融合を誘起して、ホモ2倍体の雄性発生胚を作出し発生能を比較検討した。

[結果] 除核未受精卵の受精率は、精子濃度 $10 \times 10^4 \sim 1000 \times 10^4 / \text{ml}$ のいずれの条件において、87%～99%と高い値であった。受精卵のうち、1前核を形成し单精子受精と見なされた卵子の率は、精子濃度 $10 \times 10^4 / \text{ml}$ の条件で87%と最も高い値を示し、精子濃度の上昇に伴い低下した。一方、2前核を形成し2精子受精と見なされた卵子の率は、精子濃度 $500 \times 10^4 / \text{ml}$ で最も高く43%であった。また、少数例ではあるが、4前核を有する卵子が観察された。单精子受精による半数体雄性発生胚では、発生の進行に伴い漸次発生を停止したが、11%が胚盤胞にまで発生した。一方、2精子受精によるヘテロ2倍体雄性発生胚の発生能は、半数体に比べて明らかに高く、43%が胚盤胞に発生した。これに対し、ホモ2倍体の発生率は半数体の場合同様に低く、12%が胚盤胞に発生したに過ぎず、2倍体化による発生率の改善は全く認められなかった。

[考察] マウス除核未受精卵の体外受精を試みた結果、除核未受精卵は除核により受精能を損なうことなく、体外受精により高率に受精して雄性発生胚となること、また、媒精時の精子濃度を調節することにより、半数体およびヘテロ2倍体の雄性発生胚を効率的に作出できることが明らかとなった。多精子受精は、透明帯

を切断したのみの対称区においても高率(44%)に認められたことから、除核未受精卵における多精子受精率の上昇は透明帯の切断の影響によるものであると考えられた<sup>2)</sup>。今回作出した雄性発生胚の体外培養における発生成績を見ると、これまで報告されている成績<sup>1, 3, 4)</sup>に比べ、むしろ優れており、雄性発生胚の発生特性に関する研究に十分利用できることが示された。

Table 1. The rate of fertilization and polyspermy of enucleated mouse oocytes at various sperm concentrations

Sperm conc. ( $\times 10^4 / \text{ml}$ )	Fertilized oocytes (%)	Polyspermic oocytes (%)			
		1mPN <sup>1)</sup>	2mPN	3mPN	4mPN
Control	139/139(100)	78 (56)	57 (41)	4 (3)	0 (0)
10	149/171 (87)	130 (87)	17 (11)	2 (1)	0 (0)
100	116/117 (99)	61 (53)	41 (35)	11 (10)	3 (3)
500	176/180 (98)	68 (39)	77 (43)	26 (15)	5 (3)
1000	114/117 (97)	48 (41)	51 (45)	14 (12)	1 (1)

1) Male pronuclei

Table 2. Development of mouse androgenetic embryos in vitro

Types of androgenone	No. of eggs cultured	Development (%)				
		2-cell	4-cell	8-cell	Morula	Blast.
Haploid	307	295(96)	247(81)	180(59)	92(30)	33(11)
Hetero. diploid	186	149(80)	142(76)	129(65)	100(54)	80(43)
Homo. diploid	277	241(87)	157(57)	94(34)	72(26)	33(12)

## 文 献

- 1) McGrath and Solter (1984) Cell 37: 179-183.
- 2) Depypere et al. (1988) J. Reprod. Fert. 84: 205-211.
- 3) Surani et al. (1984) Nature, Lond. 270: 601-603.
- 4) McGath and Solter (1986) J. Embryol. exp. Morph. 97 supplement, 277-289.

# ウシ核移植卵の体外発生能に及ぼす融合時期 ならびに培養液の影響

Effects of timing of fusion and culture medium on the development of bovine eggs receiving blastomeres from 16~32-cell embryos in vitro.

加藤容子・新田良平・高野博\*・角田幸雄

Yoko KATO, Ryohei NITTA, Hiroshi TAKANO\*, Yukio TSUNODA

近畿大学農学部畜産学教室, \*奈良県畜産試験場

Laboratory of Animal Reproduction, College of Agriculture, Kinki University,  
\* Nara Prefectural Livestock Experimental Station

目的：近年、細胞核の発生能を検討する目的としてあるいはクローン動物作出の手段として、除核した未受精卵をレシピエント細胞質に用いる核移植が盛んに行われている。ウシでは64細胞期胚由来の産子が得られており、また胚盤胞内細胞塊細胞の核移植も試みられている。しかしながら、その発生率は低くさらに核移植時の諸条件を検討する必要があると思われる。最近、ドナー細胞とレシピエント卵細胞質との融合時期を遅らせるとその後の発生に効果的であるという報告や、また、superoxide dismutase(SOD)<sup>1)</sup>を培養液に添加するとマウスの「in vitro 2-cell block」現象を解除する効果のあることが報告されている。そこで、本実験では融合時期ならびにホルモン(LH, FSH, エストラジオール)やSODおよびグルコースの代わりにグルタミンを添加した培養液が、ウシ核移植卵の体外発生能に及ぼす影響について検討した。

方法：卵子は、ウシ卵巢の小卵胞より卵胞卵を吸引採取し、5%子牛血清(CS)を添加した培養液で22時間体外成熟させたのち、ヒアルロニダーゼ処理により卵丘細胞を除去した。ついで、第一極体を放出した卵子を選別し、5~20%のCSを添加したPBSあるいはPBIで洗浄後、サイトカラシンBおよびノコダゾールを添加した同液のドロップ内に移して室温で15分間静置した。それらの卵子は既報に従って除核し、体外受精由来の16~32細胞期胚の单一割球を団卵腔内に注入した。核移植後、再構築卵を0.3Mシュークロース液(Ca, Mg加)を満たしたチャンバー内に移して、15~20Vの交流電流を10~15sec与えたのち、75V/mm, 50μsecの直流電流を2回通電して単為発生誘起ならびに融合処置を行った。処置後1時間目に観察し、融合していない卵子については同条件で再び刺激を与えた。また、培養条件はいずれも卵丘細胞との共培養系を用いたが、5%CS加TCM199液を基

本液として①無添加, ②ホルモン添加, ③SOD添加, ④ホルモンおよびSOD添加, また, グルコースの代わりにグルタミンを添加した5%CS加M16液を基本液として⑤無添加, ⑥SOD添加の6区を設け, 各区についてそれぞれ電気刺激を成熟培養開始後①30時間目あるいは②40時間目に行った合計12区を設定して検討した。

結果: 表1に結果を示した。表に示すように, TCM199液を用いた場合, 融合時間の違いによって融合率に差はみとめられなかつたが, ③区および④区においては融合処置を40時間目に行った区で2細胞期への発生に有意な差がみとめられた。また, 8細胞期以降への発育は③区を除いて40時間目に融合処置を施した区で高い傾向がみられた。ホルモン添加については, 効果がみとめられなかつた。また, グルコースの代わりにグルタミンを添加したM16液を用いた場合, 16細胞期以降へ発育した胚はみとめられなかつた。

考察: 以上の結果より, 核移植卵の体外発生能に及ぼす融合時間の影響は, 成熟培養開始後30時間目よりも40時間目の区で発生率が高くなる傾向がみられた。また, グルコースの代わりにグルタミンを添加したM16液はウシ核移植卵の培養に適さないこと, 培養時のホルモンやSODの添加は発生能を向上させる効果のないことが明らかとなつた。

<sup>1)</sup> Y. Umaoka, Y. Noda, K. Narimoto and T. Mori(1992): Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. Mol Reprod Dev 31:28-33.

表1. 牛核移植卵の体外発生に及ぼす融合時期ならびに培養液の影響

培養液			成熟率 (%)	融合時間	融合卵数／供試卵数 (%)	発生胚数 (%)		
	ホルモン	SOD				2細胞期	8～16細胞期	桑実胚～胚盤胞
199	—	—	76	30	31/68(46)	18(58)	7(23)	2( 6)
	—	—		40	22/65(34)	18(82)	7(32)	4(18)
	+	—	77	30	30/56(54)	14(47)	4(13)	1( 3)
	+	—		40	27/53(51)	17(63)	5(19)	3(11)
	—	+	76	30	24/42(57)	11(46)	2( 8)	1( 4)
	—	+		40	14/42(33)	12(86)	1( 7)	0( 0)
	+	+	76	30	14/37(38)	5(36)	1( 7)	0( 0)
	+	+		40	16/38(42)	12(75)	3(19)	2(13)
M16	—	—	63	30	19/45(42)	12(63)	0( 0)	—
	—	—		40	18/37(49)	11(61)	0( 0)	—
	—	+	66	30	17/55(31)	8(47)	0( 0)	—
	—	+		40	18/48(38)	12(67)	3(17)	0( 0)

# ダルベッコ修正培養液を用いた キメラマウス胚の培養成績

## Results of Culture of Chimeric Mouse Embryos in a Modified Dulbecco's Medium

高橋正浩・石原由美・高橋壽太郎・安田泰久

Masahiro TAKAHASHI, Yumi ISHIHARA  
Jutaro TAKAHASHI, Yasuhisa YASUDA

岩手大学農学部動物育種学教室

Laboratory of Animal Breeding, Faculty of Agriculture, Iwate University

目的：Tarkowskiが、マウスを使用して哺乳類における最初のキメラ動物の作出に成功して以来、今日まで、様々な技術の改良が行われてきている。培養についても同様に、多数の哺乳動物卵子の培養例が報告されているが、完全な培養技術というものは確立されておらず、多くの基礎的問題について研究が進められている。初期胚は、一般の細胞・組織とは異なり、数が限定されていることから、採取法、操作法、培養法などに種々の工夫がなされている。本研究は、キメラマウス作出を試みるための基礎研究として、特に、ダルベッコ修正培養液を使用して、初期発生段階における体外培養でのマウスキメラ胚の発生について検討を試みたものである。

方法：BALB系ならびにC57BL系4週齢の雌マウスにPMSGとhCGを48時間間隔で投与、hCG投与後直ちに同系成熟雄マウスと同居させ、妊娠3日に卵管および子宮より4から16細胞期胚を灌流法で回収した。子宮および卵管の灌流、胚の回収、

胚の培養は、ダルベッコ修正培養液(modified Dulbecco's medium)を使用した。キメラ胚の作出は、集合法によって行った。透明帶除去にはpronase含有培養液を用い、胚の集合にはphytohemagglutinin P含有培養液を用いた。培養

Table 1. Development of normal embryos in vitro culture.

Type of embryos	No. of embryos	Final developmental stages			Total(*)%	Degeneration(%)
		Morula(%)	Blastocyst(%)	Expanded blastocyst(%)	Hatched embryo(%)	
<b>BALB</b>						
4-cell	44	3 (6.8)	5 (11.4)	24 (54.6)	9 (20.5)*	38 (86.4)
8-cell	75	6 (8.0)	4 (5.3)	32 (42.7)	32 (42.7) <sup>b</sup>	68 (90.7)
16-cell	60	3 (5.0)	3 (5.0)	28 (43.3)	27 (45.0) <sup>b</sup>	56 (93.3)
<b>C57BL</b>						
4-cell	87	3 (8.1)	4 (10.8)	19 (51.4)	9 (24.3)*	32 (86.5)
8-cell	66	5 (7.6)	4 (6.1)	27 (40.9)	29 (43.9)	60 (90.9)
16-cell	72	4 (5.6)	4 (5.6)	31 (43.1)	33 (45.8)*	68 (94.4)

Significance of difference between a and b ( $P < 0.025$ ), between a and c ( $P < 0.05$ ).

\*: Total of over-blastocyst stage.

は流動パラフィンに覆われたウシ血清アルブミン含有培養液の小滴内で行った。

24時間から48時間培養したキメラ集合胚を仮親の子宮角へ移植した。仮親にはICR系の雌を用い、正常雄と交配した正常妊娠、または、精管結紮雄と交配した偽妊娠3日目に胚を移植した。

**結果：体外培養におけるキメラ胚の統合胚盤胞以上の発生率は、4細胞期胚同士の集合胚で82.2%、8細胞期胚同士で89.1%、16細胞期胚同士で84.7%となり（Table 2）、単一の通常胚（Table 1）と比較して有意な差は認められなかった。キメラ胚の発生を8細胞期胚同士について経時的に検討すると、統合胚盤胞への発生率は培養12時間で0%、24時間で25.4%、36時間で80.4%となり（Table 3）、発生速度の遅延が認められた。偽妊娠仮親への胚の移植後、7匹すべてにおいて発情回帰が認められ、4匹において出血・流産が観察された。**

**考察：**胚の培養成績が高率であったにもかかわらず、移植胚に由来する産子が認められなかった原因として、正常妊娠仮親へ移植した場合に正常な分娩と同じ産子数が得られたことを考慮すると、移植胚そのものの発生能力が失われた可能性が示唆された。他の培地の報告と比較し発生に時間を要することが、移植後の胚の発生に影響を及ぼしているものと思考された。

使用したダルベッコ修正培養液は8細胞期以前の胚の培養では発生速度の遅延が生じ、16細胞期以降の胚の培養に、より適することが示唆された。

#### 主要文献：

1. Tarkowski, A. K. : Mouse chimaeras developed from fused eggs. *Nature* 1961 ; 190:857-860.
2. Mullen, R. J. and Whitten, W. K. : Relationship of genotype and degree of chimerism in coat color to sex ratios and gametogenesis in chimeric mice. *J. Exp. Zool.* 1971 ; 178:165-176.

# 卵細胞質内精子核注入による受精へのCa-ionophore前処理の影響

## The Effect of Ca-ionophore Pretreatment of Oocytes on Microfertilization

柳田 薫・片寄治男・市川文隆・阿部利明・星 和彦

Kaoru YANAGIDA, Haruo KATAYOSE, Humitaka ICHIKAWA,  
Toshiaki ABE, Kazuhiko HOSHI

福島県立医科大学産科学婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology, Fukushima Medical College

目的：哺乳動物精子の卵細胞質内顕微注入法による受精では受精率の低下が観察される。この方法では精子一卵子原形質膜の癒合など多くの過程をバイパスするので、受精機転の何かが欠落している可能性が考えられる。受精で卵子の賦活が起こると表層顆粒の消失と第2極体の放出が起こる。これらの現象は卵子賦活の良い指標と考えられているが、ハムスターでこの顕微授精法を行うと第2極体の放出は起こるが表層顆粒の消失は軽微であり、この方法では卵子を賦活する刺激が不足していることが推測される。そこで、卵子の賦活を誘起するCa-ionophore（以下 A23187）で処理<sup>1)</sup>したハムスター卵子にこの顕微授精法を行い、その効果を検討した。

方法：ハムスター未受精卵は PMS-HCG で過排卵処理して、卵管より HCG 投与の15時間後に採取し、0.1%ヒアルロニダーゼで卵丘細胞を除去した。卵子は1時間以内に精子核の1個を卵細胞質内に顕微注入した。また、顕微注入の前に一部の卵子を A23187 で処理した。A23187の処理は 10 μM 溶液に 3分間卵子を浸し、その後十分洗浄した。卵子の培養には modified Krebs-Ringer 液（Whitten-Hoppe液<sup>2)</sup>、以下 WH液と略す）、卵子の処理と顕微受精には 10mM HEPES を加えた mWH液を使用した。精子核は精巢上体尾部から精子を採取し、テフロンホモジナイザーで精子頭部と尾部を分離し 1.5M ショ糖液を加えて遠心（300Xg, 10分間）することで精子頭部を回収し、顕微受精に供した<sup>2)</sup>。顕微受精後は 5-24時間、WH 液で培養（37°C, 5%CO<sub>2</sub>, 5%O<sub>2</sub>, 90%N<sub>2</sub>）し、5時間後にはホールマウント標本を作成して固定の上 acetocarmine で染色して卵子を観察し、24時間後には分割の状態を実体顕微鏡で観察した。表層顆粒は卵子を固定染色する前に 1000倍下（位相差顕微鏡）で観察した。どの程度 exocytosis が起こっているかは採卵直後の卵子の表層顆粒の状態を 100% としておおよそどの程度減少したかを%であらわした。

結果：(1) 顕微注入を行わずA23187だけのハムスター未受精卵への影響を調べたのが表1である。卵は固定染色して、第2極体の放出を認めたものを卵子の賦活とした。培養あるいはA23187 処理後2時間で、処理群では 93.6%が賦活下のに対して、未処理群では 6.5%であった。表層顆粒の消失も処理群では良好に観察された。

(2) A23187 处理卵の顕微受精を行い、5時間後に前核形成を観察した結果を表2に示した。顕微注入卵のうち、生存して卵子内に精子核が正しく注入されている卵から前核期受精卵となる割合は処理群の方が有意に高いが（53.1%：未処理、85.7%：処理、 $P<0.05$ ）、賦活された卵子から前核期卵となる割合には有意の差が認められなかった（81.0%：未処理、92.3%：処理）。培養後5時間での表層顆粒の消失は未処理群で10-30%で、処理群では70-90%であった。つぎに、顕微注入後24時間培養した結果を表3に示した。2細胞期卵となったのは未処理群・処理群で、それぞれ5.7%, 10.3%で有意の差はなかった。

考察：正常受精過程では精子が卵子に接着すると10-30秒後から卵子内にCaイオン濃度の一時的な上昇がありズミカルに起こり<sup>3)</sup>、卵子は賦活されると共に表層顆粒が消失し、第2極体を放出し雌雄前核が形成されることになる。ハムスターの顕微注入方法による受精では、表層顆粒の消失が低率であることから、注入刺激だけでは卵子賦活の十分な刺激とならないと考えられた。表層顆粒の exocytosis は Caイオンパルスに引き続いて起こる現象なので、細胞内 Ca濃度の上昇をもたらす A23187で卵子を処理し、十分な刺激を与えることとした。処理卵の表層顆粒消失率は70-90%であり、その効果は十分と思われた。また、注入された精子核は卵子の賦活の有無にかかわらず膨化するが、以後の前核形成には卵の賦活が必要である。このことを考慮すると、A23187の受精成績向上の機序は賦活刺激の不足で精子核が膨化でとどまるところを、十分な細胞内 Caイオン濃度上昇により前核形成へ導くからと思われた。今回の研究では、2細胞期胚への発生への影響については不明瞭である。しかし、parthenogenesisでも5-10%が2-cellとなり得ることや、強い2 cell blockを考えると他の動物種での検討が必要と思われる。

#### 主要文献

- 1) Steinhardt, R. A., Epel, D., Carrol, E. J. and Yanagimachi, R. (1974). Is calcium ionophore a universal activator for unfertilized eggs? *Nature*, 252, 41-43.
- 2) Yanagida, K., Yanagimachi, R., Perreault, S. D. and Kleinfeld, G. (1991). Thermostability of sperm nuclei assessed by microinjection into hamster oocyte. *Biol. Reprod.*, 44, 440-447.
- 3) Miyazaki, S., Hashimoto, N., Yoshimoto, Y., Kishimoto, T., Igusa, Y. and Hiramoto, Y. (1986). Temporal and spatial dynamics of the periodic increase in intercellular free calcium at fertilization of golden hamster eggs. *Dev. Biol.*, 118, 259-267.

表1. A23187によるegg activation

A23187 処理	卵总数	activation率 (%)			表層顆粒の 消失率・120分後
		60分後	120分後	300分後	
-	186	0	6.5	47.7	0
+	125	43.2	93.6	-	70-90

表3. A23187前処理の2 cell stage 発生への影響

A23187 処理	顕微注入 卵数	生存卵数	activation(b)		前核期 卵数(c)	c/a %		b/a %
			卵子内に精子を 認めた卵数(a)	した卵数(b)		c/a %	c/b %	
-	43	37	32	21	17	53.1	81.0	
+	44	37	28	26	24	85.7*	92.3**	

表2. A23187前処理の前核形成への影響

A23187 処理	顕微注入 卵数	生存卵数	卵子内に精子を 認めた卵数(a)		activation(b)	前核期 卵数(c)	c/a %		c/b %
							c/a %	c/b %	
-	43	37	32		21	17	53.1	81.0	
+	44	37	28		26	24	85.7*	92.3**	

\* P<0.05 \*\* N. S.

# ヒトの卵子内精子注入—電子顕微鏡による観察

Electron Microscopic Observations of Human Oocytes

Microinjected with Human Spermatozoa

井上正人・佐藤素子・瀬戸敦子・小林善宗・本田育子・野見山真理・藤井明和

Masato INOUE, Motoko SATO, Atsuko SETO, Yoshimune  
KOBAYASHI, Ikuko HONDA, Mari NOMIYAMA,  
Akikazu FUJII  
東海大学医学部産婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology, Tokai University School of Medicine

目的：男性不妊、とくに乏精子症の予後は IVF や GIFT をもってしても不良である。男性不妊では、その多くが精子の機能障害を伴うためである。最近、男性不妊に対する新たな治療法として顕微授精 microinsemination が登場してきた。透明帯開孔術、団卵腔内精子注入については、すでに妊娠、分娩例がかなり報告されている。しかし、精子受精能力障害に対する唯一の治療法であり、男性不妊の究極の治療法ともいべき卵子内精子注入については、いまだ成功例がない。われわれの実験でも、卵子内精子注入では受精率、分割率ともきわめて低かった。そこで今回は、卵子内精子注入で受精しなかった卵子を電子顕微鏡にて観察し、注入精子の運命について検討した。

方法：ヒト卵子は通常の IVF で受精しなかったものを患者の同意を得て使用した。過排卵は主として、GnRH-a-HMG-hCG にて行った。月経第 1 日より GnRH-a (スプレキュア<sup>®</sup>) 600～900 μg/日を投与し、3 日目より HMG 150～300 IU を連日筋注した。2 個以上の卵胞が 18 mm 程度、血中 estradiol 300 pg/ml/卵胞(≥15 mm) 以上になった時点で HMG を中止し、約 32 時間後に HCG 10000 IU を筋注した。採卵は HCG 注射後 36 時間で経腔的に行った。成熟卵子は 5～7 時間の前培養のうち、swim up 法で回収した運動精子 (5～10 × 10<sup>6</sup>/ml) を加えてさらに培養した (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% air)。精子の受精能力はあらかじめ、Ca ionophore A<sub>23987</sub> を用いた zona-free hamster egg sperm penetration test (ZSPT) にて検査し、penetration rate > 30% を I VF-ET の適応とした。培養液は HTF に 7.5% 非働化臍帶血血清を加えたものを使用した。受精の有無は媒精後約 18 時間で雌雄前核の存在により判定し、非受精卵は小さな pipette で顆粒膜細胞をよく除去してから実験に供した。Microinjection には、通常の油圧駆動の micromanipulator (ナリシゲ) および圧電方式の Piezo micromanipulator controller (プリマハム) を使用した。倒立顕微鏡下に卵子を microholder で固定し、insemination mixture 中の夫精子を 1 個 micropipette に吸引して、卵子細胞質内に注入した。術後の卵子は

ただちに培養液に移し、18~24時間培養した。卵子は受精の有無を判定してから、電顕用に固定し、まず $2\mu\text{m}$ の厚切連続切片を作成した。光顕レベルで観察後、その一部から超薄切片を作成し、電子顕微鏡にて観察した。結果：前核を形成しなかった卵子15個の厚切切片の光顕による観察では、卵子細胞質内にも卵腔内にも精子頭部は確認されなかった。超薄切片の電子顕微鏡による観察では、表層粒はすでに消失していた。また卵子細胞質内には、完全に膨化した精子頭部が観察され、前核形成過程の stage II で発育を停止したことが推測された。受精卵については、よく発達した前核が観察され、通常の体外受精卵とくに変わりはなかった。

考察：IVF, GIFT の開発により、女性不妊の治療は大きく前進した。これに対して、男性不妊の予後は相変わらず不良である。適切な治療法がないといつても過言ではない。男性不妊の予後が悪いのは、単に精子の数や運動率の問題ではなく、その多くが精子の機能障害を伴うためである。なかでも、精子受精能力障害 (ZSP T 0%) を合併する場合は妊娠は絶望的である。不妊患者3928例の分析では、全体で13.0%，乏精子症では実際に40.8%に精子受精能力障害が認められた。このような症例に対しては、卵子内精子注入が唯一の治療法である。しかし、卵子内精子注入は顕微授精の中ではもっともむずかしい方法であり、妊娠例はまだ報告されていない。Microinjection でまず問題になるのは、卵子に対する損傷であるが、圧電駆動方式を用いることにより、ほぼ満足すべき生存率が得られるようになった。しかし、受精率、分割率は極めて低かった。今回の電子顕微鏡による観察で、卵子内精子注入では前核の形成過程に問題があることが示唆された。精子を単に卵子内に注入するだけでは卵子の activation には不十分なのであろう。実際、microinjection 後の卵子を ionophore A<sub>23187</sub> や電気パルス印加が卵子の活性化（前核形成）を誘起することはよく知られている。ウサギでは microinjection によりすでに産仔が得られているが、胚への発生率はやはり低いという。ウシの卵子についてもほぼ同様で、microinjection 単独では受精率はきわめて低いが、ionophore A<sub>23187</sub> で処理すると、受精率、分割率とも大巾に改善すると報告されている。最近、後藤ら (1990) は microinjection および ionophore A<sub>23187</sub> 処理で受精した卵子を移植し、子牛の生産にはじめて成功した。ヒトの卵子は in vitro では activation されにくいといわれているが、この活性化の問題が解決されれば、卵子内精子注入は男性不妊に対する究極の治療法として十分臨床応用できるものと思われる。

文献：1) 井上正人, 他 (1989). 配隅子操作による不妊症の診断, 治療、臨婦産. 43. 825

2) Iritani, A (1990). Micromanipulation of gametes for in vitro assisted fertilization.

Molec. Reprod. Dev., 28, 199

3) 後藤和文, 他 (1990). 顕微受精・体外培養胚の移植による子牛の生産、

第78回家畜繁殖学会講演要旨.

4) 井上正人, 他 (1991). ヒトの卵子内精子注入、日不妊会誌、36(4), 285

# ミクロウェスタンブロッティング法による マウス初期胚の糖輸送担体の解析

Micro Western Blot Analysis of Glucose-Transporter Expression  
during Development of Mouse Preimplantation Embryos

森田 豊, 堤 治, 細谷岩生, 武谷雄二, 水野正彦, 加藤尚彦\*

Yutaka MORITA, Osamu TSUTSUMI, Iwao HOSOYA,

Yuji TAKETANI, Masahiko MIZUNO, Takahiko KATO\*

東京大学医学部産科婦人科学教室, 横浜市立大学第一生化学教室\*

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

Department of Biochemistry I, Yokohama City University School of Medicine\*

【目的】初期胚のエネルギー代謝はその発育にともない、グルコース非依存型からグルコース依存型に移行することが知られている。特に8細胞期以降の胚はグルコース利用能が急速に増加し<sup>1)</sup>、グルコース利用のための律速酵素であるhexokinaseも急激に増加する<sup>2)</sup>ことを報告してきた。この初期胚におけるグルコースの取り込み能を分子レベルで解析するため、今回我々は、胚細胞膜に存在する糖輸送担体(glucose transporter)の発現に着目した。糖輸送担体には、今までGLUT1～GLUT5の5つのisoformが知られており、本研究では、最も基本的で広範な組織に存在するGLUT1(赤血球タイプ, HepG2タイプ)に関し検討を行った。微小な胚の膜蛋白の検索には、極微量なタンパク質の解析が必要であり、独自のミクロウェスタンブロッティング法を開発し、微量サンプル調整法、微量電気泳動およびプロット法などを工夫した。

【方法】6～10週令B6C3F1雌マウスをPMS 5単位とhCG 5単位を用いて過排卵させた後に、同系雄マウスと交配させ、翌朝腔栓の認められたものを実験に用いた。hCG投与52, 76, 88時間後にそれぞれ4細胞期胚、桑実胚、胞胚を、卵管ないし子宮よりmBWを用いてフラッシュし採取した。250から350個の各発育過程の胚をマイクロピペットを用いて、PBS(phosphate buffered saline)中で洗浄した後、1.5μlのPBSと共にパラフィン油中に小滴としてとり、さらに1.5μlのlysis bufferを加え3μlの可溶化サンプルを調整した。胚を十分に可溶化させるため試料をパラフィン油中で60℃6分間加熱した後、電気泳動に用いるまで-80℃にて保存した。Western blottingはBurnetteら<sup>3)</sup>の方法に基づき、泳動装置は真鍋ら<sup>4)</sup>のもの(ゲルの大きさ38×35×1mm)を利用した。極微量な蛋白を検出するために、ゲルの試料溝を1×1×7mmの大きさにミクロ化し、泳動距離も10mmとした。泳動部分のゲルをニトロセルロース膜に転写した後は、HepG2細胞のGLUT1のC末端に対する抗体<sup>5)</sup>(東京大学医学部、岡芳知先生より供与)溶液中で反応させ、<sup>125</sup>I-protein Aにより標識して、富士バイオイメージアナライザー(BAS2000)を用いて解析を行った。

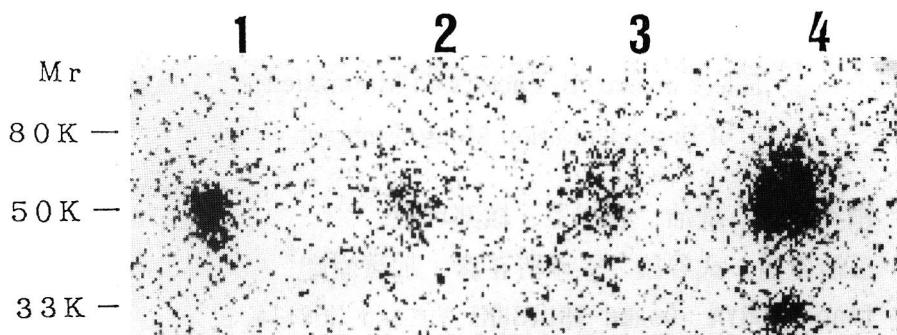


Fig.1 マウス初期胚のミクロウェスタンプロット lane 1, ヒト赤血球ゴースト (2ng蛋白質) ; lane 2, 4細胞期胚 350個; lane 3, 桑実胚 280個; lane 4, 胚胎 300個;  
胚試料のシグナルは、250個の胚に換算して比較した

【結果】4細胞期胚、桑実胚、胎胚とも、GLUT1の抗体と結合した<sup>125</sup>I-protein Aによるシグナルを分子量49Kの領域に認めた(Fig.1)。BAS2000を用いてこれらのシグナルを定量解析したところ、対照(ヒト赤血球ゴースト、2ng蛋白質)のシグナルを100とすると、250個の胚はそれぞれ4細胞期胚 42.7、桑実胚 70.0、胎胚 166.2のシグナル強度を示した。

【考察】今回、ミクロウェスタンプロッティング法を用いて、はじめてマウス初期胚のGLUT1の検出に成功した。4細胞期胚、桑実胚、胎胚と、胚の糖取り込み能が発達する<sup>1)</sup>のは、機能をもつたGLUT1の増加が関与するためと考えられる。また、今回考案したミクロウェスタンプロッティング法は、哺乳動物初期胚以外の微量試料の微量タンパク質の検出にも極めて有用な方法であり、今後の応用も期待できると思われる。

#### 【主要文献】

- 1)細谷岩生, 堤 治, 水野正彦, 加藤尚彦(1991). 微小培養法を用いた单一卵分析によるマウス初期胚糖取り込み能発達の解析, 日産婦誌, 43, 1579~1580.
- 2)Tsutsumi,O., Yano,T., Satoh,K., Mizuno,M., and Kato,T.(1990). Studies of hexokinase activity in human and mouse oocyte. Am.J.Obstet.Gynecol., 162, 1301~1304.
- 3)Burnette, W.N. (1981). " Western Blotting " : Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A. Anal.Biochem., 112, 195~203.
- 4)Manabe, T., Takahashi, Y., and Okuyama, T. (1984). An Electroblotting Apparatus for Multiple Replica Technique and Identification of Human Serum Proteins on Micro Two-Dimensional Gels. Anal. Biochem., 144, 39~45.
- 5)Oka, Y., Asano, T., Shibasaki, Y., Kasuga, M., Kanazawa, Y., and Takaku, F.(1988).Studies with Antibody Suggest the Presense of at Least Two Types of Glucose Transporter in Rat Brain and Adipocyte. J.Biol.Chem., 263, 13432~13439.

# マウス初期胚糖取込み能への成長因子の影響

## Effect of Growth Factors on Maturation of Preimplantation Mouse Embryos

細谷岩生、堤治、森田豊、綾部琢哉、  
三橋直樹、武谷雄二、水野正彦、加藤尚彦\*  
Iwao HOSOYA, Osamu TSUTSUMI, Yutaka MORITA,  
Takuya AYABE, Naoki MITSUHASI, Yuji TAKETANI,  
Masahiko MIZUNO, Takahiko KATO\*

東京大学産科婦人科学教室、横浜市立大学第一生化学教室\*  
Department of Obstetrics and Gynecology,  
Faculty of Medicine, University of Tokyo  
Department of Biochemistry, School of  
Medicine, Yokohama City University\*

### [目的]

体外培養の成績により哺乳類初期胚のエネルギー代謝は発育過程で pyruvate を主に利用するグルコース非依存型からグルコース依存型へと移行することが知られている。我々は単一卵にグルコースの analogue であるデオキシグルコースを用い、初期胚の糖代謝能発達を定量的に評価し、特に 8-cell embryoからの glucose uptake は exponential に増加することを我々はすでに報告した(図1)。また 2-cell stage の胚を採取し Blastocyst stageまで培養したのちのグルコース取込み能の変化についても報告してきた(図2)。in vivo と比較すると in vitro においては、形態学的には胚発育の遅延傾向が認められ、グルコース取込み能も 胚発育に伴い発達するものの有意に低かった。この原因として、in vivo と比較すると in vitro においては環境が胚発育にとって、より mildであること、Growth Factor etc. 欠如などが考えられた。そこで、今回我々は初期胚糖取込み能への成長因子の影響を比較検討した。

### [方法]

B6C3F1 6~8 週齢のメスマウスにPMS(pregnant mare serum gonadotropin)を投与し、その48時間後に hCG(human chorionic gonadotropin)投与により過排卵させた後、交配した。陰栓を確認したマウスより hCG投与後40時間後( 2-cell stage embryo相当)に卵を回収し以下の実験に供した。先ず mBWW 1ml 及びこれに Growth Factorを各濃度加えた mBWW 1ml 中で48時間卵を培養(Blastocyst stage)したのちグルコースを加えてない modified BWW にて十分 wash し、卵一個一個を2  $\mu$ l の medium と共にマイクロピペット

トにて culture dish 中の  $2\mu\text{l}$  の tritium label したデオキシグルコース ( $\text{DG}^*$ ) を加えた medium 中に吹込み (図3)、 $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 95% air, 100% moisture の条件下で、60分間培養した。培養ののち、micro pipet を用いて卵一個を  $100\mu\text{l}$  の mBWW の drop 5個の中で順次 wash したのち一個一個を scintillation counter にて count した。出来るだけ生理的な条件下に培養を行ない、かつ各ステージの卵の glucose uptake が測定可能であるために、final medium の組成はグルコースを除き mBWW と同一に調製してある。尚、medium 中に添加した  $\text{DG}^*$  の specific activity は  $17\text{Ci}/\text{mmol}$ 、 $4\mu\text{l}$  の count は 131万 cpm に相当する。

DG\* Uptake of Oocyte and Embryo

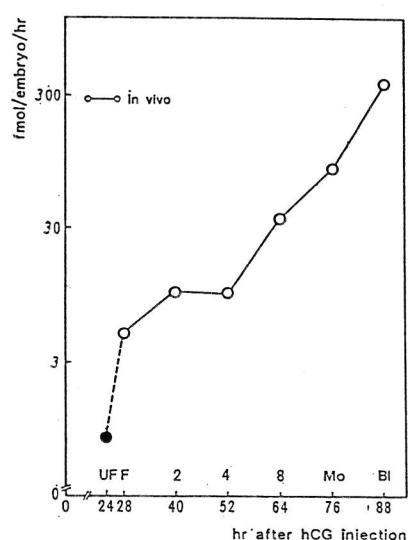


図1

DG\* Uptake of Oocyte and Embryo

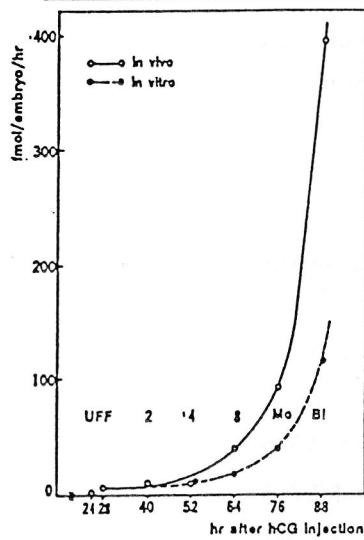


図2

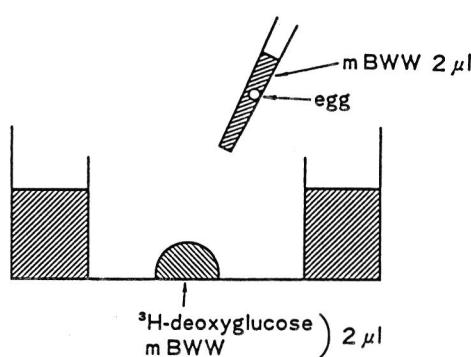


図3

# マウス初期胚発生に及ぼすエンドトキシンの影響 —作用時期に関する検討—

Effects of Endotoxin to Early Embryo

Development of Mouse

— Evaluation of Stage of Embryo Development —

詠田由美・吉満陽孝・池田景子・白川光一

Yumi NAGATA, Kiyotaka YOSHIMITSU, Keiko IKEDA,  
Koichi SHIRAKAWA

福岡大学医学部産婦人科学教室

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

【目的】培養液中に存在する Endotoxin (E) が、マウス初期胚発生に抑制的に作用することについて、われわれはすでに報告した。そこで今回、さらに E の作用時期を解明する目的で、培養液中に E を添加してマウス 1 細胞期胚培養および体外受精を行ない、両者での受精およびその後の胚発生に対する E の影響を検討した。

【方法】E 無添加基本培養液には、Human Tubal Fluid 液に 4 mg/ml ウシ血清アルブミンを加えたものを用い、高感度リムルス試験ゲル化転倒法 (LAL test : Limulus HS II-Single Test, Wako : ゲル化感度 0.03 EU/ml) により E 濃度が 0.03 EU/ml 以下であることを確認後実験に供した。基本培養液に *E. coli* UKT-B 株由来の E を 1.0 および 10.0 EU/ml の濃度で添加し、E 添加培養液とした。実験動物には 5 ~ 10 週令の B<sub>6</sub>C<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 雌マウスと同系成熟雄マウスを使用した。① 1 細胞期胚培養：PMS-hCG による過排卵処理後交配を行ない、hCG 投与 15 時間後に卵管膨大部より卵を採取し、無差別に 1 ml の E 無添加培養液および E 添加培養液に取り分け培養した。採卵 24 時間後における正常 2 細胞期胚総数をカウントし、2 細胞期胚からの expanded blastocyst, hatching blastocyst への発生率を求め、E 無添加群および添加群で比較した。② 体外受精：PMS

-hCG による過排卵処理

を行い、hCG 投与 14 時間

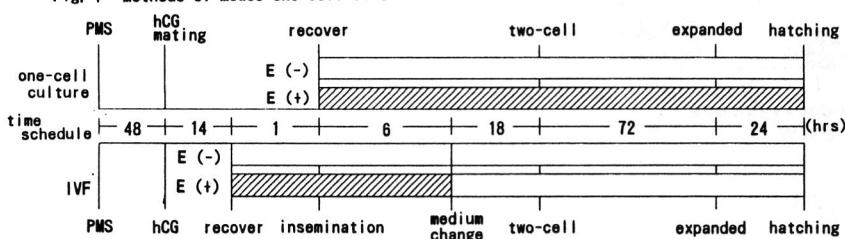
後に卵管膨大部より卵を

採取し、無差別に 1 ml

の E 無添加培養液および

E 添加培養液に取り分け、

Fig. 1 Methods of Mouse One-cell Culture and IVF



1時間の前培養後に、精巢上体尾部精子で媒精した。媒精6時間後には総ての卵をE無添加培養液に移した。媒精24時間後における正常2細胞期胚への分割率、正常2細胞期胚からのexpanded blastocyst, hatching blastocystへの発生率を求め、E無添加群および添加群で比較した。(Fig. 2)

Table 1. Effects of Endotoxin on Development of One-Cell Mouse Embryo

Endotoxin in medium (EU/ml)	No. of embryos cultured	No. of 2-cell developed	No. of blastocyst formation <sup>a</sup> (%)			
			No. expanded	P <sup>b</sup>	No. hatching	P <sup>b</sup>
<0.03(control)	132	106	85 (80)		44 (42)	
1.0	120	114	100 (88)	NS	55 (48)	NS
10.0	104	88	78 (89)	NS	39 (44)	NS

<sup>a</sup>No. of embryos developed / No. of two-cell embryos.<sup>b</sup>P: Probability of differences from the control; determined by chi-square analysis.  
NS, not significant.

Table 2. Effects of Endotoxin on Fertilization and Embryo Development Following Mouse IVF

Endotoxin in medium (EU/ml)	No. of oocytes inseminated	No. of embryos cleaved (%) <sup>a</sup>	No. of blastocyst formations (%) <sup>b</sup>			
			No. expanded	P <sup>c</sup>	No. hatching	P <sup>c</sup>
<0.03(control)	161	138 (86)	120 (87)		96 (70)	
1.0	154	114 (74)	<0.01	76 (67)	<0.01	54 (47)
10.0	108	77 (71)	<0.01	41 (53)	<0.01	31 (40)

<sup>a</sup>No. of 2-cell embryos developed / no. of oocytes inseminated.<sup>b</sup>No. of embryos developed / No. of two-cell embryos.<sup>c</sup>P: Probability of differences from the control; determined by chi-square analysis.

【結果】①1細胞期胚培養 (Table 1) では、2細胞期胚からのexpanded blastocystおよびhatching blastocystへの発生率はE無添加群と添加群のすべての濃度で有意差は見られなかった。②マウス体外受精 (Table 2) では、E無添加群の受精率86%に対して、E添加群1.0 EU/mlで74%、10.0 EU/mlでは71%と有意に低下した。受精後2細胞期胚からのexpanded blastocystへの発生率もE無添加群の87%に比較して、E添加群では1.0 EU/mlで67%、10.0 EU/mlで53%とすべての濃度で有意に低い発生率となった。hatching blastocystへの発生率もE無添加群の70%に比較して、E添加群は1.0 EU/mlで47%、10.0 EU/mlで40%と有意に低い発生率となった。

【考察】マウス1細胞期胚培養ではEの影響は見られなかった。E添加培養液によるマウス体外受精では、受精時の少量のエンドトキシンの存在により受精率、expanded blastocystおよびhatching blastocystへの発生率は有意に低下した。媒精培養液中のEは、受精の抑制のみならず、正常形態を示した2細胞期胚のその後の胚発生に対しても抑制的に作用することが判明した。以上より、マウス体外受精の媒精用培養液でのE濃度を低いレベルに押さえることは、初期胚発生促進のために有効であると考えられた。またヒト体外受精・胚移植に用いる培養液のquality controlとしての1細胞期胚培養は、Eの毒性を充分に評価し得ないと思われた。

## 【文献】

1. 詠田由美、吉満陽孝、池田景子、小山雅子、白川光一：マウス体外受精に及ぼすEndotoxinの影響。  
日本受精着床学会雑誌 1992; 9: 190-193
2. Randall G.W. and Gantt P.A.: Preimplantation murine embryos are more resistant than human embryos to bacterial endotoxin. J in vitro Fertil Embryo Transfer 1990; 7: 280-282
3. Montro L. et al.: Detection of endotoxin in human in vitro fertilization by the zona-free mouse embryo assay. Fertil Steril 1990; 54: 109-112

# マウス、サルにおける Embryo Biopsy と PCR： 着床前遺伝子診断の臨床モデル

Embryo biopsy and PCR using mouse and monkey pre-embryos:  
Pre-clinical models for human pre-embryo biopsy and genetic diagnosis

竹内一浩・永田行博 ※Gary D. HODGEN

Kazuhiro TAKEUCHI, Yukihiko NAGATA, ※Gary D. HODGEN

鹿児島大学 医学部産婦人科学教室

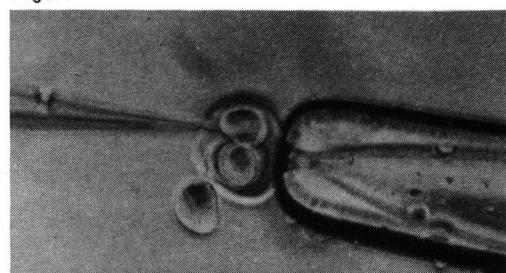
Department of Obst/Gynec, Kagoshima University,  
※Jones Institute for Reproductive Medicine

**目的：**近年、Molecular Biology や Reproductive Technology の進歩により着床前に遺伝病を診断することが可能となった。PCR 法を用いて、受精卵の一部から得られた少量の DNA を増幅することによりヒト遺伝子診断が可能となり、この方法を用いれば、多くの therapeutic abortion を防ぐことができる。このことはある種の遺伝病を持つ夫婦にとって福音をもたらすこととなるのであろう。本研究はマウス、サルの動物実験を通して、ヒトの着床前遺伝子診断の臨床モデルを確立することを目的とした。

**方法：**B<sub>6</sub>D<sub>2</sub>F<sub>1</sub>雌マウスを同型成熟雄マウスと交配させ、卵管を灌流することにより 4 および 8 細胞期胚を回収した。これらの胚は割球同士の結合を取る目的で Biopsy 前に Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>を含まない Krebs-Riger Bicarbonate(KRB)液で 90 分間前培養した。Embryo Biopsy はニコン社製位相差顕微鏡にナリシゲ社のマイクロマニピュレーターを設置し、一つの細胞から核のみを取り出す Enucleation、一細胞全体を吸引する Whole Blastomere Aspiration、一細胞を小口を通して押し出す Extrusion(Figure 1) の 3 種類の方法を用いて行った<sup>1)</sup>。Biopsy 後、それぞれの胚は KRB 液で追加培養し、胚盤胞までの発育率や胚盤胞期の細胞数をコントロール群と比較検討した。さらに一部の胚は Biopsy 後、精管結さつ雄マウスで偽妊娠誘起を施した ICR 雌マウスの子宮内に移植し、着床率、出生率を比較検討した。成熟雌サル(Macaca fascicularis)は同様に雄と同居させ開腹後卵管を Ham's F-10 Medium で灌流し、4～10 細胞期胚を回収し、Extrusion 法を用いて Biopsy を行った。

PCR は Saiki らの方法<sup>2)</sup>を一部 modify して行った<sup>3)</sup>。Embryo Biopsy にて得られた割球は培養液で 2 回洗浄し、60 ul の再々蒸留水に入れ、100°C で 10 分間処置したのち、PCR を行うまで -20°C にて保存した。なお Genomic DNA を positive control として使用し、negative control は洗浄に使用した培養液を用いた。マウス DNA については ornithine transcarbamylase(OTC)mutation(88bp)を、サル DNA についてはヒトと共通の Tay-Sachs exon 11 mutation(159bp)の primer を用いた。最終的な primer の濃度は genomic DNA(1.0 ng)に対して 0.5 μM, Single cell に対して 0.2 μM となるようにした。PCR は DNA thermal cycler(Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT) を用いて、Denaturing: 94°C, 1 min, Annealing: 55°C, 1 min, Extension: 72°C, 1 min. を 1 cycle とし通常 40 cycle 行った。

Figure 1



Extrusion 法によりマウス 4 細胞期胚の一割球が小口を通して押し出されている。  
×200

結果：4細胞期においてEnucleationが他の群に比して胚盤胞への発育率が低い傾向にあったが他の群ではコントロールと比較して有意差は見られなかった。8細胞期ではいずれのBiopsy群もコントロールと比較して有意差は見られなかった(table 1.)。4細胞期においてEnucleationが他の群に比して出生率が低い傾向にあったが他の群ではコントロールと比較して有意差は見られなかった(table 2.)。さらに生下時体重の比較においても4及び8細胞期でコントロール群といずれのBiopsy群も有意差は見られなかった。なおBiopsy由来の胎仔について剖検を行ったがいすれにも奇形発生などの異常はみられなかった。PCR産物はgenomic DNA, single cell共に100%検出可能で、いすれのnegative controlでもバンドは見られなかった。

考察：Embryo Biopsyを我々が考案した3法で行ったが、4細胞期以上でWhole Blastomere AspirationかExtrusionの方法を用いればその後の発生に影響を及ぼさないことが判明した。一方PCRの立場からすればsampleをintactな状態で取り出すことが重要であり、これらを考え合わせれば、現時点においてはExtrusionが最も適した方法であると言える。また我々はPCRを用いてgenomic DNAのみならずsingle cellのレベルの增幅に成功し、診断することができた。これらの動物モデルはヒトEmbryo Biopsy-Genetic Diagnosisの極めて重要なモデルとなると考えられた。最後にわが国に於ても、ヒトEmbryo Biopsy-Genetic Diagnosisが早く治療法として認められることを期待したい。

Table 1 Development to Blastocyst Stage of Biopsied Four-Cell and Eight-Cell Mouse Pre-Embryos in Vitro

Cleavage	Group	No. of pre-embryos	No. developing to blastocyst	No. of blastocyst cell
Four-cell	Control Biopsy	184	174 (94.6) <sup>a</sup>	68.8 ± 13.9 <sup>a</sup>
	Enucleation	187	151 (80.7) <sup>ad</sup>	59.0 ± 12.8 <sup>a</sup>
	Aspiration	192	173 (90.1) <sup>a</sup>	64.0 ± 12.7 <sup>a</sup>
	Extrusion	154	128 (83.1) <sup>ad</sup>	62.2 ± 11.9 <sup>a</sup>
Eight-cell	Control Biopsy	124	120 (96.7)	71.5 ± 14.1
	Enucleation	129	115 (89.1) <sup>f</sup>	61.9 ± 12.9 <sup>a</sup>
	Aspiration	132	121 (91.7) <sup>e</sup>	63.3 ± 11.5 <sup>a</sup>
	Extrusion	119	109 (91.5) <sup>e</sup>	61.7 ± 13.7 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Values in parentheses are percents.<sup>d</sup> P < 0.05 (4-cell versus eight-cell).<sup>b</sup> Values are means ± SE.<sup>e</sup> Not significantly different from control (P > 0.05).<sup>c</sup> P < 0.01 (enucleation, extrusion versus control).<sup>f</sup> P < 0.05 (enucleation versus control).

Table 2 Implantation and Live Birth Rates of Biopsied Mouse Pre-Embryos After Oviductal Transfer to Pseudopregnant Females

Cleavage	Groups	No. of pre-embryos transferred	Implantation rate	Live birth rate
Four-cell	Control Biopsy	81	14/18 (77.8) <sup>a</sup>	42/63 (66.7)
	Enucleation	85	13/22 (59.1)	31/63 (49.2) <sup>b</sup>
	Aspiration	93	16/25 (64.0)	40/68 (58.8) <sup>c</sup>
	Extrusion	65	11/17 (64.7)	27/48 (56.3) <sup>c</sup>
Eight-cell	Control Biopsy	69	14/17 (82.4)	34/52 (65.4)
	Enucleation	69	10/16 (62.5)	30/53 (56.6) <sup>c</sup>
	Aspiration	71	10/15 (66.7)	34/58 (60.7) <sup>c</sup>
	Extrusion	44	10/15 (66.7)	17/29 (58.6) <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Values in parentheses are percents.<sup>c</sup> Not significantly different from control (P > 0.05).<sup>b</sup> P < 0.05 (enucleation versus control).

K. Takeuchi, et.al. Fertil Steril ; 57, 425, 1992

## 主要文献：

- Kazuhiro Takeuchi, Brunc A. Sandow, Manal Morsy, Robert A. Kaufmann, Stephen J. Beebe, Gary D. Hodgen : I. Efficiency and normalcy of mouse pre-embryo development after different biopsy techniques Fertil Steril, 57 : 425, 1992
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mallis KB, Horm JT, Erlich HA, Arnheim N : Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, 230 : 1350, 1985
- Manal Morsy, Kazuhiro Takeuchi, Robert A. Kaufmann, Lucinda Veeck, Gary D. Hodgen, Stephen J. Beebe : Pre-clinical models for human pre-embryo biopsy and genetic diagnosis : II. PCR amplification of DNA from single lymphoblasts and blastomeres with mutation detection. Fertil Steril, 57 : 431, 1992

# 着床前診断のためのembryo biopsy 法に関する検討

## Evaluation of Embryo Biopsy Methods for Preimplantation Diagnosis

雀部 豊、安部裕司、臼井 彰、池永秀幸、片山 進、久保春海、百瀬和夫

Yutaka SASABE, Yuji ABE, Akira USUI, Hideyuki IKENAGA,  
Susumu KATAYAMA, Harumi KUBO, Kazuo MOMOSE

東邦大学医学部第一産科婦人科学教室

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

近年、生殖医学の発展はめざましく、Micromanipulator を用いて卵子や胚に直接細かい操作を加えることが可能になってきた。そして、この手法を用いて着床前の胚より1～数個の細胞または核を取り出し、微量DNAの增幅が可能なPCR法によりX連鎖性劣性遺伝病の着床前診断を行う方法が多くの研究者によって試みられている。しかし、微量のDNAより100%確実な診断を得るのは非常に困難であり、誤診の許されないヒトの着床前診断に対して応用するためには、さらに基礎的研究を積み重ね、診断の確実性向上を目指す必要がある。今回我々は、ICR系のマウスを用い体外受精を行い3つの発育段階（4細胞期、8細胞期、桑実期）の胚より細胞を intact な状態で摘出し、培養することにより細胞数を殖やす検討を行った。

### 材料および方法

体外受精：ICR系のマウスを用い豊田<sup>1)</sup>らの方法に準じた体外受精を行った。媒精6時間後に2前核を確認できた正常受精卵のみを流動パラフィン下の100μMol EDTA, 4mg/ml BSA加Whitten's mediumへ移し5%CO<sub>2</sub> in air で培養を行った。

ピペットの作製：holding pipetteは外径約70μm、内径約15μm、先端部を丸めたものを、biopsy pipette は内径約10μm、先端部を約45度に研磨したのを作製した。

Embryo biopsy：体外受精により得られた4細胞胚、8細胞胚、桑実胚を、0.01%EDTA, 2mg/ml BSA加PBS(Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>free)で約30分間 preincubate 後、流動パラフィン下の0.3Mol sucrose, 0.01%EDTA, 2mg/ml BSA加PBS (Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>free)へ移した。Micromanipulatorを用いて倒立顕微鏡下に胚を holding pipetteで固定し、biopsy pipetteでpartial zona dissectionを行い、約50μmのslitを作った。対極の団卵腔にbiopsy pipetteを挿入し、mediumを団卵腔に流入させることにより1個の細胞を slitより押し出した。摘出した細胞と残りの胚を PBS(Ca<sup>++</sup>,

$Mg^{++}$ free)で十分に洗浄後、再び流動パラフィン下の $100\mu$ Mol EDTA, 4mg/ml BSA加Whitten's mediumへ戻し、 $5\%CO_2$  in airで培養を行った。すべての操作は摘出細胞および胚に傷をつけないように注意深く行った。対照は、biopsyを行わずに培養を行った。

### 結 果

体外受精により得られた4細胞胚12個、8細胞胚10個、桑実胚12個に対して、biopsyを行った。形態的に intactな細胞が摘出できたのは、4細胞胚8個(66.7%)、8細胞胚8個(80.0%)、桑実胚10個(83.3%)だった。これらの細胞を培養したところ24時間後に分割したものは、4細胞胚4個(50.0%)、8細胞胚7個(87.5%)、桑実胚4個(40.0%)であった。残りの胚を培養したところ、媒精96時間後に胞胚まで発育したものは、4細胞胚8個(66.7%)、8細胞胚8個(80.0%)、桑実胚10個(83.3%)であった。また、対照として20個の胚をbiopsyを行わずに培養したところ90.0%が胞胚まで発育した。

### 考 察

着床前診断を目的としたembryo biopsyの抱える問題点のひとつとして、微量DNAより確実な診断を得るのが非常に困難なことがあげられる。しかし、細胞をintactな状態で摘出でき、それを培養・増殖することができれば、DNA診断の確実性向上への足掛かりとなることが期待でき、さらに、胚への侵襲を最小限にとどめることができると考えられる。今回我々は、マウスをモデルとしてその可能性を検討した。

現在、embryo biopsy法は研究者によりさまざまな方法が行われている。主な方法として、ピペットで細胞全体または核を吸引してくる方法、透明帯にslitを作り胚全体を圧迫またはmediumを囲卵腔に流入させることにより押し出す方法などがある。我々は細胞をintactな状態で摘出し、それを培養し、細胞数を増やすことを目的としたためmediumを囲卵腔に流入させることにより透明帯のslitから押し出す方法を採用した。この方法により、4細胞胚より66.7%、8細胞胚より80.0%、桑実胚より83.3%の形態的にintactな細胞を摘出することができた。さらに、摘出した細胞を培養したところ8細胞胚では形態的にintactな細胞の内87.5%に分割が観察されたが、4細胞胚、桑実胚では各々50.0%、40.0%にしか分割が観察されず、技術的に改善の余地が残されていると思われる。また、biopsy後の胚を培養したところ、8細胞胚(80.0%)、桑実胚(83.3%)で高率に胞胚への発育が観察され、対照と有意差を認めなかった。これらより、胚より細胞をintactな状態で摘出し、培養・増殖させるためには、mediumを囲卵腔に流入させることにより押し出す方法がより安全・確実であると考えられる。

### 主要文献

- 1) Toyoda Y., Yokoyama M. and Hoshi T.: Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro. Jpn J. Anim. Reprod. 1971; 16: 147~151
- 2) Abe Y.: Factors influencing implantation of mouse embryos fertilized in vitro. Acta Obst. Gynaec. Jpn. 1988; 40: 821~827
- 3) William E.R., Jong G.K., Brijinder S.M. and Melvin G.D.: Survival and cell acquisition rates after preimplantation embryo biopsy. Am. J. Obstet. Gynecol. 1990; 162: 1084~90

# 受精卵凍結融解後の胚の膜機能に関する研究

The assessment of metabolic function of frozen-thawed embryos

大野原良昌・高尾成久・原田省・見尾保幸・寺川直樹

ONOHARA Yoshimasa, TAKAO Naruhisa, HARADA Tasuku, MIO Yasuyuki, TERAKAWA Naoki

鳥取大学医学部産科婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology, Tottori University School of Medicine

〔目的〕 受精卵凍結融解後の胚の生存性は一般に形態学的に評価されるが、この形態学的評価は胚の機能を必ずしも反映しない。凍結障害の主な部位は細胞膜と細胞内小器官であることから、Bovine serum albumin (BSA)、ロイシンおよびfluorescein diacetate (FDA) の取り込みを指標として、マウス凍結融解胚の膜機能を検討した。

〔方法〕 B6C3 F<sub>1</sub> 雌マウスに、PMS-hCG で過排卵処理を行い、同系の雄と交配後、hCG 注射から42時間後に、2細胞胚を採取し、対照とした。耐凍剤として1.5M propanediolと0.1M sucroseを用いて緩慢凍結・急速融解した2細胞胚を凍結融解群とした。また、耐凍剤で平衡・希釈のみした2細胞胚を非凍結融解群とした。これらの2細胞胚を BWW培養液内 (BSA 1mg/ml 添加) で5%CO<sub>2</sub> in Airにて、24あるいは48時間培養し、桑実胚、胚盤胞を得た。各々の群の2細胞胚、桑実胚および胚盤胞を <sup>125</sup>I-BSA および <sup>3</sup>H-ロイシンを含む BWW培養液 (<sup>125</sup>I-BSA 濃度56μg/ml, <sup>3</sup>H-ロイシン濃度4.76μM) 内で4時間培養した。培養後、胚を PBSにて洗浄し、その放射活性を測定した。また、 FDAを含む PB1溶液 (FDA 濃度 0.5μg/ml) 内で、対照群および凍結融解群の2細胞を1分間・室温で培養後、PB1 で洗浄し、胚を蛍光落射顕微鏡で観察した。

〔結果〕 2細胞胚における BSA取り込みは、各群間に差を認めなかった。胚盤胞においては、対照群に比して、凍結融解群で BSA取り込みは有意に抑制された (Table. 1)。ロイシン取り込みは、2細胞胚・桑実胚・胚盤胞とも対照群・非凍結融解群に比して、凍結融解群で有意に低下した (Table. 2)。FDA 取り込み後の2細胞胚の示す蛍光強度には、対照群と凍結融解群間に差は認めなかった。しかし、実体顕微鏡下で明らかに障害を認める割合は、ほとんど蛍光発色しなかった。

Table. 1 Uptake of  $^{125}\text{I}$ -BSA (cpm/embryo) by 2-cell embryos and blastocysts exposed to freezing-thawing procedures

cell stage	group of		
	control	non-freezing	freezing
2-cells	53±13	50±20	47±4
blastocysts	477±77	446±63	341±85*

Values are mean ± SD, \* p<0.01 vs control group

Table. 2 Uptake of  $^3\text{H}$ -leucine (dpm/embryo) by 2-cell embryos, morulae and blastocysts exposed to freezing-thawing procedures

cell stage	group of		
	control	non-freezing	freezing
2-cells	1614±150	951±132*, **	730±82*, **
morulae	3105±486	2909±334**	2086±205*, **
blastocysts	7367±1702	6024±1514*, **	4792±1306*, **

Values are mean ± SD

\* Significantly different from control group (p<0.01)

\*\* Significantly different between non-freezing and freezing group (p<0.01)

[考察] FDAは非極性のため細胞膜を容易に通過し、細胞内に取込まれると esterasesにより過水分解され、fluoresceinを產生して蛍光発色する。FDA取込みは、esterase活性と膜機能を反映するが、esterase活性は他の細胞機能が低下しても損われ難く、鋭敏な指標とは言えない。初期胚での蛋白の取込みは pinocytosisにより、アミノ酸の取込みは能動輸送によって行われることから、両者の検討は、細胞膜・細胞質の機能を反映すると考えられる。今回の検討では、形態学的には判定困難であった凍結融解の一連の過程による胚の膜機能低下を BSA・ロイシン取込みを指標として明らかにした。

#### [主要文献]

- 1) Carroll J, Kaye PL, Cummins JM : J in Vitro Fertil Embryo Transfer, 5:85, 1988
- 2) Pemble LB, Kaye PL : J Reprod Fert, 78:149, 1986
- 3) Borland RM, Tasca, RJ : Develop Biol, 30:169, 1974
- 4) Mohr LR, Trounson AO : J Reprod Fert, 58:189, 1980

# ガラス化凍結保存によるラット胚盤胞の形態的観察について

Microscopical Observations of Rat Blastocysts  
Cryopreserved by Vitrification

大星茂樹・仲道麗子・藤原昇・古賀脩

Shigeki OHBOSHI, Reiko NAKAMICHI, Noboru FUJIHARA, Osamu KOGA

九州大学農学部畜産学第一教室

Department of Animal Science, Kyushu University

目的: 本実験では、Rall(1)が報告したガラス化溶液 VS3を用いてラット胚盤胞のガラス化凍結保存を行い、融解後の胚の形態的变化について検討した。

方法: 供試胚は自然交配させたSD系ラットの妊娠5日目の子宮をHEPES緩衝液で灌流して採取した。ガラス化溶液はRallの方法に従って調製した。すなわち、凍結保護物質として47.5%(v/v) Glycerol及び6.0%(w/v) Polyethylene glycolを加えた修正HEPES緩衝液を100%VS3として用いた。ガラス化溶液への胚の浸漬は多段階法と一段階法の2通りで行った。多段階法の場合、胚を室温下(20°C)で25%VS3に10分間浸漬後、氷上(4°C)で50%及び100%VS3に各々10分間浸漬した。一段階法では、胚を氷上で100%VS3に5, 15または30分間浸漬した。各時間浸漬した後、胚を0.25mlプラスチックストローに50 μlの100%VS3と共に充填し、直接液体窒素中(-196°C)に投入して1~7日間保存した。所定の期間保存した後、ストローを取り出し氷水中(0°C)で融解し、融解胚を3mlのHEPES緩衝液に直接回収して、室温下で10分間静置した。その後、胚を10%FCS添加MEMを用いて、39°C, 5%CO<sub>2</sub>, 95%airの気相下で継続培養を行い、培養開始から24及び48時間後に拡張胚盤胞あるいは孵化胚盤胞にまで発育した胚の割合を調査した。また、ガラス化凍結融解した胚、ならびに採取直後の新鮮胚盤胞を常法によってエポン樹脂に包埋し、厚切切片を作製しトルイジンブルーで染色後、光学顕微鏡で観察した。

結果: 培養24及び48時間後の拡張胚盤胞あるいは孵化胚盤胞まで発育した胚の割合をみると、多段階法と一段階法との間に統計的に有意な差は認められなかったが、一段階法で胚を5分間100%VS3に浸漬した区が最も高い値を示した。しかし、一段階法でも、胚の浸漬時間が長くなるにつれて、発育率は低下する傾向がみられた。次に、新鮮胚ならびにガラス化処理した胚の形態についてみると、新鮮胚に比較して、氷上で100%VS3に5~30分間浸漬した胚では、内細胞塊、栄養芽細胞共に細胞が膨潤していた。細胞の膨潤の程度は胚の浸漬時間が長くなるにつれて増大する傾向を示した。一方、ガラス化凍結融解胚のうち、肉

眼的に正常と思われる形態を示したものでは、細胞に顕著な異常は認められず、新鮮胚に近い組織構造を示した。とくに、氷上で100%VS3に5分間浸漬した後、凍結融解した胚に正常な形態をもっているものが多く観察された。また、融解胚を継続培養した後、拡張胚盤胞にまで発育した胚の形態をみると、内細胞塊、栄養芽細胞が拡張し、遊離した状態を示すものもみられ、細胞間は細糸状のもので連絡していた。さらに、融解後、継続培養を行った胚の中で外觀上それほど異常を示していない場合でも、内細胞塊や栄養芽細胞が損傷を受けている像がかなりみられた。

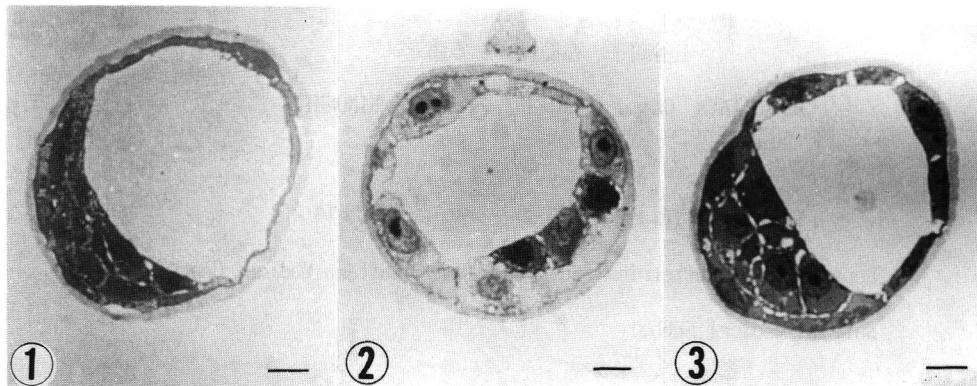


図1. 採取直後の新鮮胚盤胞 図2. 氷上(4°C)で100%VS3に5分間浸漬した胚盤胞

図3. 氷上(4°C)で100%VS3に5分間浸漬した後、凍結融解し、HEPES緩衝液で回収した直後の胚盤胞

スケール: 10μm

**考察:** VS3を用いてラット胚盤胞のガラス化凍結保存について検討した結果、胚を5分間ガラス化溶液に浸漬する一段階法によって処理した場合、融解後の胚の生存性が多段階法によるものよりも優れており、培養後の胚の発育も良好であった。この場合、胚をガラス化溶液へ浸漬する時間が長くなるにつれて、融解胚の生存性及び発育率は低下した。次に、凍結融解胚の形態を観察すると、胚をガラス化溶液へ浸漬することによって明かに細胞の膨潤が見られた。ガラス化溶液へ5分間浸漬した胚と30分間浸漬した胚についてみると、細胞の膨潤の程度は後者の方が顕著であった。マウスの胚では、胚をガラス化溶液に浸漬、あるいは融解胚から凍結保護物質を除去すると、細胞の膨化や収縮が起こり、胚の生存性に対して著しい影響を及ぼすと考えられている(1,2)。従って、ラット胚のガラス化凍結保存を行う場合には、この種の胚に有効なガラス化溶液の開発や凍結操作法についてさらに検討することが必要である。

**主要文献:**

1. Rall, W.F. (1987). Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*, 24, 387~402.
2. 河野友宏、角田幸生 (1987). ガラス化超急速凍結法によるマウス初期胚の生存性および移植試験、家畜繁殖学会誌、33, 77~81。

# D M S O / P R O H 混合液を用いたマウス 初期受精卵の超急速凍結保存について

Ultrarapid freezing of early stage  
mouse embryos in DMSO-PROH mixture

田谷順子・石原理・木下勝之

Junko TAYA, Osamu ISHIHARA, Katsuyuki KINOSHITA

埼玉医科大学総合医療センター 産婦人科

Department of Obstetrics and Gynaecology, Saitama Medical Centre,  
Saitama Medical School

目的：バイオテクノロジーの新しい展開の一つに受精卵の遺伝子操作がある。現在、マウス受精卵の前核に外来遺伝子DNAを導入し、遺伝子導入マウス（トランスジェニックマウス）を作る研究が盛んに行なわれている。最近、Leibo ら<sup>1)</sup>は凍結受精卵によるトランスジェニックマウス作出を試みて良好な成績を得ており、凍結受精卵の応用は拡大している。そこで、本実験ではマウス初期受精卵（前核期および2細胞期）を超急速的にDMSO/PROH混合液中で凍結保存し、融解後の生存性を指標に、凍結受精卵作製の条件を検討した。

方法：ICR系成熟雌マウスに5iu PMSGとhCGを48時間間隔で腹腔内投与し、成熟雄と交配させた。hCG投与後24時間に前核期受精卵および48時間に2細胞期胚を卵管灌流にて採取した。受精卵は15%FCS添加HTF<sup>2)</sup>培養液中で数10分間培養の後に凍結に供した。凍結保存液として2M, 3M-Dimethyl sulphoxide (DMSO) / 3M-Propylene glycol (PROH) の混合液<D2/P3, D3/P3>を用いた。凍結はクライオバイアル内の50μlの保存液中に受精卵を移し、液体窒素へ浸漬して行なった。バイアルを37°Cの微温湯中で加温しながら0.3M sucrose HB1<sup>3)</sup>液を添加して保存液を希釈した。回収した受精卵はゆっくりと培養液にて洗浄の後に形態観察を行なった。形態的に正常と認めた受精卵は100μM EDTA添加培養液にて胚盤胞期まで培養し、発生を観察した。

結果：融解時の形態的正常受精卵の割合は前核期に比して2細胞期で凍結した場合が80%以上と高値であった。前核期受精卵では保存液がD2/P3で生存率が68%とD3/P3の52%に比し高かった。体外培養後に胚盤胞期へ達した胚の成績を見ると、2細胞期胚では保存液組成と関係なく良好な発生結果が得られた。しかし、前核期受精卵ではD2/P3液で54%、D3/P3液ではわずか7%しか胚盤胞期へ達しなかった。

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

Freezing solution	Stage of embryos at freezing	Number of embryos		
		frozen	recovered (%)	morphologically normal (%)
D2/P3	Pronuclear	100	99 (99.0)	68 (68.0)
	2 cell	59	58 (98.3)	48 (82.7)
D3/P3	Pronuclear	113	110 (97.3)	57 (51.8)
	2 cell	40	35 (87.5)	31 (88.6)

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

Freezing solution	Stage of embryos at freezing	No. of embryos	No. (%) of embryos
		cultured	developed to blastocyst
D2/P3	Pronuclear	68	37 (54.4)
	2 cell	48	38 (79.2)
D3/P3	Pronuclear	57	4 (7.0)
	2 cell	31	25 (80.6)

考察：DMSO/PROH 混合液によるマウス前核期受精卵の超急速凍結保存はVan der Auweraら<sup>4)</sup>によっても試みられ、それらの成績はDMSO, PRPO単独使用の中間値を示し、胚盤胞期への発生率は24%と報告している。本研究でも前核期受精卵においてはDAP213<sup>5)</sup>を用いた前回の報告<sup>6)</sup>よりも良好な結果が得られなかつたことから、混合液の組成や凍結融解操作等についてさらに検討が必要であると考えられた。

#### 主要文献

- 1) Leibo S.P, DeMayo F.J. and O'malley B. (1991) Mol. Rep. Dev. 30:313-319
- 2) Quinn P.Q, Kerin J.F. and Warnes G.M. (1985) Fertil. Steril. 44:493-498
- 3) Rail W.F. (1987) Cryobiology 24:387-402
- 4) Van der Auwera I, Cornillie F, Ongkowidjojo R, Pijnenborg R and Koninckx P.R (1990) Hum. Reprod. 5:619-621
- 5) 中瀬直己 (1989) 日不妊会誌 34:757-760
- 6) 田谷順子、竹田省、木下勝之 (1991) 哺乳卵学誌 8:97-98

# 超急速凍結法により保存した牛体外受精卵の 微細構造の変化

The ultrastructural changes of in vitro fertilized bovine  
embryos after ultrarapid freezing and thawing

續木靖浩・芦沢幸二

Yasuhiro TSUZUKI, Koji ASHIZAWA

宮崎大学農学部動物生産学科家畜機能開発学講座

Department of Animal, Grassland and Fishery Sciences, Faculty of Agriculture,  
Miyazaki University, Miyazaki

【目的】マウス胚を超急速凍結し、保存する技術が開発されて以来、この技術を利用した牛体外受精卵の保存が試みられている。この超急速凍結法では高濃度の凍結保護剤を使用するため、それによる受精卵への浸透圧衝撃及び毒性をいかに防止するかが、大きな課題となっている。そこで本実験では、凍結保護剤と受精卵との関係を明確にする目的で、受精卵の微細構造に及ぼす凍結保護剤の影響について電子顕微鏡を用いる検討を行った。

【方法】卵巣を屠殺場から採取し、生理的食塩水に浸して持ちかえった。卵子の吸引は、10,000 iu/mlヘパリンと2%CSとを含むTCM-199を使用し、直径1~6 mmの卵胞から行った。その後、卵丘細胞が付着したすべての卵を選別し、5%のCSを補足した25 mM Hepes Earle型 TCM-199で24時間の成熟培養を行った。次に黒毛和種の凍結精液を37°Cの温湯中に1分間静置し融解した。融解後、B0液で2、4、8、16及び32倍になるように希釈し、600×gで8分間（室温）遠心分離し、10 mM カフェイン、20 μg/ml ヘパリン及び15mg/ml BSAで等量希釈して、精子の最終濃度が1,800~1,900×10<sup>4</sup>個/mlになるように調整した。その後直ちに100 μlの精液ドロップを作製し、1つのドロップに40~50個の卵を導入し6時間の媒精を行った。媒精終了後、1%のCSを含むTCM-199に受精卵を移して卵丘細胞とともに培養し、48時間後に5~8細胞期にまで発生した受精卵を実験に供した。対照区の場合は、受精卵を直ちに3%のグルタールアルデヒドで前固定を行い、その後1.33%の四酸化オスミウムで後固定し、Quetol-812に包埋した。一方、凍結する受精卵の場合、2Mジメチルスルホキシド、1Mアセトアミド、3Mプロピレンゲリコール組成のDAP-213を凍結保存液として用い、受精卵をDAP-213液に移し、30秒以内に液体窒素中に浸漬することで、超急速凍結を行った。融解は37°Cの温湯中で数秒間行い、受精卵からDAP-213を除去しないで直ちに固定した。また比較のため、融解後にシュークロースを用いてDAP-213を

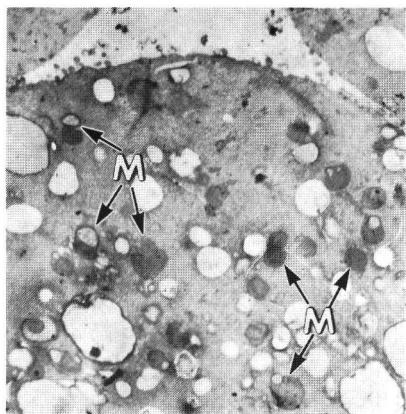


図 1 対照区の受精卵のミトコンドリア(M) ×5,000

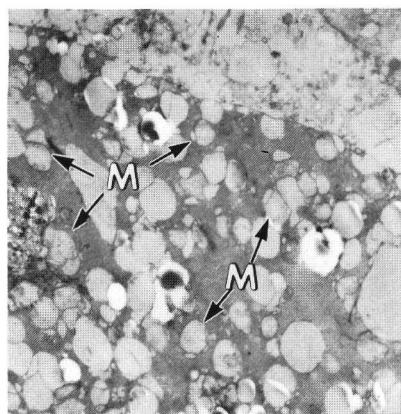


図 2 融解後、DAP-213を除去しなかった受精卵のミトコンドリア(M) ×5,000

除去し、固定及び包埋したものも合わせて作製した。

【結果】対照区の受精卵では、原形質膜の表面に microvilli が観察された。細胞内には大小様々な脂肪滴が多数見られた。ミトコンドリアは王冠状を呈し電子密度が高く、細胞内に散在していた(図 1)。一方、融解後、DAP-213を除去しない受精卵では、対照区の受精卵と比べて、ミトコンドリア以外の細胞内小器官の構造的な変化はほとんど認められなかった。これに対して、大部分のミトコンドリアの電子密度は著しく低下していた(図 2)。ところがDAP-213を除去することによって、ミトコンドリアは新鮮な受精卵のものと同様の形態を示すまでに回復した。

【考察】今回使用した方法では、DAP-213中に受精卵を浸漬し30秒以内という短い時間で液体窒素に保存したにもかかわらず、ミトコンドリアは著しい構造変化を引き起こした。これはDAP-213はかなり高濃度な凍結保存液であるために、短時間でも細胞内に十分浸透できることを示唆している。したがって、DAP-213の浸漬時間は30秒以内で十分であると考えられた。

### 【主要文献】

1. Brackett, B.G., Oh, Y.K., Evans, J.F. and Donawick, W.J. : Fertilization and early development of the cow ova. *Biol. Reprod.* 1980; 23:189~205
2. Massip, A., Zwalm, P.V.D., Scheffen, B. and Ectors, F. : Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryo-Letters* 1986; 7:270~273
3. 中瀬直己 : 超急速凍結を用いた体外受精由来マウス初期胚の凍結保存について. *哺乳卵研究*. 1989; 6:23~26
4. Roll, W.F. : Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 1985; 24:387~402

# ヒト凍結卵子および受精卵解凍胚移植の臨床的検討

## Clinical outcome of frozen-thawed oocyte and embryo replacement

小田原靖、立花郁雄、武田信好、千田智、飯田修一、蛭田益紀、森滋、鈴木雅洲

Yasushi ODAWARA, Ikuo TACHIBANA, Nobuyoshi TAKEDA,  
Satoru CHIDA, Shuichi IIDA, Masunori HIRUTA,  
Shigeru MORI, Masakuni SUZUKI

医療法人 社団 スズキ病院 産婦人科

Department of Obstetrics and Gynecology, Suzuki Hospital

目的・ヒト凍結胚移植は採卵周期あたりの妊娠率向上および多胎妊娠率の低下に有効な治療方法として注目されている。さらにin-vivo着床モデルとして同一周期FVF-ETで生じる非同期性の改善の研究手段やembryo donation, embryo biopsy等の臨床応用にも必要な技術と考えられる。一方、ヒト凍結卵子移植は未だ確立した技術ではないが、社会的倫理的に胚凍結よりも許容し易い点や、卵巣摘出を要する未婚女性やegg donationへの応用等の点から臨床応用が期待されている。我々も未だ少数例ではあるが、ヒト凍結胚、卵子解凍移植の臨床応用を試みている。今回は臨床成績を移植周期の同期法を中心として検討した。

方法・当院でのIVF/GIFT/ZIFTプログラムでは、多胎妊娠防止の目的から周期当たりの移植胚数は4個以下としている。そのため、余剰胚あるいは卵子は、患者の希望があれば凍結保存し、採卵周期に生児が得られなかった場合、解凍一胚移植に用いた。Table 1に胚の凍結、解凍プログラムを示した。移植周期は①自然周期／LHサージ②クロミッド／LHサージ③自然周期／HCG④HMG／LHサージ⑤HMG／HCGの5種類の方 法を用いた。モニタリングは原則として月経第12日目より血中LH測定(TOSOH-AIA-LH)、超音波卵胞測定を開 始し血中LHが基礎値の250%以上に上昇した場合LHサージとみなした。移植時間は排卵時間と同期させ、培養時間を加えた時間を移植時間とした。HCG使用の場合は、HCG投与時間を採卵時のHCG投与時間と同一と考え、同じ時間設定で施行した。凍結卵子では、採卵時間と同期させ解凍し、2日後に胚移植を行なった。胚移植後は黄体ホルモン・HCG補充療法を行ない、移植後第21日で妊娠反応を行なった。

結果・平成3年12月までに凍結胚移植を47周期、凍結卵子移植を5周期に施行し、それぞれ6周期、2周期に妊娠が成立した。このうち凍結胚移植で2例、凍結卵子移植で1例が流産となり、凍結卵子移植の他1例は子宮外妊娠であった。Table 2に胚移植同期法別の妊娠率、着床率を示した。各群の症例数は少数ではあるが、HMG/HCG周期で妊娠率、着床率ともに良好であった。総妊娠率は、12.8%(対移植)であり、着床率は胚当たり

5.2%, 100% 生存胚当り 11.3% であった。Table 3 に移植胚数と妊娠率について示した。100% 生存胚当りの妊娠率は多数胚移植例で高値を示した。妊娠例は移植日が第16日から第20日の間に集中し、この期間に胚移植を行った症例に対する妊娠率は 15.4% であった。(Fig.1) Table 4 に、推定排卵時間に培養時間を加えた計算上の移植時間と実際に施行した時間の差と妊娠率について示した。計算上の時間設定よりも早く移植を行なった症例に妊娠例を多く認めた。

考察・今回凍結卵子・胚移植の臨床成績を、移植周期の同期法を中心に検討した。IVF-ETでのHMG/HCG 刺激が内膜一胚の非同期化を増大させ、着床に悪影響を与えるという指摘もあるが、今回の結果では HMG/HCG 周期の妊娠率は良好であった。また HMG 非使用症例では内因性 LH サージ例が HCG 投与例より良好な成績であった。自然周期での HCG 投与のタイミングについては更に検討が必要と考えられる。更に早めの胚移植で成績が良好であることは、これが *in vivo/in vitro synchronization* を改善するポイントとして注目される。多数胚移植による多胎妊娠はまさしく医原性の現象であり、特に品胎以上の多胎妊娠の発生は周産期管理に多大な危険性をもたらす。今後凍結胚移植技術の確立は IVF-ET により極めて重要と考えられる。

文献 ① J.Lomage et al. Human reproduction vol 5, 60-65, 1990

② J.Testart et al. Fertil Steril 48, 107-112

③ 久慈直昭他、日本受精着床誌. 8. 119-122, 1991.

TABLE 1. FREEZING AND THAWING PROTOCOLS FOR EMBRYO FREEZING

1. FREEZING PROTOCOL	
1. PBS BUFFER	8MIN.
2. 1.5M PROH	10MIN.
3. 1.5M PROH + 0.1M SUC.	10MIN.
4. PLANNER PROGRAM FREEZER	
5. PLUG INTO LIQUID NITROGEN	

2. FREEZING PROGRAM	
1. -2°C/MIN FROM -16°C TO -8°C	
2. HOLD FOR 10MIN.	
3. -0.5°C/MIN TO -13°C	
4. -5°C/MIN TO -15°C	
5. HOLD FOR 2HRS.	

3. THAWING PROTOCOL	
1. ROOM TEMP	30SEC.
2. 30°C WATER BATH	40SEC.
3. 1.0M PROH + 0.2M SUC.	5MIN.
4. 1.5M PROH + 0.2M SUC.	5MIN.
5. 1.0M SUC.	10MIN.
6. PBS	10MIN.
7. 5°C PBS	10MIN.

8. TRANSFER TO HIF	
1. ROOM TEMP	30SEC.

TABLE 2. PREGNANCY AND IMPLANTATION RATE OF THE FROZEN THAWED EMBRYO BY DIFFERENT TRANSFER PROTOCOLS

	NATURAL (N=18)	CLOMID (N=14)	NATURAL/HCG (N=5)	HMG (N=3)	HMG/HCG (N=7)	TOTAL (N=47)
PR/CYCLE (%)	11.1 (2/18)	7.1 (1/14)	0.0 (0/5)	0.0 (0/3)	42.9 (3/7)	12.8 (6/47)
IR/EMBRYO (%)	6.1 (3/49)	2.7 (1/37)	0.0 (0/15)	0.0 (0/12)	14.3 (3/21)	5.2 (7/134)
IR/EMBRYO (%) (500LB)	6.8 (3/44)	2.9 (1/35)	0.0 (0/12)	0.0 (0/9)	15.8 (3/19)	5.9 (7/119)
IR/EMBRYO (%) (1000LB)	11.5 (3/26)	7.1 (1/14)	0.0 (0/5)	0.0 (0/7)	30.0 (3/10)	11.3 (7/62)

TABLE 3. EFFECT OF MULTIPLE REPLACEMENT OF THE FROZEN THAWED EMBRYO ON PREGNANCY RATE

NUMBER OF EMBRYO TRANSFERRED	PR/CYCLE (%)	NUMBER OF 100% EMBRYO TRANSFERRED	PR/CYCLE (%)
5	0.0 (0/3)	5	
4	25.0 (5/12)	4	33.0 (1/3)
3	0.0 (0/13)	3	33.0 (1/3)
2	12.5 (2/16)	2	12.5 (2/16)
1	33.0 (1/3)	1	12.5 (2/16)
TOTAL	12.8 (6/47)	TOTAL	15.8 (6/38)

FIG.1 RESULTS OF THE FROZEN-THAWED EMBRYO TRANSFER BY THE DAY OF REPLACEMENT

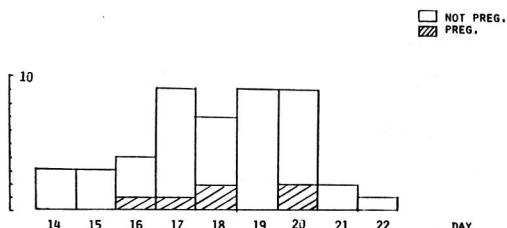


TABLE 4. PREGNANCY RATE OF THE FROZEN THAWED EMBRYO REPLACEMENT BY THE DIFFERENCES OF THE CALCULATED TIME OF ER. AND THE ACTUAL TIME OF ER.

ACTUAL ER. TIME - CALCULATED ER. TIME	PREGNANCY RATE (%)
~ -6	26.7 (4/15)
-5 ~ +5	2.7 (1/15)
+6 ~	9.1 (1/11)

2PN STAGE THAWING WERE EXCLUDED

# 胚盤胞形成過程のマウス胚における アクチンとサイトケラチンの組織化学的観察

Histochemical observations of actin and cytokeratin  
in mouse embryos in the course of blastocyst formation

四谷伊公子・新村末雄\*・石田一夫\*

Ikuko YOTSUTANI, Sueo NIIMURA\* and Kazuo ISHIDA\*

新潟大学大学院自然科学研究科, \*新潟大学農学部農業生産科学科

Graduate School of Science and Technology, and

\*Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Niigata University

目的：哺乳動物において、分割胚の割球は胚盤胞形成前に栄養膜と内細胞塊の細胞に移行すべく形態変化を起こすとともに、胚は小型化することが知られている。また、小型化した胚の割球間に接合装置が形成されるという。一般に、接合装置の形成には細胞骨格系フィラメントが密接に関与しているといわれているので、胚においても細胞骨格系フィラメントは、割球が形態変化を起こす前と起こした後で局在に変化が生じることが考えられる。そこで本実験では、8細胞期から胚盤胞期までのマウス胚について、アクチンとサイトケラチンを組織化学的に検出し、割球の細胞骨格系タンパク質が胚盤胞形成過程でどのように変化するかを調べた。

材料および方法：観察した胚は、小型化していない8ないし16細胞胚、小型化した8ないし16細胞胚および胚盤胞で、過排卵処置を施したICR系マウスから採取した。アクチンを検出するために、胚を3.7%のホルマリンを含むPBS(pH7.4)に室温で30分間固定した後、Tween-20を0.25%含むPBS(T-PBS)に浸漬して透過処置を施した。次いで、胚をPBS100μl中にファラシジン(Molecular Probes)16.5ngを含む液に室温で20分間浸漬し、染色した。一方サイトケラチンを検出するために、Emerson<sup>1)</sup>の方法に準じて胚を処置した。すなわち、透明帯を除去した胚を2%のパラホルムアルデヒドを含むPBSに室温で30分間固定し、T-PBSに浸漬して透過処置を施した。次いで、胚をウサギ抗ケラチン血清(Transformation Res.)またはマウス抗サイトケラチンペプチド14(Sigma)に室温で60分間浸漬した。一次抗体処置後、前者の胚はFITC標識ヤギ抗ウサギIgGに、後者の胚はFITC標識ヤギ抗マウスIgMに、それぞれ室温で60分間浸漬した。なお対照として、アクチン検出にあたってはPBSのみに浸漬した胚を、サイトケラチン検出にあたっては正常ウサギ血清または正常マウス血清

で処置した後二次抗体処置を施した胚、および二次抗体処置のみを施した胚を、それぞれ用いた。処置した胚は落射蛍光顕微鏡装置で観察した。

結果：[アクチン]マウス胚をファラシジンで処置すると、胚の割球あるいは細胞の細胞質にアクチンの存在を示す蛍光が認められたが、この蛍光は対照の胚にはみられなかった。この蛍光は、小型化していない胚の球形割球ではすべての細胞膜直下の細胞質で著しく強かったが、小型化した胚では割球同士が接する部位のみの細胞膜直下の細胞質で強く、それ以外の部位では弱かった。なお、小型化した胚ではこの蛍光を持たない割球も認められた。また、胚盤胞ではこの蛍光は栄養膜細胞同士が接する部位の細胞膜直下の細胞質で強かった。[サイトケラチン]マウス胚をウサギ抗ケラチン血清あるいはマウス抗サイトケラチンペプチド14で処置すると、胚の割球あるいは細胞の細胞質にサイトケラチンの存在を示す蛍光が出現したが、この蛍光は対照の胚にはみられなかった。ウサギ抗ケラチン血清を用いた場合、サイトケラチンの存在を示す蛍光はいずれの時期の胚においてもすべての割球あるいは細胞に認められた。この蛍光は、小型化していない胚の割球では顆粒状を呈していたが、小型化した胚の扁平割球と球形割球および胚盤胞の栄養膜と内細胞塊の細胞では線維状を呈していた。小型化した胚において、この蛍光は球形割球に比べ扁平割球で強かった。一方、マウス抗サイトケラチンペプチド14を用いた場合、サイトケラチンの存在を示す蛍光は胚盤胞にのみ認められ、小型化していない胚と小型化した胚には観察されなかった。この蛍光は、栄養膜細胞と内細胞塊細胞の細胞質で線維状を呈しており、内細胞塊細胞に比べ栄養膜細胞で強かった。

考察：胚盤胞形成過程のマウス胚において、接着帯およびデスマソームは胚盤胞の栄養膜細胞間に形成されるが、デスマソーム前駆体は小型化した胚の扁平割球間にみられるといわれている<sup>2)</sup>。本実験において、接着帯と関係のあるアクチン、およびデスマソームと関係のあるサイトケラチンの検出を組織化学的に試みたところ、アクチンはいずれの時期の胚にも認められたが、その存在を示す蛍光は小型化した胚の割球および胚盤胞の栄養膜細胞ではとくに細胞同士が接している部位の細胞膜直下の細胞質で強かった。したがって、アクチンは胚盤胞の栄養膜細胞で観察される接着帯の形成に深く関与していることがうかがわれた。また本実験において、分子量50,000、54,000および57,000のサイトケラチンの検出を行ったところ、ウサギ抗ケラチン抗体で検出されるサイトケラチンは、観察したすべての時期の胚の割球あるいは細胞に認められたが、マウス抗サイトケラチンペプチド14で検出される分子量50,000のものは胚盤胞にのみ検出され、その存在を示す蛍光は内細胞塊細胞に比べ栄養膜細胞で強かった。したがって、分子量50,000のサイトケラチンは胚盤胞にのみ存在しており、これは胚盤胞の栄養膜細胞間でみられるデスマソームの形成に役割を果たしていることがうかがわれた。

#### 主要文献

- Emerson, J.A. (1988). Development, 104, 219-234.
- Yotsutani, I., Niimura, S. and Ishida, K. (1992). Jpn. J. Fertil. Steril., 37, 74-82.

# ハムスター卵管上皮に対する单クローン抗体を用いた 免疫組織化学的研究

Immunohistochemical study of Oviductal Epithelial  
Cells in the Hamster using Monoclonal Antibody

黒木圭一・木村順平・月瀬 東・岡野真臣

Kei-ichi KUROKI, Junpei KIMURA, Azuma TSUKISE and Masaomi OKANO

日本大学農獸医学部獸医学科獸医解剖学研究室

Department of Veterinary Anatomy  
College of Agriculture and Veterinary Medicine  
Nihon University

**目的：**哺乳類の卵管上皮細胞では数種の糖タンパク質が生合成・分泌されていることが知られている。ハムスター卵管上皮により生産される糖タンパク質については、いくつかの研究報告<sup>1), 2)</sup>があるが、本研究ではさらに未知の機能分子を検索する目的で、ハムスター卵管上皮由来の分子に対する单クローン抗体の作製を試み、得られた抗体の特性を免疫組織化学的に検討した。

**材料および方法：**正常性周期を回帰する成熟ハムスターを発情期の15:00に放血殺後、卵管を採取し PBS中でホモジナイズして免疫原を作製し、BALB/c CrsIc雌マウスに免疫した。このマウス脾細胞とミエローマ (SP2/0) とをpolyethyleneglycol 4000(Merck)を用いて融合させた。得られたハイブリドーマはhypoxanthine-aminopterin-thymidine培地で選択後、2週間hypoxanthine-thymidine培地で培養した。発情期04:00にハムスターから採取した卵管をCarnoy液で固定し、常法に従って作成したパラフィン切片に、培養上清を1次抗体として反応させ、酵素抗体法間接法により特徴的な陽性反応を示すハイブリドーマに関して限界希釈法によるクローニングを2回繰り返した。得られた单クローン抗体を用いて発情期、非発情期および生後1, 3, 4, 5, 7, 9, 16, 21, 24日齢のハムスターの卵管、ハムスターの諸臓器（筋、下顎腺、食道、胃、空・回腸、結腸、膀胱、肝臓、気管、肺、腎臓、精巣、卵巣、子宮、心臓、脾臓、胸腺、脊髄、眼、皮膚）、およびシバヤギの卵管などのパラフィン切片（カルノア固定）に酵素抗体法を適用し観察した。作製した单クローン抗体のアイソタイプはマウス单クローン抗体アイソタイプ決定用キット(Amersham)を用いて決定した。

**結果：**種々の抗体が得られたが、発情期卵管の峡部上皮細胞の核周囲あるいは核上部に選択的に反応(Fig. 1, 2)し、膨大部ではほとんどの上皮細胞に陽性に反応した(Fig. 3)抗体(IgM.  $\kappa$ )について検討した。この抗体の卵管における陽性反応は峡部・膨大部とともに線毛細胞に限られていた。しかし、PMSGおよびHCGを投与し強制的に排卵を誘発させたハムスター卵管上皮細胞には、発情期の卵管で観察されたような強い陽性反応は観察されなかった。また非発情期の卵管上皮細胞にも強い反応を示さなかつた(Fig. 4)。1～24日齢ハムスターの卵管については、全ての上皮細胞の核上部にわずかに反応した(5日齢でのみ、より強く反応した)。シバヤギ卵管では妊娠期の膨大部・峡部上皮細胞とも全く反応は無く、発情期でも膨大部には陽性反応は観られず、発情期の峡部のみが上皮細胞に反応した。他臓器では肺、脊髄では全く反応を示さず、筋、肝臓、卵巣、心臓、脾臓、胸腺でも特異的な反応は見られなかった。子宮では上皮細胞に弱い陽性反応が観られ、食道、空・回腸、結腸、気管では上皮細胞に陽性で一部の杯細胞に反応を示した。胃底では胃小窩付近の壁細胞と思われる細胞が陽性を示した。その他、下顎腺導管、臍外分泌部、尿細管、精祖細胞、網膜、脂腺に陽性反応が観察された。

**考察:** 本研究で得られた単クローナル抗体は発情期の卵管上皮細胞に特徴的に反応することより、この抗体の認識する分子は発情期卵管に出現する分子を認識するものと思われる。この単クローナル抗体が卵管上皮の線毛細胞に特異的に反応しているとすれば、発情ステージによる反応の差は性周期に伴って変化する卵管の粘膜上皮の生理的変化に呼応していると考えられる。未だ卵管上皮の線毛細胞を特異的に認識する単クローナル抗体を用いた研究報告はなされていないが、この単クローナル抗体が認識している分子は性周期に同調した線毛細胞の細胞機能に何らかの関係があると思われる。

- 【参考文献】**
- 1) Abe, H. and Oikawa, T. (1990) Study of the Differentiation of Secretory Cells in the Golden Hamster Oviductal Epithelium by use of a Monoclonal Antibody. *J. Exp. Zool.*, 254:97-106
  - 2) Malette, B. and Bleau, G. (1991) Biochemical Characterization of Oviductin: A Zona Pellucida Binding Protein secreted by the Oviduct. *Biol. Reprod.* 44: 437.

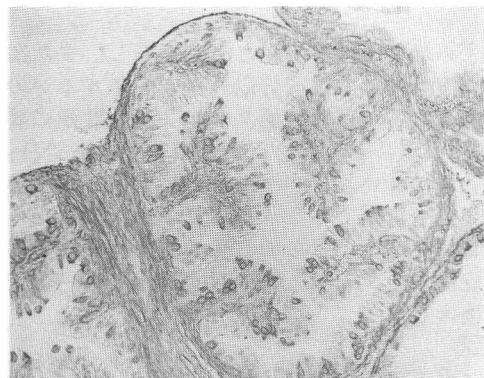


Fig. 1 発情期ハムスター卵管峡部における反応  
× 200

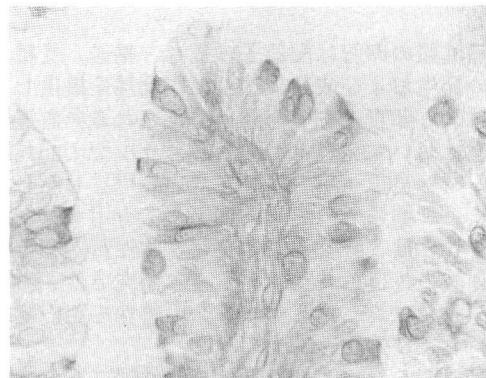


Fig. 2 発情期ハムスター卵管峡部における反応  
× 640



Fig. 3 発情期ハムスター卵管膨大部における反応  
× 640

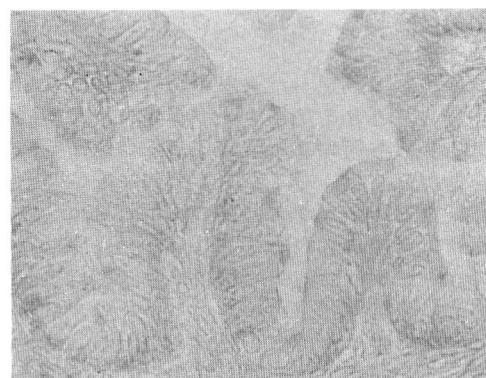


Fig. 4 非発情期ハムスター卵管上皮における反応  
× 640

# シバヤギ卵管上皮に対する单クローニング抗体を 用いた免疫組織化学的研究

Immunohistochemical Study of Oviductal Epithelial cells  
in the Shiba-Goat using Monoclonal Antibody.

山田英雄・木村順平・月瀬東・岡野真臣・森裕司\*

Hideo YAMADA, Junpei KIMURA, Azuma TSUKISE, Masaomi OKANO and Yuji MORI\*

日本大学農獸医学部獸医学科獸医解剖学研究室

\*東京大学農学部獸医学科獸医動物行動学教室

Department of Veterinary Anatomy  
College of Agriculture and Veterinary Medicine  
Nihon University

\*Department of Veterinary Ethology  
Faculty of Agriculture  
University of Tokyo

## 目的

哺乳類の卵管は配偶子の生存・輸送、受精あるいは精子の受精能獲得の場として機能し、また初期胚の発生および成熟に適した小環境を提供している。卵管液中には血漿成分以外に、性ホルモンの支配により卵管上皮で合成・分泌される非血清性高分子も含まれる。卵管分泌タンパク質は数種の哺乳動物において発見されており、ウシではBoiceら(1990)が单クローニング抗体を用いた研究で、卵管分泌タンパク質について検討している<sup>1)</sup>。しかし、ヤギでの報告はない。シバヤギは周年繁殖し産仔数は多く、反芻類での実験動物として有用で、また手術を施す際も容易である<sup>2)</sup>。单クローニング抗体を作成することは、卵管抗原の生化学的性質とその機能解明に有効であるとともに、胚の体外培養における培養液の改良に有益である。本研究ではシバヤギ卵管上皮由来のタンパク質に対する单クローニング抗体の作成を試み、得られた抗体の特性を免疫組織化学的に検索した。

## 材料および方法

発情期のシバヤギ卵管は、黄体期にある成熟シバヤギ（東大牧場産）にPGF2αを投与して人工的に発情を誘起したものから採取した。発情の確認は交尾許容行動・骨盤腔鏡による成熟卵胞の存在の確認により行った。また、黄体期にある卵管は頭尾長約9cmの在胎仔を有する妊娠期シバヤギから採取した。これらのシバヤギから得た卵管は、右側は免疫原用としてPBSに浸漬し、左側は組織標本用に固定した。また、この他2頭の成熟雌シバヤギからは後述する免疫原としての卵管液を手術により採取した。

抗体の作製：成熟シバヤギの卵管ホモジネートまたは卵管液を材料として、免疫原を作製した。卵管に少量のPBSを加えホモジナイズ後、3,000rpm 10分間遠心した上清を免疫原として用いた。卵管液は、開腹手術により卵管子宮部から血管内留置用カテーテルの1端を穿刺・挿入し、右臍部から他端を体外に出し、そこから定期的に採取した。免疫原はBALB/c CrSlc雌マウスに免疫し、このマウスの脾細胞と同系マウス由来のミエローマ(SP2/0)とをpolyethylenglycol 4000 (Merck) を用いて融合させた。得られたハイブリドーマはhypoxanthine-aminopterin-thymidine培地で選択後、hypoxanthine-thymidine培地で2週間培養した。この培養液の上清を酵素抗体法間接法における1次抗体とし、抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングを行った。

免疫組織化学：シバヤギ卵管膨大部および峡部をCarnoy氏液で固定後、常法に従いパラフィン切片を作成して、酵素抗体法間接法により抗体を反応させた。またシバヤギの他臓器、ハムスター卵管についても同様に抗体を反応させた。

レクチン組織化学：シバヤギ卵管膨大部及び峡部をCarnoy氏液で固定後、常法に従いパラフィン切片を作成し、ペルオキシダーゼ標識-レクチニージアミノベンチジン(P0-LT-DAB)法を適用した。なお、用いたレクチンはWGA、SBA、DBA、GS-I、PNA、UEA-Iであり、それぞれ

$\beta$ -GlcNAc・ $\alpha$ -NeuAc(Sialic acid),  $\alpha$ -GalNAc,  $\alpha$ -GalNAc,  $\alpha$ -Gal・ $\beta$ -GalNAc,  $\beta$ -Gal,  $\alpha$ -Fucoseに特異性を有する。

### 結果

種々の抗体が得られたが、そのうちの1つ、1D11抗体は、発情期のシバヤギにおける卵管膨大部の非線毛上皮細胞細胞質の核上部に顆粒状に(Fig. 1)、また妊娠期の卵管膨大部では、線毛上皮細胞間に膨隆突出する細胞質に反応を示した(Fig. 2)。卵管峡部では、発情期および妊娠期のものとともに反応は観察されなかった。他臓器(十二指腸、大腸、脾臓、肝臓、肺、腎臓、子宮、心臓、脾臓、および脊髄)および発情期のハムスター卵管についても同様に反応は陰性であった。レクチン組織化学においては、発情期および妊娠期ともに卵管上皮は種々の反応を示したが、そのうちUEA-1は、発情期の卵管膨大部非線毛細胞(Fig. 3)と、妊娠期膨大部の膨隆出した非線毛細胞に強く反応した。発情期の峡部では殆どの細胞の核上部および自由表面に強く反応したが、妊娠期の峡部では殆ど反応が認められなかった。

### 考察

本研究で得られた1D11抗体は、発情期の卵管膨大部では非線毛細胞を、妊娠期の卵管膨大部においては、形態が発情期の線毛細胞とは多少異なるものの、同じく非線毛細胞細胞質に特異的な反応を示した。卵管の線毛細胞は、主に配偶子の輸送に関与し、これに対し非線毛細胞は卵管液を分泌する働きを有しており、1D11抗体が認識する分子は卵管粘膜上皮非線毛細胞にて分泌される卵管液構成成分の1つであると思われる。また、1D11抗体が発情期の卵管膨大部上皮細胞細胞質の核上部に顆粒状に反応したことは、本抗体が分泌顆粒あるいは濃縮空胞を認識しているものと考えられる。発情期および妊娠期の卵管膨大部でのこの抗体と反応する部位が、UEA-1との陽性反応部位と共通する点もある事から、1D11抗体の認識する分子と $\alpha$ -Fucoseとの関連性も無視できない。以上、1D11抗体は、種・組織特異性が高く卵管上皮分泌物を認識する抗体であると推測される。

- 【参考文献】 1) Boice, M. L., Geisert, R. D., Blair, R. M. and Verhage, H. G. Identification and Characterization of Bovine Oviductal Glycoproteins Synthesized at Estrus. Biology of Reproduction. 1990;43:457-465  
 2) 加納康彦・森 裕司：シバヤギ、実験生殖生理学の展開、1982;367-379

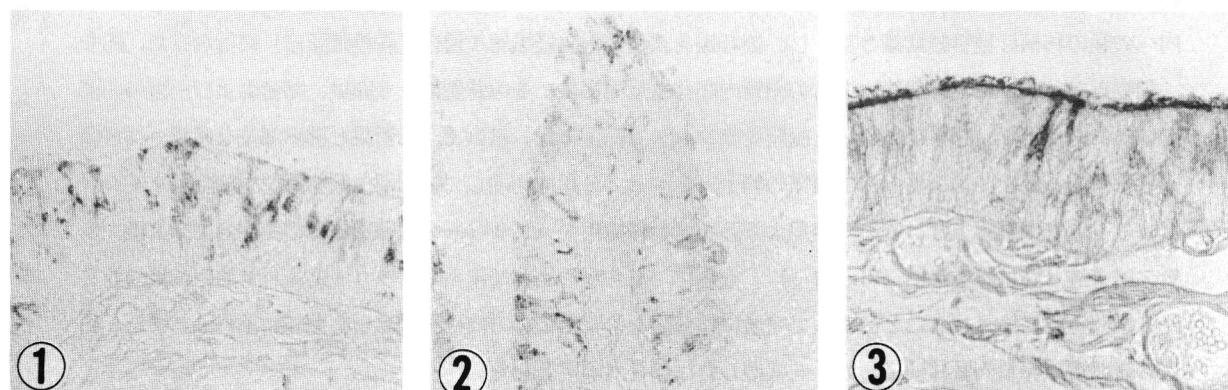


Fig. 1 Immunohistochemical staining of the ampulla of the estrous Shiba-goat oviduct with culture supernatant of hybridoma 1D11.  $\times 640$

Fig. 2 Immunohistochemical staining of the ampulla of the pregnant Shiba-goat oviduct with culture supernatant of hybridoma 1D11.  $\times 640$

Fig. 3 UEA-I staining of the ampulla of the estrous Shiba-goat oviduct.  $\times 640$

# マウスにおける経卵管壁卵管内胚移植の試み

Embryo transfer through the wall of the fallopian tube in mice

中瀬直己・上田 進

Naomi NAKAGATA, Susumu UEDA

日本生物科学研究所

Nippon Institute for Biological Science.

【目的】発生工学を支える周辺技術として、得られた胚の卵管内移植術は産仔を作出する上で最も重要な技術の1つである。しかしながら、従来より行なわれている経卵管采卵管内胚移植<sup>1-4)</sup>は、毛細血管を多数有する卵巣嚢を切開し、その開口部から卵管采を露出せしめ、卵管腹開口より胚を移植するため、出血しやすく、また、個体によっては、十分な卵管采の露出が、極めて困難な場合もあり、子宮内胚移植に比べて非常に熟練を要する。そこで本実験では、卵管采-排卵部位間の卵管壁を介して胚を卵管内へ移植することを試み（経卵管壁卵管内胚移植）、その有用性について検討を行なった。

【方法】移植用胚の作成：移植には、過排卵を施したJcl:ICR系成熟雌マウス（10週齢）より採取した卵子とC57BL/6J成熟雄マウス（12週齢）の精巣上体尾部精子間で体外受精を行ない<sup>5)</sup>、授精24時間後に2細胞期へ発生した胚を用いた。卵管内胚移植：受容雌にはJcl:MCH(ICR)雌マウス（12週齢）を用い、卵管内への胚の移植は精管結紮雄と交配し、偽妊娠を誘起した偽妊娠第1日目（膣栓確認日）に行なった。即ち、動物をアバチンにて麻酔後、通常の卵管内胚移植と同様に、その背側部より卵巣、卵管および子宮の一部を体外に引き出し、卵巣に付着した脂肪をクレンメで固定した。続いて、卵管采と排卵部位を確認、両者間の卵管壁の一部をノエス剪刀にて直径の約1/2～2/3程度切開し、排卵部位側卵管壁を細胞用マイクロピンセットでつまみ上げ、その開口部より胚を含む移植用キャビラリーを排卵部位側の卵管内に挿入後、少量の培養液と共に胚を移植（Fig. 1-a）、さらに、あらかじめ移植用キャビラリーに入れておいた気泡を2～3個卵管内に注入することによって完全に移植胚を排卵部位の方向に移動せしめた（Fig. 1-b）。また、従来の経卵管采卵管内胚移植により胚を移植したものと対照区とした。

【結果】経卵管壁卵管内胚移植法による移植成績をTable 1に示す。112個の2細胞期胚を7匹の受容雌へ移植した結果、全例が妊娠・分娩し、計68匹(60.7%)の新生仔が得られた（A）。一方、卵管腹開口からの卵管内胚移植（B:control）においては、移植胚112個中、73個(65.2%)が新生仔へ発生した。経卵管壁卵管内胚移植法における新生仔への発生率は、卵管腹開口から移植した場合のそれに比べ、若干低値を示したものの、両者間における妊娠率および新生仔への発生率に有意差は認められなかった。

【考察】以上の結果より、経卵管壁卵管内胚移植、即ち、卵管腹開口と排卵部位間の卵管壁を介して受容雌

Fig 1 Method of embryo transfer through the wall of the fallopian tube.

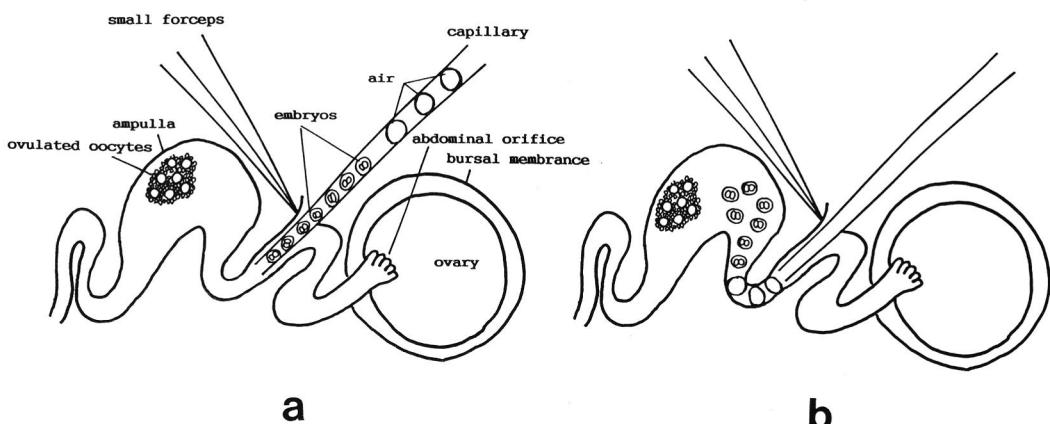


Table 1 Development to live young of 2-cell mouse embryos after transfer to the fallopian tubes of pseudopregnant recipients through the wall of the tubes.

Methods of embryo transfer*	No. of recipients used	No. of embryos transferred	No. of animals which delivered live young	No. of live young(%)
A	7	112	7	68(60.7)
B(control)	7	112	7	73(65.2)

\* A : Embryos were transferred through the wall of fallopian tube.

B : Embryos were transferred through the abdominal orifice of fallopian tube.

の卵管内へ胚を移植すると、高率に新生仔へ発生することが明らかとなった。本法は、従来の卵管腹開口からの胚移植に比べ、①操作自体がきわめて容易かつ短時間で完了すること、②卵管壁の切開は、ほとんど出血を伴わないため、止血用ゼラチンスポンジあるいは双極電気凝固装置<sup>6)</sup>などによる止血処置を必要としないこと、③卵管壁は卵管采に比べ、比較的健常でピンセットでつまみ上げても挫滅しないこと、④胚が卵管内に確実に移植されたか否かの目安となる気泡が、膨大部の卵管壁を通して容易に確認できることなどから、マウスおよびラットの卵管内胚移植に極めて有効な方法と考えられる。

本研究は、文部省科学研究費重点領域研究 No. 01619005 の一部として実施された。

#### 文献

- 1) Noyes, R.W., and Dickman, M.A. (1961). Fert. Steril., 12, 67-79.
- 2) 館鄭、横山峯介、館澄江 (1981). 哺乳動物の初期発生・基礎理論と実験法、妹尾左知丸ら編、pp257-262、理工学社
- 3) 福田芳詔 (1986). 図説哺乳動物の発生工学実験法、菅原七郎編、pp127-133、学会出版センター
- 4) 横山峯介 (1987). 発生工学実験マニュアル、勝木元也編、pp77-103、講談社サイエンティフィク
- 5) 豊田 裕、横山峯介、星冬四郎 (1971). 家畜繁殖誌、16, 147-152.
- 6) 中瀧直己 (1990). 実験動物学会雑誌、39, 593-595.

# 体外受精－胚移植（1991）

## Results of IVF-ET (1991)

小林善宗・本田育子・井上正人・野見山真理・藤井明和

Yoshimune KOBAYASHI, Ikuko HONDA, Masato INOUE,  
Mari NOMIYAMA, Akikazu FUJII

東海大学医学部産婦人科学教室

Department of Gynecology and Obstetrics, Tokai University School of Medicine

目的：1991年度の当科IVF-ET成績を分析し、1988-90年度の成績<sup>1)2)</sup>と比較し最近の傾向を検討した。

結果：91年度対象の年令・不妊期間に変化はなく（表1）、IVF-ET妊娠成立は100名（106妊娠）と最も多数であったが、対ET周期妊娠率は29.9%であった（表2）。採卵～受精には変化がなかった（表3）。

	1988年度	1989年度	1990年度	1991年度
表1.	対象	(M.±S.D.)		
患者数（ET周期）	157名（175）	256名（319）	299名（382）	288名（355）
原発性不妊	79名	128名	152名	144名
続発性不妊	78名	128名	147名	144名
平均年令	33.6±3.6才	33.8±3.9才	33.9±3.6才	34.1±3.6才
平均不妊期間	8.7±3.4年	8.4±3.7年	8.3±3.5年	8.3±3.6年

表2.	IVF-ETの成績			
妊娠患者数	48名	99名	95名	100名
妊娠数	48	104	99	106
対患者妊娠率	30.6%（48/157）	38.7%（99/256）	31.8%（95/299）	34.7%（100/288）
原発性不妊	35.4%（28/79）	34.4%（44/128）	28.3%（43/152）	38.2%（55/144）
続発性不妊	25.6%（20/78）	43.0%（55/128）	35.4%（52/147）	31.3%（45/144）
対周期妊娠率	27.4%（48/175）	32.6%（104/319）	25.9%（99/382）	29.9%（106/355）

表3.	採取卵子数、受精卵数、胚数	(M.±S.D.)		
採取卵子数	7.4±4.3	7.8±4.9	7.8±4.2	6.9±3.8
採取成熟卵子数	5.6±3.6	6.9±3.7	7.4±4.0	6.6±3.7
受精卵数	5.9±3.8	5.9±3.4	6.2±3.7	5.6±3.4
正常受精卵数	4.1±3.0	4.3±2.9	4.7±3.1	4.3±2.8
胚数	4.7±3.2	5.1±3.1	5.4±3.5	4.7±2.9
正常胚数	2.3±1.7	2.7±2.3	2.7±2.4	2.6±2.0

以下91年度の成績を88~90年度の総成績と比較した。過排卵法ではGnRHa-HMG-hCGが大半を占め、その妊娠率は30.9%であった(表4)。移植法別では2日目移植が妊娠率32.4%と最も良好であったが、90年度より導入した3日目移植は91年度では妊娠率22.8%にとどまった(表5)。主な不妊原因別では子宮内膜症が妊娠率37.3%と最も良好であったが、過去に比べて大きな変化はなかった(表6)。年令別では35~39才で妊娠率が21.1%と低下し、40才~では4妊娠が成立したもの(妊娠率 18.2%)すべて継続しなかった(表7)。妊娠の予後では継続率は62.3%で過去よりやや良好であった(表8)。分娩率を各年度別に比較してみると、91年度の予想値は、対ET周期で18.6%, 対患者で22.9%と過去に比べて最も良好なもの、大差がなかった(表9)。

**考察:** 1991年度IVF-ETもすべて外来ベースで行ったが、89年度以後当科のIVF-ET件数・妊娠率はほぼピークに達した感がある。最終的な目標である分娩率も89年度以後ほぼ同様であり、不妊治療として確立したといえる。妊娠率を低下させる最大の因子は年令であり、35才以上の対象に対する成績向上が今後の重要な課題であろう。

**文献:** 1) 小林善宗, 他(1990). 体外受精-胚移植 (1988~1989)、哺乳卵研誌、7, 51  
2) 小林善宗, 他(1991). 体外受精-胚移植 (1990)、哺乳卵学誌、8, 119

表4. 過排卵法別妊娠率(対周期)

	1988~1990年度	1991年度
natural	(0)	0% (0/1)
CC-hCG	0% (0/1)	0% (0/1)
CC-HMG-hCG	27.3% (24/88)	15.8% (3/19)
HMG-hCG	36.8% (7/19)	0% (0/1)
GnRHa-HMG-hCG	28.6% (220/768)	30.9% (103/333)

CC : clomiphene

GnRHa : GnRHagonist

表5. 移植法別妊娠率(対周期)

1日目移植(前核期)	25.2% (117/465)	28.0% (7/25)
2日目移植(2-4細胞期)	32.0% (116/363)	32.4% (81/250)
前核期+胚	0% (0/1)	0% (0/1)
3日目移植(8-16細胞期)	38.3% (18/47)	22.8% (18/79)

表6. 主な不妊原因別妊娠率(対周期)

卵管性	27.8% (136/490)	25.0% (44/176)
子宮内膜症	30.9% (77/249)	37.3% (44/118)
卵管内精子輸送障害	30.9% (17/55)	33.3% (10/30)
原因不明	25.6% (21/82)	25.8% (8/31)

表7. 年令別妊娠率(対周期)

~24才	33.3% (1/3)	100% (1/1)
25~29才	36.4% (44/121)	39.5% (15/38)
30~34才	31.0% (117/377)	38.0% (54/142)
35~39才	26.7% (87/326)	21.1% (32/152)
40~才	4.1% (2/49)	18.2% (4/22)

表8. 妊娠の予後(1992年2月現在)

妊娠	251	106
胎児心拍確認	176 (70.1%)*	77 (72.6%)*
初期流産	60 (23.9%)	31 (29.2%)
子宮外妊娠	24 (9.6%)*	7 (6.6%)*
流産総数	83 (33.1%)	34 (32.1%)
多胎(継続)	53 (21.1%)	19 (17.9%)
分娩	147 (58.6%)*	36 (33.0%)*
ongoing	0	30 (28.3%)*
出生児	217	52
新生児死亡	3 [胎児水腫2] [極小未熟児1]	0
健児	214	52

\*内外同時妊娠 計 5例を含む

表9. 分娩率

	1988年度	1989年度	1990年度	1991年度(予想値)
対周期	16.0% (28/175)	17.2% (55/319)	16.8% (64/382)	18.6% (66/355)
対患者	17.8% (28/157)	21.5% (55/256)	21.4% (64/299)	22.9% (66/288)

# 体外受精－培養－移植系の薬物の安全性試験への 応用：抗癌剤投与雄マウスの受精能試験

Application of in vitro fertilization - embryo culture - embryo transfer system  
on the drug safety evaluation : Fertility of male mice administered  
with the anticancer drug

上田乙也<sup>1)</sup>・鈴木宏志<sup>2)</sup>・松岡章夫<sup>1)</sup>・安達二朗<sup>1)</sup>・杉山修<sup>2)</sup>

Otoya UEDA, Hiroshi SUZUKI, Akio MATSUOKA, Jiro ADACHI, Osamu SUGIYAMA

1)CSKリサーチ・パーク 2)中外製薬

1)CSK Research Park, INC. 2)Chugai Pharmaceutical Co., Ltd

目的：マウスの体外受精－培養－移植系は、ヒトの不妊治療や家畜の繁殖技術の向上のための基礎的研究のみならず、実験動物学の領域においても、自然交配が不能な病態モデル動物の繁殖<sup>1)</sup>、病原微生物の除去（クリーニング）<sup>2)</sup>あるいは1卵生双生児の作出<sup>3)</sup>等に応用されている。本実験では、薬物の安全性試験、特に生殖毒性の評価系への応用の可能性について検討した。雄マウスに投与された薬物の生殖毒性を評価するひとつの系として、無処置の雌マウスとの交配を行い、交尾率、妊娠率、着床数、胎仔死亡率および奇形の有無の観察を行うin vivo実験系が用いられる。本試験では、このin vivo実験系では観察できない着床前の初期発生過程の各段階に対する薬物の影響を評価するための、体外受精－培養－移植系の適用を試みた。

方法：供試動物はICR系あるいはMCH系のマウスを用いた。被験物質としてはDNA合成を阻害し、抗癌作用を持つ白金錯化合物を用いた。10週齢の雄に75mg/kgを、対照群には同容量の生理食塩水を尾静脈内に単回投与した。自然交配は投与後4、5、6週目に、あらかじめ48時間間隔でPMSG, hCG各5iu.を腹腔内投与して過排卵処理を施した雌とを行い、交配翌日に卵管より卵を回収し、受精卵を100μM EDTA添加 Whitten's培地に移し換え、この後96時間まで培養に供した。一部の胚については、培養開始24時間後に2細胞期まで発生したものを偽妊娠0日目（臍栓確認日=Day 0）の受容雌の卵管へ移植した。また、体外受精は投与後4週目に精巣上体尾部から採取した精子を約2時間のプレインキュベートの後、過排卵処理雌より回収した卵に添加して体外受精を行った。

結果：投薬群で、自然交配後に回収された卵の受精率が対照群に比べて低下する傾向や、受精成立の遅延する傾向が認められた。しかしながら、体外受精の結果では、媒精6時間後には投薬群でも96.3%と高い受精率を示したことから、少なくとも精子の卵子への侵入能力には投薬の影響はないと考えられた。受精卵の体外培養と胚移植成績をTable1に示した。体外培養による胚盤胞までの発生率および胚移植Day17の胎仔生存率は、投与後4週目の交配時に投薬群が対照群に比べて有意(p<0.05)に

低下した。しかし、投与後5、6週目の交配では投薬群と対照群の成績の間に有意差は認められず、比較的良好な発生率を示した。

Table1. Development and embryo transfer of the mouse embryos fertilized in vivo in ICR females mated with the males administered with the platinum complex

weeks after administration	No. of embryos cultured	No. (%) of embryos developed to Blasto. (96hr) <sup>1)</sup>	No. of embryos transferred	No. (%) of embryos implanted total	No. (%) of embryos implanted live fetuses
Control	189	151(80) <sup>a</sup>	150	142(95) <sup>a</sup>	125(88) <sup>2)a</sup>
4	103	63(61) <sup>b</sup>	54	45(83) <sup>a</sup>	29(64) <sup>b</sup>
5	104	81(78) <sup>a</sup>	60	51(85) <sup>a</sup>	43(84) <sup>a</sup>
6	86	69(80) <sup>a</sup>	48	41(85) <sup>a</sup>	31(76) <sup>a</sup>

1) time after cultivation

2) Calculated from total numbers of implantation

Values with the different superscripts are significantly different in the same column at p<0.05.

考察：投与後4週目の交配によって得られた受精卵の体外培養、胚移植成績には、投薬の影響が観察されたが、5、6週目には観察されなかったことから、投与された白金錯体が精母細胞から精娘細胞に至る減数分裂期に何らかの異常を誘発し、この生殖細胞が成熟して受精に関わったために初期胚の発生過程の各段階に異常が生じたものと考えられた。体外受精－培養－移植系を用いれば、生殖細胞に対する薬物の影響について、in vivo実験系では観察できない着床前の初期発生過程を詳細に検討することができるため、従来の生殖発生毒性試験系の一部を補完する系として有効に利用し得ると考えられる。

## 文献

- 1) 鈴木宏志ら 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, 96-100. (1987)
- 2) 鈴木宏志ら 体外受精、受精卵移植を用いたマウスのクリーニング(病原微生物の除去)、 哺卵研誌 7, 43-44. (1990)
- 3) 富樫守ら マウスの2細胞期胚分離による一卵生双生仔の作出、 家畜繁殖誌 33, 51-57. (1987)

# ハムスターの卵管内精子移動に及ぼすovulatory products の影響

Effect of ovulatory products on sperm transport  
in the hamster oviduct

伊藤 雅夫<sup>1)</sup>・柳町 隆造<sup>2)</sup>

Masao ITO, Ryuuzo YANAGIMACHI

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

Dept. of Anatomy and Reproductive Biol. Univ. of Hawaii Medical School<sup>2)</sup>

【目的】多くの哺乳動物は発情の開始と排卵がずれており、雌性生殖器道内に射精された多数の精子の殆どは排卵の時間が近づくまで卵管狭部に留まっている。そして、排卵が近づくに従ってごく一部の精子が卵管膨大部分まで上昇して受精に関与する。しかし、排卵と精子の移動がどのように同調されているか、そのメカニズムは明らかにされていない。本研究は精子の雌性生殖器道内の移動に及ぼす排卵の影響を明らかにする目的で、排卵に伴って生じる生理的諸現象と精子の移動との関連性について、ovulatory productsの影響を中心に検討したものである。

【方法】供試動物：成熟シリアンハムスター（雌；2-3、雄；4-6月令）で、これらの雌は正しく4日の性周期を有し、Day4の18:00-19:00hに発情が開始し、Day1の00:30-02:00hに排卵する集団から選抜された。

①Technovitによるovulatory productsの卵管内侵入阻止の影響：Day4の20:00hから30分間交配した雌について、Day4の23:00hにTechnovitを右側の卵巣腔内へ注入した。これらの動物を交配後12時間で屠殺し、卵管の組織を作成した。②ovulatory productsの卵管内注入の影響：Day4の20:00hから30分間交配した雌について、交配後直ちに開腹し、予め他の動物より採取したovulatory productsを左側卵巣腔内にのみ注入した。さらにDay4の23:00hに再手術し、Technovitを両側の卵巣腔内へ注入した。右側の卵管を対照として左側卵管内の精子数からovulatory productsの卵管内注入の影響を検討した。精子数の算定：卵管の連続切片を(10μ)作成し、卵管内精子数を顕微鏡下でIntramural Isthmus (In. I.), Caudal I. (Ca. I.), Cephalic I. (Ce. I.), Ampulla (Amp.)の4部位に分けて算定した。固定はA.F.A.固定液、染色はSchiff's reagentとFast Green F.C.F.で行なった。

【結果】Technovitの卵巣腔内注入によって排卵を物理的に阻止した時の卵管内精子数を表1に示す。交配後6時間目(2:00h Day1)における卵管内の精子数は、Technovit注入群と対照群の間に差が認められなかった。

Ce. I., Amp. に存在する精子数は両者とも無処置の場合に比べて少なく、排卵直前の手術の影響が残っているのかも知れない。交配後12時間目(8:00h Day1)において Ce. I., Amp. 内に分布する精子数は Technovit 注入群において有意に少なく、排卵直前の Technovit による排卵の阻止が精子の卵管内上昇を阻害している。我々は、排卵後の Technovit の注入が卵管内の精子移動に何ら影響を与えないことを認めており (哺乳卵学誌, Vol. 8, 89-90. '91) ovulatory products が精子上昇を誘引している事が示唆される。表2は Technovit で排卵を阻止する前に、他の動物から採取した ovulatory products を卵管膨大部に入れた場合の精子の上昇を見たものである。Ce. I., Amp. 内に分布する精子数は ovulatory products 注入側において有意に多く、ovulatory products が精子上昇を誘引すること裏付けられた。

Table 1. Mean number, (range) and distribution of spermatzoa in the oviduct after Technovit injection into the bursa cavity.

Type of Treatment	Hours after Mating	Number of Oviduct	Segments of the oviduct				Total
			Intramural isthmus	Caudal isthmus	Cephalic isthmus	Ampulla	
Mate 20:00 h Day4 & Technovit 23:00 h Day1	6	4	5673 (1228-10422)	3508 (359-6823)	0.3 (0-1)	0.5 (0-1)	9181 (1580-11104)
Control Mate 20:00 h Day4	6	4	11719 (8209-18366)	9533 (5950-15408)	2.0 (0-3)	0.8 (0-2)	21255 (15157-28383)
Mate 20:00 h Day4 & Technovit 23:00 h Day1	12	4	2404 (1993-2814)	1821 (1248-2393)	3.5* (3-4)	4.5* (2-7)	4233 (4072-4393)
Control Mate 20:00 h Day4	12	4	5723 (5239-6207)	5164 (4478-5850)	15.0 (12-18)	21.5 (5-38)	10924 (9740-12107)

\*Significantly different from control (p<0.05)

Table 2. Mean number, (range) and distribution of spermatzoa in the oviduct after ovulatory products injection into the bursa cavity.

Type of Treatment	Hours after Mating	Number of Oviduct	Segments of the oviduct				Total
			Intramural isthmus	Caudal isthmus	Cephalic isthmus	Ampulla	
Mate 20:00 h Day4, Ovulat.pro. 21:00 h & Technovit 23:00 h Day1	12	4	1040 (352-1624)	832 (485-1827)	5.2 (4-7)	11.0* (8-13)	1869 (735-3212)
Control Mate 20:00 h Day4 & Technovit 23:00 h Day1	12	4	1840 (891-2641)	1221 (485-1827)	3.2 (2-5)	3.0 (1-5)	3068 (1402-4283)

\*Significantly different from control (p<0.05)

# 家兎卵管膨大部の遠位端における 精子の受精能獲得と卵分割

Sperm capacitation and cleavage of ova  
in the ampulla of the tube in rabbits

○成相 孝一・金山 喜一・遠藤 克・佐久間 勇次

Koichi NARIAI, Kichi KANAYAMA, Tuyoshi ENDO, Yuzi SAKUMA

日本大学農獣医学部獣医生理学教室

Department of Veterinary Physiology, College of Agriculture  
and Veterinary Medicine, Nihon University

【目的】哺乳動物における卵管は、精子の受精能獲得、受精および受精卵子の分割が遂行される部位として生殖現象には不可欠な器官の一つとして注目される。これらの卵管の機能は、生理的には卵管の各部位が分担して担っていると考えられる。すなわち、受精部位への排卵卵子の運搬および受精部位の提供は卵管膨大部が、精子の受精能獲得については、子宮環境とともに卵管峡部が、また受精卵子の分割は主として卵管峡部が担当している。

近年、中川・湯原<sup>1)</sup>の報告によると、卵管峡部上皮は、膨大部上皮の産生しないタンパクを產生・分泌している可能性を示している。この知見も卵管膨大部と峡部が生理的に異なる機能を持っていることを示唆するものである。一方、KANAYAMAら<sup>2)</sup>は、卵管閉塞モデル家兎を用いて卵管全長の10%程度の卵管遠位端において4細胞期の分割卵子を得ている。そこで今回、演者らは、受精卵子の分割に関して生理的に大きな役割を持たないと考えられる卵管膨大部において、受精卵子の発育限界について検討を加えた。

【方法】供試動物は、体重2.8~3.2kgの成熟未経産家兎13例で、これらを全身麻酔下で開腹し卵管膨大部・峡部接合部(ampullary-isthmic junction ; AIJ)を、絹糸を用いて結紮した。この操作の後、卵管采より卵管膨大部内に、B0液<sup>3)</sup>で100倍に希釈した精液を0.03~0.05mlの範囲でガラス製キャビラリーを用いて注入した。なお、供試精液は成熟雄家兎より人工腔法により採取したものを用いた。卵管内に精液を注入した1時間後に排卵を誘起する目的でhCG 75iuを耳介静脈内に投与した。各供試動物はhCG投与後、36~80時間目に安楽死させ、左右卵管を摘出して卵管膨大部を灌流することにより

排卵卵子を回収した。回収卵子は、実体顕微鏡下で分割状況について検討した。さらに分割卵子については、40%正常家兔血清加 TCM-199 を用い、5% CO<sub>2</sub> in airで培養し胚盤胞への発育について観察を行った。

【結果】回収卵子の受精状況については、合計で40個回収された卵子のうち17個が分割卵子で、受精率は42.5%であった。この受精卵子の回収された残存卵管の中で最短のものは2.0cmであり、これは卵管全長の18.5%に相当するものであった。また、回収卵子の分割段階は、8細胞期から桑実胚期の範囲であった。なお、回収された卵子の全てに、卵管峡部において付着するムチン層の形成は認められなかった。分割卵子の培養成績については、回収された17個の分割卵子の全てがhatching blastocystまで発育した。

以上の成績より、生理的には子宮および卵管峡部で行われると考えられている精子の受精能獲得が卵管膨大部のみでも起こり得ることが明かとなった。さらに、生理的には受精卵子の分割に大きな役割を果たしていない卵管膨大部の一部遠位端において受精卵子は胚盤胞にまで発育することが明かとなつた。

Table 1 Results of the experiment

remain oviduct whole oviduct (%)	(remain oviduct) :(whole oviduct) (cm)	No. of ruptured points	No. of ova recovered	development stage of ova recovered		
				mono cell	8 cell	morula
12.2	1.9:13.1	5	2	2		
18.5	2.0:10.8	4	4		1	3
19.1	1.8: 9.4	1	1	1		
23.4	3.2:13.7	5	3	3		
23.5	4.3:10.1	4	2	2		
26.9	3.6:13.4	4	2	1	1	
31.8	5.6:17.6	4	4			4
32.5	5.3:16.3	5	4	1		3
32.6	2.8: 8.6	5	2	1		1
36.9	3.8:10.3	2	2		2	
37.7	3.4: 9.1	2	1	1		
42.4	3.9: 9.2	2	2	2		
44.5	5.3:11.9	5	5			1
45.0	4.5:10.0	5	4	1		1
55.8	4.8: 8.6	3	2	1	2	2

## 【文献】

- 1) 中川 豊, 湯原 正高 : 無血清培養ブタ卵管膨大部上皮細胞と峡部細胞の形態および産生タンパクについて. 第80回家畜繁殖学会講演要旨. 1991; 81.
- 2) K. Kanayama, T. Endo and Y. Sakuma : Relation between fertilization rate and length of remaining oviduct in intratubally inseminated rabbits with obstructed oviducts. Jpn. J. fertil. steril. 1991; 36(2): 290-297.
- 3) Brackett, B.G. and Oliphant, G. : Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. Biol. Reprod. 1975; 12: 260-274.

ヒト精子性状と精子のアクロシン、ヒアルロニダーゼ、  
チューブリン、ダイニン、アクチン

Human Semen Properties in Sperm Acrosin, Hyaluronidase,  
Tubulin, Dynein and Actin

菅野孝子・吉松宣弘・佐々木宏子・中木純子・藤森 淑・柳田 薫・星 和彦

Takako SUGANO, Nobuhiro YOSHIMATU, Hiroko SASAKI, Junko NAKAKI,  
Shuku FUJIMORI, Kaoru YANAGIDA, Kazuhiko HOSHI

福島県立医科大学産科学婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology, Fukushima Medical College

【目的】受精には精子先体反応と尾部の運動性が不可欠である。先体酵素には、acrosin(AC), hyaluronidase(HY), が含まれ、尾部鞭毛は、tubulin(TU), dynein(DY), actin(ACT)等から構成されている。これらの蛋白質が欠損することなく正常に機能することが必要である。このたびserono社において、AC, HY, TU, DY, ACTを免疫学的手法で蛍光染色し、光学顕微鏡レベルで観察可能としたSperm screenが開発されたので、これを用い、不妊症患者の精子について検討した。

【方法】当科でAIH、もしくはIVF-ETを行った55例の不妊症カップルの精子を対象とした。swim-up法で得た運動良好精子を洗浄調整し、スライドグラスにマウント風乾後、pureメタノール, pureアセトンに浸し固定した。まずNormal Goat Serumと反応させ、次に第一抗体を滴下し高湿度下4°Cに一晩放置した。最後にAnti-AGG Second Antibody FITCを滴下し、室温で60分間反応させ蛍光顕微鏡で観察した。一検体当たり100個以上の精子についてその染色の有無を観察し、各々の蛋白の陽性率を精液分析成績と比較検討した。

【結果】結果を表1から4に示した。WHOの精液分析基準から55例を分析すると、正常27例、乏精子症7例、精子無力症25例となり、Teratozoospermiaは含まれなかった。精液性状異常群では、全ての蛋白で減少を認め、HYは正常群に比較し有意に減少していた。精子運動率50%未満群と50%以上群で比較すると、いずれも精子無力症群で減少を示し、TUでは有意差を認めた。精子奇形率25%以上群と25%未満群とで比較すると、全ての蛋白が奇形高率群で著明に減少し、TUとACTに有意に減少を認めた。精子濃度による陽性率の変化は全ての蛋白に認められなかった。

【結論】男性不妊の精子に先体酵素や鞭毛構成蛋白の減少が認められた。奇形率の高い精子や、運動性の低下している精子には、各蛋白が欠損し器質的機能的異常の存在することが示唆された。また、精子濃度と先体酵素・尾部構成蛋白質の間に関連はなく、造精機能とは無関係であると思われた。

【参考文献】

- 1) B. Baccetti, et al: J. Submicrosc. Cythol. Pathol., 20(1), 209, 1988

- 2) 毛利秀雄: Nature, 217, 1053, 1968  
 3) B. Baccetti, et al: J cell Biol., 88, 1981

表1 Male Infertility精子のSperma screen成績

	semen analysis			no.	sperma screen陽性率 %				
	conc. ×10 <sup>6</sup> /ml	motil. %	anom. %		AC	HY	TU	DY	ACT
不妊群	<20 or <50 or 50≤			28	85.8±25.2	83.3±19.4	84.9±25.5	89.5±17.9	91.4±18.0
正常群	20≤ & 50≤ & <50			27	93.9±6.1	95.1±6.6	95.2±4.5	93.6±15.4	97.4±3.7
p value					ns	P<0.05	ns	ns	ns

表2 Oligozoospermia精子のSperma screen成績

精子濃度 ×10 <sup>6</sup> /ml	no.	Sperma screen陽性率 %				
		AC	HY	TU	DY	ACT
<20	7	86.3±16.5	78.0±18.8	91.8±8.2	90.8±9.3	90.3±8.9
20≤	48	89.6±20.8	90.7±14.9	89.8±20.0	91.6±17.4	95.4±12.3
P value		ns	ns	ns	ns	ns

表3 Asthenozoospermia精子のSperma screen成績

運動率 %	no.	Sperma screen陽性率 %				
		AC	HY	TU	DY	ACT
<50	25	84.2±26.5	84.1±19.5	83.4±26.6	89.0±18.7	91.2±18.5
50≤	30	94.5±5.8	93.0±10.3	95.5±4.4	93.8±14.7	97.3±3.7
P value		ns	ns	P<0.05	ns	ns

表4 精子奇形率の高い精子のSperma screen成績

奇形率 %	no.	Sperma screen陽性率 %				
		AC	HY	TU	DY	ACT
25≤	6	76.7±35.9	78.4±18.8	43.0±45.5	79.0±36.2	83.4±33.3
<25	49	91.1±16.0	90.2±15.3	94.1±7.5	93.1±12.5	96.4±5.2
P value		ns	ns	P<0.05	ns	P<0.05

# 哺乳動物卵子学会誌投稿規定

1. 投稿論文は、原則として哺乳動物卵子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 (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 (Results)、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 $17\beta$ -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

# 哺乳動物卵子学会会則

## 第1章 総 則

### (名 称)

第1条 本会は、哺乳動物卵子学会と称する。

### (事務局)

第2条 本会の事務局は、東京都内または近隣県内に置く。

## 第2章 目的および事業

### (目 的)

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

### (事 業)

第4条 本会は、前条の目的を達成するために、次の事業を行う。

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

## 第3章 会 員

### (会 員)

第5条 本会は、次の会員をもって組織する。

- (1) 正会員は哺乳動物卵子に関する研究に従事しているか、または関心を有する者。
- (2) 賛助会員は本会の主旨に賛同する法人およびこれに準ずる者で理事会が認めたもの。
- (3) 本会には名誉会員をおくことができる。

名譽会員は、本会に多大の貢献のあった正会員で理事会で推薦し、総会で承認された者。

### (入 会)

第6条 本会に入会しようとする者は、所定の入会申込書に必要事項を記入し、入会金および年度会費を添えて事務局に申し込むものとする。

### (退 会)

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

第8条 会員は、次の事項に該当する時は会員の資格を失う。

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

#### 第4章 役 員

##### (役 員)

第9条 本会に次の役員を置く。

会長 1名  
副会長 1名  
理事 25名以内  
監事 2名  
評議会 若干名  
幹事 若干名

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

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

第11条 役員の選出は、次によって行う。

- (1) 会長および副会長は、理事の互選による。
- (2) 理事および監事は、理事会で推薦し、総会で決定する。
- (3) 評議員は理事会の推薦により、総会の議を経て選出される。
- (4) 幹事は、会員中より会長が委嘱する。

第12条 役員の任期は2年とし、再任を妨げない。

#### 第5章 会 議

##### (理事会)

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

2. 理事会は定数の½以上をもって成立し、決議は、出席者の過半数をもって決する。

##### (評議会)

第14条 評議員会は会長が招集し、評議員の½以上の者が出席しなければ、議事を開き決議することができない。但し、委任状

をもって出席とみなす。

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

#### (総会)

第15条 総会は毎年1回開催する。ただし、会長または理事の過半数が必要と認めたときは、臨時にこれを聞くことができる。

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

第16条 総会は次の事項を審議し、決定する。

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

#### 第7章 学術集会

##### (学会长選任)

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

##### (学術集会の運営)

第18条 学術講演会は学会长が主催する。

#### 第7章 会務

##### (会計)

第17条 本会の会計年度は、毎年4月1日に始まり翌年3月31日に終わる。

2. 本会の経費は会費、寄付金およびその他の収入をもってこれにあてる。

#### 附 則

この会則は、学会への移行に伴い平成3年4月1日から施行する。

## 哺乳動物卵子学会役員

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・医科研）

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（慶應大）	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 溫（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）	吉松宣弘（福島県立医大）

## 第15期活動計画決まる

平成3年11月 日本学術会議広報委員会

日本学術会議は、このたび開催した第113回総会において、第15期活動計画と新しい特別委員会の設置を決定しましたので、その概要をお知らせいたします。

### 日本学術会議総会における内閣官房長官挨拶

平成3年10月23日(水) 日本学術会議講堂

日本学術会議第113回総会に当たりまして、一言ご挨拶を申し上げます。

御承知の通り、日本学術会議は、我が国の科学者の内外に対する代表機関として、科学の向上発展を図り、行政、産業及び国民生活に科学を反映浸透させるという重大な責務を負っております。

21世紀に向けて、さらに調和のとれた真に豊かな国民生活を実現するためには、創造性豊かな科学技術は申すまでもなく、学術全般を一層発展させることが必要であります。また、我が国の国際的地位の向上に伴い、全地球的視点に立った我が国国際的な貢献が強く求められております。

そこで、日本学術会議の皆様におかれましては、日本の科学研究の一層の進展のために、長期的かつ高い観点から議論を重ねていただくとともに、科学研究の分野において我が国がどのような国際的貢献をなすべきか等自然科学のみならず、人文・社会科学も含めた全学問的領域から総合的に検討していただき、建設的な御意見を積極的にお出しいただきたいとお諮りをいたします。

頂戴いたしました有意義な御意見につきましては、その実現に最大限の努力をいたしたいと考えております。

終わりに、日本学術会議の今後の御発展と、御出席の皆様方の御健勝を祈念いたしまして、私の挨拶をいたします。

### 日本学術会議第113回総会報告

日本学術会議第113回総会（第15期・第2回）は、10月23日～25日の3日間開催された。

総会冒頭、官房長官の挨拶があった。（上掲）

近藤会長からの前回総会以降の経過報告に統いて、運営審議会附置委員会、部会、常置委員会、国際対応委員会の各委員長、部長からの報告があった。そして第15期日本学術会議の活動方針となる「第15期活動計画（申合わせ）」と「臨時（特別）委員会の設置について（申合わせ）」（別掲）の2件の提案があり、真剣な討議の後、一部修正をして、圧倒的多数の会員の賛成により可決した。この2件の提案内容は、前回の臨時総会で設置された第15期活動計画委員会

が審議を重ねて作成したものであり、またその間に2回の連合部会及び部会を開いて、各会員の意見を集約したものである。

総会2日目は、予定を急遽変更してSSC（超電導超大型粒子加速器）計画についての討議を行った。これは去る10月15日に運営審議会のメンバーに対し、米国大統領補佐官D・アレン・ブロムリー博士が、SSC建設計画に関して日本の協力を求めるスピーチを行ったのに対し、第4部から総会討議資料が提出されたためである。中嶋貞雄第4部長と伊達宗行会員が登壇し説明を行い質問等に答えた後討議に入った。午後も熱心な討議は続き政府に対して要望を提出することが採択された。

内閣官房長官挨拶の中で諮られた学術に関する国際対応については、第15期活動計画の中にも提唱されているが学術会議としては、今後、重要案件として審議することとした。

このほか、広報委員会、将来計画委員会も開催された。

総会3日目は、各常置委員会、各特別委員会（第1回会議）が開催された。

### 第15期活動計画

日本学術会議は、創設以来、科学者や学術研究団体との連携の下に、その目的・職務の遂行に努力し、我が国の学術研究体制の整備についての重要な勧告等を行い、研究所の設立などを含めて数々の業績を挙げてきた。また、数多くの国際学術団体との連携・協力、国際学術協力活動への参加など世界の学界と提携しつつ学術の進展に貢献してきた。しかしながら、創設後40余年を迎えた現在、学術を取り巻く状況は、国際的にも国内的にも著しい変化を生じた。このような状況を踏まえて、第15期日本学術会議は、本会議の創設以来の基本的精神を引き続き堅持しながら、変動の激しい内外情報に対応して、なお一層の成果を挙げるべく努力する。

日本学術会議は、学術に関する重要事項を自主的に審議し、我が国の学術研究の在り方についての方策を立案し、学術研究の成果を行政、産業及び国民生活に反映浸透させることを使命としている。このため、会員の科学的知見を結集し、時代の要請に即応しつつ将来を見通し、以下の視

点から学術研究の一層の推進を図る。

人文・社会及び自然科学を網羅した日本学術会議は、全學問的視野に立ち、学術研究団体を基盤とする科学者の代表機関であることを認識して、全科学者の参加と意見の集約を図らなければならない。さらに、本会議が集約した科学者の意見を速やかに政策の形成に反映させるようすべきである。特に学術政策については、他の関係諸機関との連携を強化し、その実現を図る。

また、学術研究団体を基盤とする日本学術会議は、関係ある学術研究団体等から推薦された科学者を中心として構成される研究連絡委員会の重要性を認識し、その活動を強化するとともに、学術研究団体との連絡を密にし、研究基盤の強化を図り、高度化する学術の発展に貢献する。

我が国の科学者を内外に代表する機関である日本学術会議は、国際社会における我が国の地位の向上に照らし、海外諸国の期待と時代の要請にこたえて、学術の分野における国際貢献に積極的な役割を果たすべきである。

日本学術会議は、真理探求という基本理念に立脚し、国民とともに学術の在り方を考え、同時に学術の国際性を重視するものである。そのためには、学術の健全な発展に向けて、学問・思想の自由の尊重と研究の創意への十分な配慮の下に、長期的かつ大局的な視点に立ち、創造性豊かな研究の推進に努める。

科学が文化国家の基礎であるという確信に立ち、日本学術会議は、科学者の総意を代表してその精神を高揚したい。即ち、21世紀に向けて学術体制及び研究・開発の望ましい在り方を抜本的に検討し、我が国の学術政策に指針を与えることにより、国民の期待にこたえるとともに、人類の福祉と世界の平和に貢献することを期するものである。

## 1. 重点目標

第15期活動計画の重点目標は、次のとおりとする。

### (1) 人類の福祉・平和・地球環境の重視

今世紀において、科学・技術は長足の進歩を遂げたが、一方において、地球環境の悪化を始めとして、人類の将来を脅かすような事態が起こっている。さらに現在の世界は、激動の渦中にあり、その影響は、学術の分野にも及んでいる。

今日の社会的現実が提起している問題を解決するには、直接に関係する研究だけでなく、広く諸科学が積極的に関与する必要がある。そのためには、多くの研究領域が、それぞれ独自に一層の深化を図るとともに、共同の努力を行い、研究の内容、学問体系の変革にまで進むべきである。人文・社会及び自然科学を包含する日本学術会議は、その特徴を生かして十分な審議を行い、人類の福祉・平和・地球環境を重視して、学術研究の進むべき方向を提示する。

### (2) 基礎研究の推進

学術の研究は、人類の発展に不可欠であることは言をまたない。日本学術会議は、将来の学術の発展に向けて、各分野の基礎研究の推進に積極的に取り組むこととする。

また、学術の領域は広範多岐であり、基礎研究であれ応用研究であれ、それぞれの領域ごとに方法論も異なり、研究者の求めるものに大きな違いがあることを十分に考慮し、各分野の研究者の声を聞き、それぞれに適した育成策を講ずる必要がある。それと同時に、学術研究の動向に注目し、いわゆる学際的研究や学問の総合化に留意しつつ、諸科学の調和のとれた発展を目指すことが重要である。

以上のため、第13期においては学術研究動向、第14期においては学術研究環境に関する調査研究を行い、我が国の学術水準の国際比較やその発展を阻害する諸因子な

どを指摘した。本期においては、これらの調査結果を参考にしつつ、創造性の基礎となる個人の着想を重視し、かつ、国際的にみた学術研究の動向を見極め、独創的研究の強化策等を積極的に図る。さらに、国民生活の向上発展に資する学術的具体的方策を審議提言する。

### (3) 学術研究の国際貢献の重視

学術研究は、本来、真理の探究を目指す知的活動であり、その成果は広く人類共通の資産として共有されるべきものである。したがって、学術の国際交流は、学術研究にとって本質的に重要であり、その在り方に常に関心を払う必要があることは言うまでもない。

さらに近年は、国際平和の推進や環境問題の解決等、いわゆる地球的あるいは国際的規模の課題について、我が国の研究を充実させつつ、広く世界の諸科学の発展を積極的に推進する必要が増大している。また、発展途上国及び近隣諸国の学術振興のため、これら諸国の研究者に協力して、貢献策を立案することが強く要望されている。これらのことから、我が国の科学者が今後積極的に国際貢献に取り組み、学術を人類の繁栄と世界の平和に役立てるため積極的な役割を果たすことが必要となりつつある。

以上のような状況から、本会議が築いてきた国際学術交流・協力の在り方についての諸原則と実績を基盤として、学術の国際交流・協力の飛躍的な拡充強化を図り、国際的寄与を格段に拡大することが極めて重要である。

### 2. 具体的課題（要旨）

次の課題を選定した。

- (1) 科学者の倫理と社会的責任
- (2) 学術研究の長期的展望
- (3) 研究基盤の強化と研究の活性化
- (4) 研究者の養成
- (5) 学術情報・資料の整備
- (6) 学術研究の国際交流・協力
- (7) 國際対応への積極的取り組み
- (8) 文化としての学術
- (9) 平和と安全
- (10) 死と医療
- (11) 生命利學と社会的諸問題
- (12) 人口・食糧・土地利用
- (13) 資源・エネルギーと地球環境
- (14) 巨大システムと人間

### 3. 具体的課題への対処及び臨時（特別）委員会設置

について（省略）

注：国際対応委員会の扱いは常置委員会の並びとする

◇今回の総会決定により設置された特別委員会◇

- ・文化としての学術
- ・平和と安全
- ・死と医療
- ・生命科学と社会的諸問題
- ・人口・食糧・土地利用
- ・資源・エネルギーと地球環境
- ・巨大システムと人間

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期特別委員会の活動始まる

平成4年3月 日本学術会議広報委員会

日本学術会議では、昨年の10月の総会において設置された第15期の各特別委員会が活動を始めましたが、今回の日本学術会議だよりでは、これらの特別委員会に加えて、日本学術会議主催 I G B P シンポジウム等についてお知らせいたします。

### 第15期の特別委員会

昨年10月の第113回総会で決定された、日本学術会議の第15期活動計画では、活動の重点目標として、①人類の福祉・平和・地球環境の重視、②基礎研究の重視、③学術研究の国際貢献の重視、の3本の柱を掲げるとともに、これらの重点目標を踏まえて、多方面の科学者によって構成される日本学術会議にふさわしく各分野にわたって広く対応し、かつ第15期中に適切な形で報告・提言に取りまとめるべき具体的課題として14の課題を選定している。

具体的課題のうち、今期中に一応の結論を出すことが望ましい臨時の7つの課題については、それぞれ特別委員会を設置し、審議を開始した。

各特別委員会の名称及び任務等は次のとおりである。

#### ◆文化としての学術

委員長：室間 宏（第4部会員）

（任務）学術は、人類発展の基礎である。学術研究の意義についての社会的認識を深めるため、文化としての学術の在り方を検討する。

#### ◆平和と安全

委員長：香西 茂（第2部会員）

（任務）平和と安全の確保や国際摩擦の解消等に関する研究推進の在り方及び研究体制等について検討する。

#### ◆死と医療

委員長：小坂二度見（第7部会員）

（任務）医療技術の急速な進展は、自然科学の分野だけでなく、人文・社会科学の領域にも種々の問題を提起している。終末医療における尊厳死、安楽死や医療経済の問題、さらに説明と同意などの社会的側面等人の死と医療の在り方について検討する。

#### ◆生命科学と社会的諸問題

委員長：山科郁男（第7部会員）

（任務）生命科学とその応用の急速な進展に伴い、倫理的、社会的諸問題並びに規制の在り方等について検討する。その際、我が国における生命科学の研究体制の在り方にも留意する。

#### ◆人口・食糧・土地利用

委員長：梶井 功（第6部会員）

（任務）世界人口の増加や地球環境変化による食糧需給の不安定化問題と、これらに伴う土地利用変化の諸影響等を総合的に検討して、人間活動の在り方を探る。また、一極集中の激しい我が国の現状を勘案し、今後の国土利用の在り方についても検討する。

#### ◆資源・エネルギーと地球環境

委員長：吉野正敏（第4部会員）

（任務）資源・エネルギーの開発と利用に伴う自然及び人間社会への影響を研究し、「持続可能な発展」のための諸方策と環境教育の在り方等について検討する。

#### ◆巨大システムと人間

委員長：内山喜久雄（第1部会員）

（任務）技術革新・システムの巨大化が人間に及ぼす影響について、安全性確保と人間性尊重の立場から検討する。

これらの各特別委員会は、発足以来現在までに各々2～3回の会議を開催して、それぞれの任務に添った具体的な審議課題や今後の審議計画等について熱心に審議を進めている。今後の審議の成果が大いに期待されているところであり、今後、審議成果が発表され次第紹介していく予定である。

### 公開講演会の開催状況

第15期に入って、初めて開催された日本学術会議主催公開講演会は、「文明の選択—都市と農業・農村の共存を目指して」と題して、平成4年1月27日(月)13時30分～16時30分に、福岡明治生命ホール（福岡市）で開催され、水間会員（第6部）、北村会員（第6部）及び利谷会員（第2部）の講演が行われ、多数の聴講者がいた。

つづいて、「子どもの人権を考える」と題して、平成4年3月7日(土)13時30分～16時30分に、日本学術会議講堂で開催され、堀尾会員（第1部）、永井会員（第2部）及び馬場会員（第7部）の講演の後、熱心な質問が続出した。

### 地球圏－生物圏国際協同研究計画(I G B P)シンポジウム

日本学術会議主催の地球圏－生物圏国際協同研究計画(I G B P)シンポジウム「日本のI G B P研究の現状と将来」が去る2月4日(火)、5日(水)の両日、日本学術会議を会場として開催された。

日本学術会議においては、平成2年4月の総会において、「地球圏－生物圏国際協同研究計画(I G B P)」の実施について(勧告)」を採択し、政府に対し研究の積極的な推進を求めたところであるが、I G B Pについて国内の各研究者、研究機関において実施される研究の促進を図るととも

に、この研究が極めて多くの分野にわたり、また多数の研究機関が関与していることから、この研究の連絡、調整を図る場として、本シンポジウムを開催することとしたものである。また、我が国のIGBPの研究が、広義のモンスーン・アジア地域、西太平洋地域、極域を中心に行われることから、これらの地域の研究者を招きそれぞれの国の研究の状況の紹介、意見交換を行った。

本シンポジウムの内容は次のとおりである。

#### 〔1日目〕

##### 講演 I G B Pについて

##### 第1領域～大気微量成分の変動と生物圏

- (1) 地球大気化学国際協同研究計画 (IGAC)
- (2) IGACの東アジアにおける展開 (APARE)

##### 第2領域～海洋における炭素循環

- (3) 海洋における炭素循環

##### 第3領域～地球変化に係わる生態系及び水循環

- (4) 炭酸ガス変動が炭素循環に及ぼす影響
- (5) 水循環と生態系 (B A H C)

##### 第4領域～地球圏～生物圏の相互作用を考慮したモデリング

- (6) 気候モデルおよび大気化学モデル
- (7) 局地気候・環境モデリングの立場から
- (8) 生態系モデリングの立場から

##### 第5領域～IGBPにおける地球観測衛星の整合性と問題点

- (9) 気象衛星データの現状と将来
- (10) 地球観測衛星データの現状と将来
- (11) NASA EOSとASTER

##### 第6領域～古環境変化の原因と応答

- (12) PAGESについて
- (13) 南極氷床ドーム深層掘削観測計画
- (14) 温暖化と沿岸環境

##### 第7領域～農林水産活動の地球環境への影響

- (15) 農業生態系に関する地球環境研究－メタンと温暖化－
- (16) 森林・林業に関する地球環境研究－炭素収支と温暖化の抑制－

#### 〔2日目〕

##### 特別講演～ナショナルプロジェクト紹介～

オーストラリア、中国、フィリピン、タイ及び日本  
領域別個別討議

##### 第1領域から第7領域まで

##### 各領域からの報告

##### 総合討論

当日は2日にわたるシンポジウムであったが300人を超える参加者があり、盛況のうちに終了した。

本シンポジウムの成果は、報告書として取りまとめ、今後の研究の参考資料として関係機関・研究者等に配布することとしている。

なお、平成4年度にも引き続き本シンポジウムを開催する予定である。

## 二国間学術交流事業

日本学術会議では、二国間学術交流事業として毎年代表団を海外に派遣し、訪問国の科学者等と学術上の諸問題について意見交換を行って、相互理解の促進を図る事業を行っている。

この事業は、昭和58年度から実施されており、これまでにアメリカ合衆国、連合王国、オーストラリア、中華人民共和国等19か国に代表団を派遣してきた。

平成3年度は、11月4日から14日までの11日間の日程で、ベルギー王国及びオーストリア共和国へ、川田侃副会長を団長とする計10名（うち随行事務官2名）から成る代表団を派遣した。

ベルギー王国では、科学技術担当省、科学、文学及び芸術に関する王立アカデミー、ブリュッセル自由大学、EC本部教育関係機関、EC本部環境総局などを、また、オーストリア共和国では、科学省、オーストリア科学アカデミー、ウィーン大学、ドナウ河畔の国連都市にある国際原子力機関 (IAEA)、国連工業開発機関 (UNIDO)などを訪問した。

各訪問先では、関係者との間で、それぞれの国の学術研究体制や科学技術政策などをめぐって活発な意見交換が行われた。

特に印象的だったものとして、まずベルギー王国では、ECが推進しているERASMUS計画、これは EC Action Scheme for the Mobility of University Studentsの略で、EC12か国の大学生を域内各国へ相互留学させて、専門課目や語学の能力向上あるいは風俗習慣の理解をはかるうとするもので、ECの将来に大きく貢献するものと思われる。また、ベルギー王国は、長い歴史の流れの中で、フランス語とオランダ語の2か国語が話されてきたため、この言語間の対立が、政治・経済の発展はもとより、学問の分野にも非常に複雑な影響を与えていたことであった。今回訪問した科学、文学及び芸術に関する王立アカデミーやブリュッセル自由大学もまったく同名のアカデミーと大学がフランス語系(ワロン系)とオランダ語系(フラン系)とに分かれています。我々の代表団も、団編成を2班に分けてこれらの機関を訪問することになったことは、非常に印象的であった。

オーストリア共和国では、650年の伝統をほこるウィーン大学やオーストリア科学アカデミーの建物の重厚さに目を見はり、またドナウ河畔に作られた国連都市にIAEAとUNIDOの2つの国連機関を訪問した際には、IAEAのチャルノブイリ原発事故以後の核問題への積極的な取り組みやUNIDOの開発途上諸国における工業発展に対する貢献度の大きさに団員一同大いに感激するとともに、D. L. Siason Jr. UNIDO事務局長の流暢な日本語には、だれもがびっくりさせられた。

近年、学術、特に基礎研究における我が国の国際貢献の重要さがウェイトを増す中で、この種の学術交流事業は益々強化されるべきものであることを、派遣代表団員全員が強く認識させられた今回の渡欧であった。

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9巻第1号をお届けします。

今回は、原著論文4編と第33回大会の要旨を掲載いたしました。原著論文の方は基礎的なものが2編、応用的なものが2編であります。また、第33回大会の演題は56題の多きにのぼり、内容も多方面に渡っておりますので是非ご一読下さいますよう。また、最近では顕微受精に関する話題が新聞紙上で取り上げられており、一般の人々にも関心が持たれています。

なお、現在9巻2号の掲載論文を受付ておりますのでご投稿下さいますよう。

(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9巻 第1号

Vol. 9

NO. 1

平成4年3月25日 印刷

(会員頒布)

平成4年4月1日 発行

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 プハローケン®  
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 キナントール®

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



製造元 三共ゾーキ株式会社  
東京都品川区広町1-4-4

動物用医薬品 V.A·D·E 配合  
胎盤性性腺刺激ホルモン

油性動物用 プハローケン®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

健保適用

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

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



## 【効能・効果】

間脳性（視床下部性）無月経、下垂体性無月経の排卵誘発

## 【用法・用量】

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

## 【包装】

パーゴナル注 75：10管  
パーゴナル注150：10管

## 【使用上の注意】

1. 一般的注意
  - 1) 本療法の対象は不妊症患者のうちの、間脳又は下垂体前葉の機能・器質的障害に由来する性腺刺激ホルモン低分泌無月経患者であるので次の点に注意すること。
    - ア. エストロゲン・プロゲステロンテストで初めて反応する第2度無月経又は抗エストロゲン療法（クエン酸クロミフェン、シクロフェニル等）が奏効しない第1度無月経の患者に投与すること。
    - イ. 患者の状態（例えばエストロゲン・性腺刺激ホルモン・ブレグナジオール分泌、頸管粘液、基礎体温等）を詳細に検査し、子宮性無月経の患者には投与しないこと。
    - ウ. 原発性卵巣不全による尿中性腺刺激ホルモン分泌の高い患者、副腎・甲状腺機能の異常による無月経患者、頭蓋内に病変（下垂体腫瘍等）を有する患者、及び無排卵症以外の不妊患者には投与しないこと。
  - 2) 本療法の卵巣過剰刺激による副作用を避けるため、投与前及び治療期間中は毎日内診を行い、特に次の点に留意し、異常が認められた場合には、直ちに投与を中止すること。
    - ア. 患者の自覚症状（特に下腹部痛）の有無
    - イ. 卵巣腫大の有無
    - ウ. 基礎体温の異常上昇の有無（毎日測定させること）。
    - エ. 頸管粘液量とその性状
  - 3) 卵巣過剰刺激の結果としての多胎妊娠の可能性があるので、その旨をあらかじめ患者に説明すること。
  - 4) 妊娠初期の不注意な投与を避けるため、投与前少なくとも1ヵ月間は基礎体温を記録させること。
  - 5) 産婦人科・内分泌専門医師の管理のもとに投与すること。
  2. 次の場合には投与しないこと
    - 1) 卵巣腫瘍及び多くのう胞性卵巣症候群を原因とする卵巣の腫大を有する患者
    - 2) 妊婦
    - 3) 次の患者には投与しないことを原則とするが、やむを得ず投与する場合には、慎重に投与すること。
      - 1) 児を望まない第2度無月経患者
      - 2) 多のう胞性卵巣を有する患者
  4. 副作用
    - 1) 卵巣過剰刺激 卵巣腫大、下腹部緊迫感、腹水・胸水を伴ういわゆる、Meigs様症候群等があらわれた場合には、直ちに投与を中止するなど、適切な処置を行うこと。
    - 2) その他 ときに恶心、頻尿、しづれ感、頭痛、浮腫があらわれることがある。また尿量が増加することがある。
  5. 相互作用 胎盤性性腺刺激ホルモンとの併用により、卵巣の過剰刺激による卵巣腫大、腹水・胸水を伴ういわゆるMeigs様症候群があらわれることがある。



帝国臓器製薬株式会社

東京都港区赤坂二丁目5番1号

# 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

- 目で見て判定ができるので、酪農・臨床現場で便利です。
- 操作が簡単で、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 サイエンス社  
Cambridge Veterinary Sciences  
a division of Cambridge Life Sciences plc

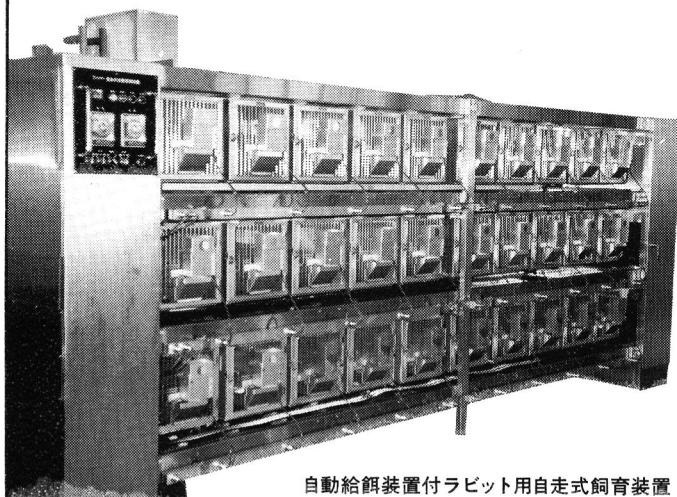
家畜が妊娠しているかどうかを推測する上で、血中プロゲステロン濃度の測定は有力な手段です。この測定にはRIA法などいろいろな方法がありますが、操作の煩雑さ、所要時間、特殊な施設などそれぞれに問題点がありました。

これに対して「オブチェックカウサイド・W」は、牛乳中のプロゲステロン濃度を簡単な固相法EIA(酵素免疫法)によって約10分間で直接判定する画期的なキットです。

輸入発売元 **テクノ力製薬株式会社**  
神奈川県川崎市川崎区中瀬3丁目19番11号 TEL210

## 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。

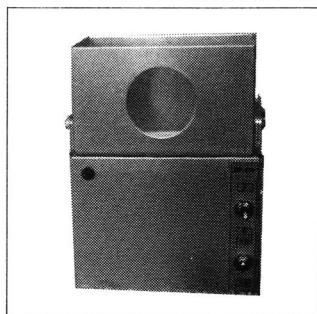


自動給餌装置付ラビット用自走式飼育装置

MRF-O3 ラット・マウス用・DF-O1 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-O1 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 TEL104 東京都中央区八丁堀4丁目4-3号  
電話 東京 03 (3552) 4561番

