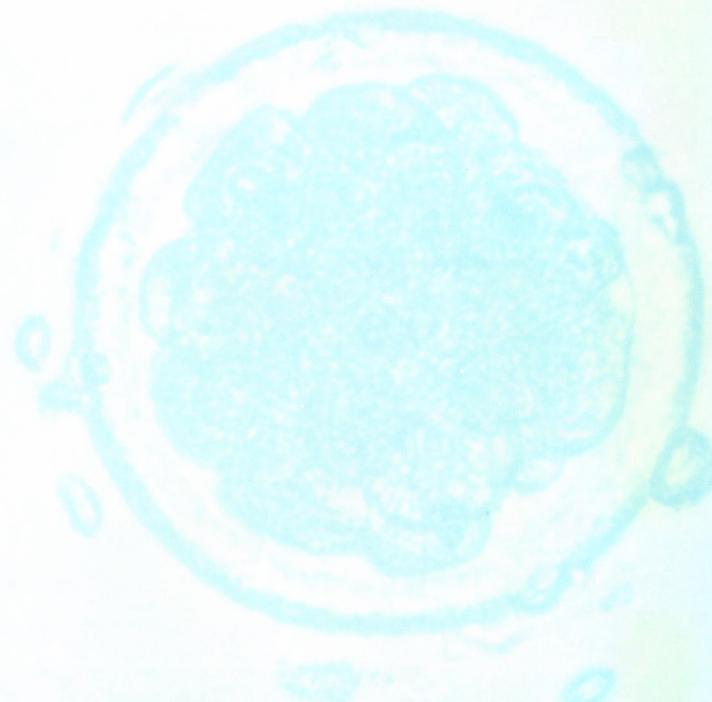


ISSN 0916-7625

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

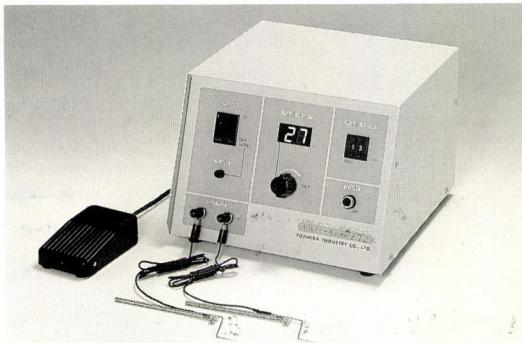
Japanese Society of  
Mammalian Ova Research

Vol. 9 No. 2

October 1992

胚細胞融合装置

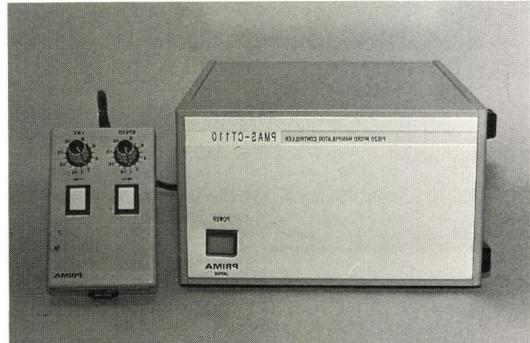
## セルハーモニー ET2



低電圧パルスで確実に融合。  
融合確率は80%以上です。

製品番号：FA3400 尺寸 法：232×240×73mm  
電 源：AC100V 重 量：約6kg  
DCパルス：3~50V, 10~300μsec

## PMM100シリーズ ピエゾマイクロマニピュレーター



マイクロマニピュレーション技術をより簡単、確実に  
にするため圧電素子を利用した駆動装置です。

システム：PMM110, PMM120, PMM110M,  
PMM120M  
移動分解能：約0.1μm～  
寸 法：240×320×143mm

# 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

## 第34回 哺乳動物卵子学会開催のご案内

第34回哺乳動物卵子学会および総会は下記の通り開催されますので、多数御参加下さいますよう御案内申し上げます。

第34回哺乳動物卵子学会  
大会長 石田 一夫

記

1. 期日 1993年4月22日（木）、23日（金）

2. 会場 ホテル新潟 2F芙蓉  
新潟市万代5-11-20  
☎ 025-245-3331

3. 講演申込要領

（1）締切期日：1993年1月16日（土）必着

（2）講演申込：講演の申込は、葉書に演題名（和文および英文）、発表者名および共同研究者名（ローマ字）を記入のうえ、お送り下さい。折返し発表内容を記載する原稿用紙をお送り致します。なお、講演原稿は2ページにおまとめ頂きます。講演原稿の締切りは1993年2月13日（土）必着とさせて頂きます。  
講演申込の葉書と講演原稿は、（3）の送付先宛お送り下さい。  
講演原稿はオフセット印刷し、哺乳動物卵子学会誌10巻1号に講演要旨集として掲載致します。

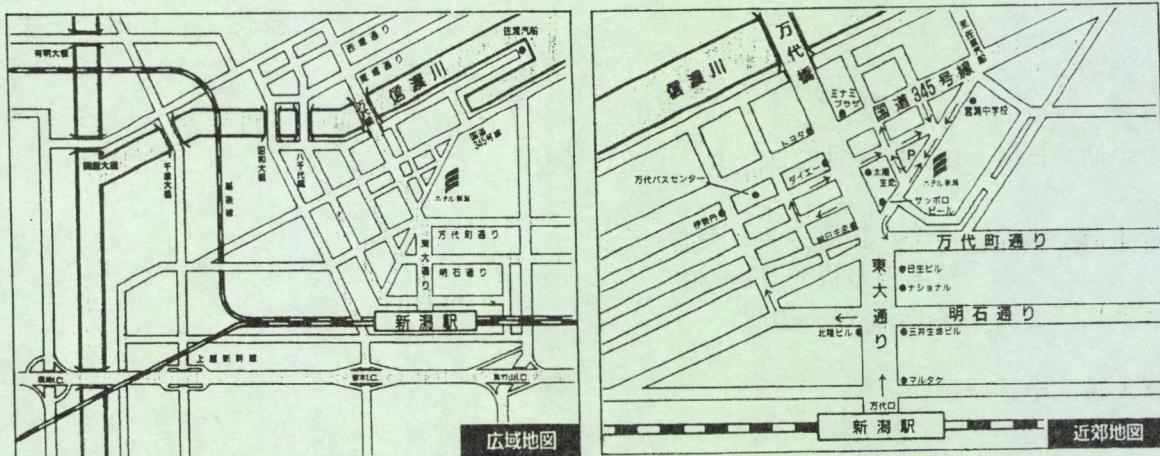
（3）送付先：

〒252 神奈川県藤沢市亀井野1866  
日本大学農獣医学部獣医生理学教室  
遠藤 克 宛  
☎ 0466-81-6241 内線332

#### 4. 会場・宿泊施設関係

宿泊施設の斡旋は特に行いませんが、学会参加者のためにホテル新潟に割安料金（税・サービス料込みで、シングル 9,687円、ツイン 18,350円）で宿泊できるように依頼しておりますので、希望者は各自で「哺乳動物卵子学会出席のため」と申し添えて、電話で早目にお申込下さい。

なお会場は、JR新潟駅から徒歩8分、北陸自動車道黒崎料金所から車で20分のところにあります。



#### 5. 役員会

理事会 4月22日（木）11:30～12:30 ホテル新潟 3F阿賀

評議員会 4月23日（金）12:00～13:00 ホテル新潟 3F阿賀

#### 6. 総会

4月23日（金）13:00～13:30 ホテル新潟 2F芙蓉

#### 7. 懇親会

4月22日（木）18:00～20:00 ホテル新潟 2F芙蓉

#### 8. 大会事務局

〒950-21 新潟市五十嵐二の町8050

新潟大学農学部家畜生産学教室内

第34回哺乳動物卵子学会大会事務局

大会幹事 新村 末雄

電話 025-262-6668

# 哺乳動物卵子学会誌

第9巻 第2号

平成4年10月

## 目 次

### 原 著

黄体期における牛卵巢の黄体形状および共存卵胞の内分泌学的、  
形態学的観察

高木光博、月原 隆、西片芳江、鈴木達行 ..... 145

牛における分娩後の経過日数と1卵採取

山本政生、藤井千春、大江正人、鈴木達行 ..... 156

無血清培地におけるウシ体外成熟・体外受精卵のウシ卵管上皮細胞  
との共培養（英文）

長尾慶和、佐伯和弘、星 雅樹、清家 昇、貝沼平敏 ..... 162

ツニカマイシン添加培養液で発生したマウス胚の割球接合に関する  
研究（英文）

四谷伊公子、新村末雄、石田一夫 ..... 169

スーパーオキサイドジスマターゼまたはエチレンジアミン四酢酸を  
添加された培地内でのマウス初期胚発生における系統差について  
(英文) 豊田 裕、東 貞宏、板垣 佳明、武田 聖 ..... 180

### 短報

剥皮期ミンク卵巢から回収した卵母細胞の体外成熟

亀山祐一、竹田秀一、石島芳郎 ..... 191

# Journal of Mammalian Ova Research

Vol. 9 No. 2

October 1992

## Contents

### Originals

Endocrinological observation and morphology of the corpus luteum  
and large follicles of bovin ovaries in early diestrus

TAKAGI,M.,T.TUKIHARA,Y.NISIKATA&T.SUZUKI ..... 145

Single flushing upon the passing of dates after  
delivery in cattle.

YAMAMOTO,M.,C.FUJII,M.OOE&T.SUZUKI ..... 156

Development of bovine in vitro matured and fertilized oocytes  
Co-cultured with oviductal epithelial tissue in serum-free  
medium.

NAGAO,Y.,K.SAEKI,M.HOSHI,N.SEIKE&H.KAINUMA ..... 162

Morphological studies on junctional complexes in compacted  
mouse embryos developed in a tunicamycin-containing medium.

YOTUTANI,I.,S.NIIMURA & K.ISHIDA ..... 169

Strain difference in the development of preimplantation mouse  
embryos in a medium supplemented with superoxide dismutase or  
ethylenediamine tetraacetic acid

TOYODA,Y.,AZUMA,S.,ITAGAKI,Y.&TAKEDA,S..... 180

Research Note

*in vitro* maturation of mink oocytes obtained from ovaries at  
pelting time.

KAMEYAMA,Y.,H.TAKEDA&Y.ISHIJIMA ..... 191

## 黄体期における牛卵巣の黄体形状および 共存卵胞の内分泌学的、形態学的観察

高木光博<sup>1)</sup> 月原 隆<sup>2)</sup> 西片芳恵<sup>2)</sup> 鈴木達行<sup>1)</sup>

山口大学大学院連合獣医学研究科<sup>1)</sup>

山口大学農学部獣医学科<sup>2)</sup>

Endocrinological observation and morphology of the corpus luteum and large  
follicles of bovine ovaries in early diestrus

Mitsuhiro Takagi<sup>1)</sup> Takashi Tsukihara<sup>2)</sup> Yoshie Nishikata<sup>2)</sup> and Tatsuyuki Suzuki<sup>1)</sup>

United Graduate School of Veterinary Science, Yamaguchi University,  
Yamaguchi 753<sup>1)</sup>

Department of Veterinary Science, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University,  
Yamaguchi 753<sup>2)</sup>

**Abstract:** One hundred fourty nine bovine ovaries were obtained on day 5-9 after estrous at local slaughterhouse. The significant high level appearance of corpora lutea of 21-25 mm size in diameter and coexisting follicles of 11-15 mm size in diameter was recorded. The relationship between the form of oocyte obtained by aspiration and corpora lutea whose diameter being 16-30 mm was examined and it was demonstrated that about 60% of aspiratory oocytes proved to be degenerated.

As for the concentration of Progesteron ( $P_4$ ) and Estradiol  $17\beta$  ( $E_2$ ) of 23 follicle fluid samples of coexisting follicles, 16 coexisting follicles (69.6%) were found to be  $P_4$ -dominated follicles. In the morphological observations of granulosa cells of 23 follicular walls, 7 were deficient in granulosa cells, and as for the other 16 follicular walls, 15 were found to be atretic or in the way of luteinization.

The observation of granulosa cell by TEM, revealed the appearance of many fat drops

in the cytoplasm of coexisting follicles, suggesting the initiation of luteinization process.

From the results, when embryo transfer or flushing of in vivo bovine embryo will be performed at day 7 of the estrous cycle, the follicles coexisting with functional corpus luteum, whose diameter being larger than 10 mm, were dominated by P<sub>4</sub>, and they become to be atretic or luterizing follicles. It suggests that the coexisting follicles do not effect on the conception or development of the embryos.

Key word: Lutenizing phase, Coexisting follicle, Granulosa cell, Follicle fluid

(受付: 1992年1月8日、受理 1992年9月25日)

### 緒 言

過排卵処置牛の卵巢には、人工授精後7日目に形成される黄体と共に、直径 $10 \pm 3$  mmの卵胞が共存する場合が多い。Okudaら<sup>16)</sup>は、と場材料で黄体期に認められる直径10 mm以上の卵胞の出現率を調べた結果、黄体形成期で80.4%、開花期で93.7%であり、このような卵胞は生理的に常に存在するものであると述べている。また、郭ら<sup>5)</sup>は、過排卵処置牛において、人工授精後7日目の胚回収時に黄体と共に存する卵胞が、胚に与える影響を調べた。その結果、卵胞の存在しない供胚牛と存在する供胚牛とでは、移植可能胚がそれぞれ、 $5.7 \pm 4.18$  個、 $5.5 \pm 4.69$  個であり、両者に有意差がみられなかったと述べている。また、Callesenら<sup>3)</sup>は、末梢血中のProgesteron（以下P<sub>4</sub>と略す）変化が過排卵処置7日目における胚の回収率と卵質に相関のあることを示唆している。

そこで、本研究では受胚牛や供胚牛において、性周期の7日目前後の卵巢に存在する機能性の黄体と共に存する卵胞が、胚の受胎性あるいは発生にどのように関与しているかを明確にするため、性周期の5—9日目にと殺された牛卵巢について、末梢血中のP<sub>4</sub>濃度を反映する黄体の形状と、共存する卵胞の形状、卵胞液中に存在する卵子の形態学的観察、卵胞液中のP<sub>4</sub>、E<sub>2</sub>濃度の測定ならびに卵胞壁の組織学的観察から詳細な検討を加えた。

## 材料と方法

広島市食肉センターにおいて、生殖器に肉眼的異常の認められないホルスタイン種雌牛112頭から卵巢を採取した。卵巢は解体後速やかに取り出し、氷温下にて研究室まで搬入した。その後、Okudaら<sup>16)</sup>の方法に従い、直ちに直径10 mm以上の機能性黄体と直径5 mm以上の卵胞が共存する卵巢を選別し、黄体と卵胞の直径をノギスを用いて測定すると共に、超音波診断装置(リニア型、5MH、スーパーアイ、富士平工業(株))を用いて、氷温下のウォーターパス中で黄体と卵胞の存在およびそれらの直径を詳細に確認した<sup>18)</sup>。

### 卵胞液、卵子の吸引

卵胞液は18G針つき注射筒により吸引し、直ちにプラスチックシャーレに移して、実体顕微鏡下で卵子と卵丘細胞の形態を観察した<sup>8,12,13)</sup>。卵子のうち核や細胞質が変性し、退行過程にあるものを変性卵とした<sup>8)</sup>。卵胞液は採卵後P<sub>4</sub>、E<sub>2</sub>濃度の測定まで-30℃にて凍結保存した。

### 卵胞液中のP<sub>4</sub>およびE<sub>2</sub>濃度の測定

共存卵胞のうち23例について、卵胞液中のP<sub>4</sub>とE<sub>2</sub>濃度をRIA法により測定した。得られた結果より、同一卵胞のP<sub>4</sub>/E<sub>2</sub>値を求め、その値が1よりも大きいものをP<sub>4</sub>dominant follicle(以下P<sub>4</sub>DF)、1よりも小さいものをE<sub>2</sub>dominant follicle(以下E<sub>2</sub>DF)とした<sup>4,9,10)</sup>。

### 組織標本作製と光学顕微鏡的観察

共存卵胞のうち23例について、その卵胞壁を光学顕微鏡にて組織学的に観察した。併せて囊腫卵胞(直径25 mm以上)5例、小卵胞(直径3-5 mm)5例についても同様に観察し比較検討した。

標本の作製法は、カミソリで卵胞のApexの部分を切り出し、常法に従ってブアン液またはホルマリン液で固定後パラフィンで包埋した。染色はマイヤーのヘマトキシリントン、エオジン(HE)染色を行い光学顕微鏡にて観察した。

卵胞壁は顆粒層細胞の形態から、核濃縮およびCell debrisを有するものを閉鎖卵胞とし、それ以外を成熟卵胞とした<sup>1,6,8,9,12-14)</sup>。また、顆粒層細胞の層数を数え、マイクロメーターを用いて顆粒層細胞、卵胞膜内層の厚さを計測した。計測は無作為に3カ所で行い、その平均値を計測値とした。さらに、顆粒層細胞の細胞密度(100 μm<sup>2</sup>の範囲における核の総数)をカウントした<sup>1,6,12)</sup>。

### 電子顕微鏡的観察

共存卵胞のうち5例およびその対照として囊腫卵胞3例、小卵胞3例について、卵胞の Apex の部分の顆粒層細胞を、常法に従い透過型電子顕微鏡（以下TEM）にて観察し、その形態を比較検討した<sup>11</sup>,<sup>17</sup>。

### 統計処理

得られた結果は、平均値±標準誤差で示し、Student の t 検定を行い5%の有意差を求めた。

## 結 果

黄体と卵胞の共存する卵巢は149個であった。黄体の直径は11–15 mm, 16–20 mm, 21–25 mm, 26–30 mm, 31–35 mm の各割合がそれぞれ 6/149(4.0%), 46/149(30.9%), 77/149(51.7%), 19/149(12.7%), 1/149 (0.7%) となり、21–25 mm の占める割合が有意に( $P < 0.05$ )高かった。

また、共存卵胞の直径は、6–10 mm, 11–15 mm, 16–20 mm, 21–25 mm の各割合がそれぞれ 34/149(22.8%), 70/149(47.0%), 38/149(25.5%), 7/149(4.7%) となり、直径 11–15 mm のものが約半数を占め有意に( $P < 0.05$ )高かった。

直径10 mm 以上の卵胞が共存するものとそうでないものとでは、それぞれ 115/149(77.2%), 34/149 (22.8%) となり共存するものが有意に( $P < 0.05$ )高率であった。卵胞の吸引による卵子の回収率は149個のうち53個(35.6%)であった。

卵胞の大きさ別の卵子回収率は、6–10 mm, 11–15 mm, 16–20 mm, 21–25 mm でそれぞれ 15/34(44.1%), 25/70(35.7%), 11/38(28.9%), 2/7(28.6%) となり 6–10 mm の範囲のものが高い回収率を示した (Table 1)。

また、吸引卵子の形態と黄体の大きさとの関係では、変性した卵子が全体の約70%を占め、黄体の直径が16–25 mm では、卵子の変性していたものが54.7%(29/53) の割合であった (Table 2)。

### 卵胞液中のP<sub>4</sub>、E<sub>2</sub>濃度

P<sub>4</sub>、E<sub>2</sub>濃度測定を行った23例において P<sub>4</sub>DF、E<sub>2</sub>DF はそれぞれ 16/23(69.6%), 7/23(30.4%) であり、P<sub>4</sub>DF が有意に( $P < 0.05$ )多かった (Table 3)。

P<sub>4</sub>DF 16例の P<sub>4</sub>、E<sub>2</sub> 平均濃度はそれぞれ  $172.9 \pm 34.3 \text{ ng/ml}$ ,  $14.4 \pm 4.5 \text{ ng/ml}$ , E<sub>2</sub>DF 7例の P<sub>4</sub>、E<sub>2</sub> 平均濃度はそれぞれ  $47.2 \pm 11.2 \text{ ng/ml}$ ,  $109.4 \pm 25.7 \text{ ng/ml}$  であり、P<sub>4</sub>濃度では P<sub>4</sub>DF が、E<sub>2</sub>濃度では E<sub>2</sub>DF がそれぞれ有意に高い濃度を示した (Table 4)。P<sub>4</sub>DFにおける P<sub>4</sub>/E<sub>2</sub> 値は 12 で、E<sub>2</sub>

Table 1. Diameter of CL and follicles, and presence of oocytes

CL Diameter (mm)	Follicular diameter (mm)				Total
	6-10	11-15	16-20	21-25	
11-15	2	3	1	0	6 (4.0%)
16-20	12	24	9	1	46 (30.9%)
21-25	18	35	21	3	77 (51.7%)
26-30	2	8	7	2	19 (12.7%)
31-35	0	0	0	1	1 (0.7%)
Total	34 (22.8%)	70 (47.0%)	38 (25.5%)	7 (4.7%)	149
Presence of oocyte	15 (44.1%)	25 (35.7%)	11 (28.9%)	2 (28.6%)	53 (35.6%)

CL: corpus luteum

Table 2. Morphology of oocyte-cumulus complexes in relation to CL size

	(mm)				Total
	11-15	16-20	21-25	26-30	
Degenerated					
Denuded	2	2	3	3	10 (18.9%)
Complete	3	12	12	1	28 (52.8%)
Healthy					
Denuded	1	1	0	0	2 (3.7%)
Complete	0	5	6	2	13 (24.6%)
Total	6 (11.3%)	20 (37.8%)	21 (39.6%)	6 (11.3%)	53

CL : corpus luteum

Degenerated: Oocytes which contained degenerated nuclei and cytoplasm, and were observed to be undergoing atresia.

Healthy : Not degenerated.

Table 3. Relationship between P<sub>4</sub> and E<sub>2</sub> concentration in follicular fluid

P <sub>4</sub> dominant	16/23 (69.6%)
E <sub>2</sub> dominant	7/23 (30.4%)

P<sub>4</sub> dominant: Follicles that have higher concentrations of P<sub>4</sub> than E<sub>2</sub> (P<sub>4</sub>/E<sub>2</sub>>1)E<sub>2</sub> dominant: Follicles that have higher concentrations of E<sub>2</sub> than P<sub>4</sub> (P<sub>4</sub>/E<sub>2</sub><1)Table 4. Mean P<sub>4</sub> and E<sub>2</sub> levels in P<sub>4</sub> and E<sub>2</sub> dominating follicles

	n	P <sub>4</sub>	E <sub>2</sub>
P dominant	16	172.9 ± 34.3	14.4 ± 4.5
E dominant	7	47.2 ± 11.2	109.4 ± 25.7

Mean ± SEM (ng/ml)

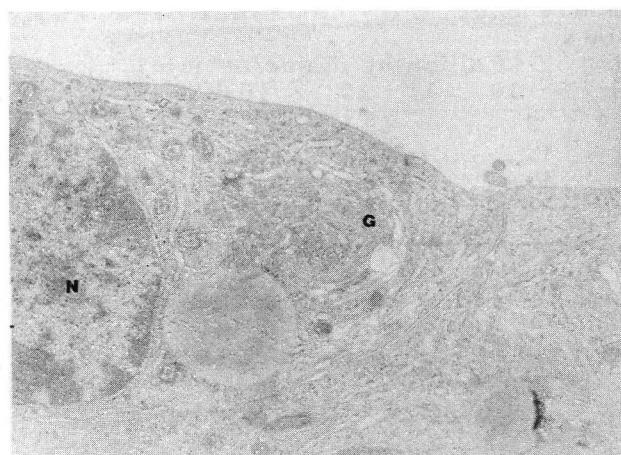


Fig. 1. Granulosa cells from a small follicular wall. There is considerable rER and a well developed Golgi apparatus. N: cell nucleus, G: Golgi complex (9000x)

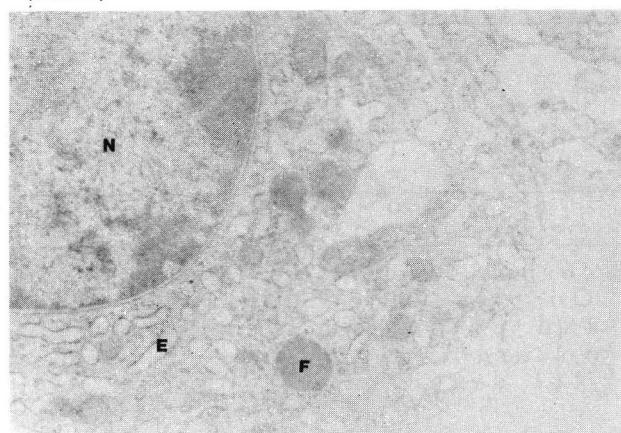


Fig. 2. Granulosa cells from a cystic follicular wall. Cells are tending to round and rER dilates and exists as large vesicles. Many fat drops are seen in the cytoplasm. N: cell nucleus, F: fat drop, E: round endoplasmic reticulum (9000x)

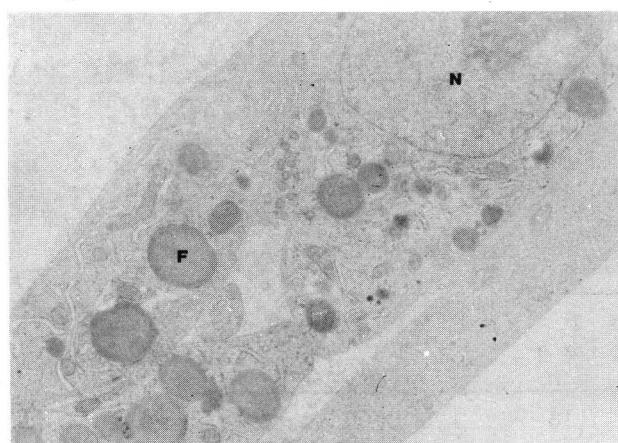


Fig. 3. Granulosa cell from coexisting follicular wall. There are many fat drops in the cytoplasm. N: cell nucleus, F: fat drop (6000x)

DFにおける $P_4/E_2$ 値は 0.4であった。

### 組織学的所見

149例のうち、組織学的観察を行った23例における卵子の回収率は 5/23 (21.7%) であった。また、回収された卵子の形態は、卵丘細胞に囲まれて変性しているものが4例、裸化で変性しているものが1例であった。

23例の卵胞壁のうち、顆粒層細胞の存在するものとしないものは、それぞれ 7/23(30.4%), 16/23 (69.6%) であった。また、顆粒層細胞の存在する16例のうち、成熟段階の卵胞は1例のみであり、他15例は閉鎖あるいは黄体化過程の初期のものから、かなり進んだものなど様々であった。囊腫卵胞5例では、顆粒層細胞が全例で消失していた。小卵胞5例においては、基底膜に沿った部分で、成熟過程に見られる橢円形核の顆粒層細胞や有糸分裂像も見られたが、Cell debris も観察された。

顆粒層細胞の厚さの平均値±標準誤差は、閉鎖過程15例、成熟過程1例、小卵胞5例においてそれぞれ、 $52.0 \pm 7.0 \mu\text{m}$ ,  $80.0 \mu\text{m}$ ,  $72.0 \pm 10.2 \mu\text{m}$ 、顆粒層細胞の層数では閉鎖過程15例、成熟過程1例、小卵胞5例においてそれぞれ  $4.1 \pm 0.4$ ,  $7.0$ ,  $7.6 \pm 2.1$ 、卵胞膜内層の厚さは、閉鎖過程22例、成熟過程1例、囊腫卵胞5例、小卵胞5例においてそれぞれ、 $96.0 \pm 15.4 \mu\text{m}$ ,  $125.0 \mu\text{m}$ ,  $151.7 \pm 34.4 \mu\text{m}$ ,  $117.0 \pm 24.0 \mu\text{m}$ 、 $100 \mu\text{m}$ あたりの顆粒層細胞の総数は、閉鎖卵胞15例、成熟卵胞1例、小卵胞5例においてそれぞれ、 $44.8 \pm 6.3$ ,  $36.0$ ,  $43.2 \pm 6.0$  となり、すべてにおいて有意差は認められなかった。

### 顆粒層細胞のTEM所見

直径3–6 mm の小卵胞においては、粗面小胞体が非常に多く見られ、またゴルジ装置が発達している像が観察された (Fig 1)。

囊腫卵胞においては、細胞がばらばらになり、円形化する傾向が見られ、また粗面小胞体が膨らんで、大きい空胞として存在するものが観察された。また脂肪滴も多く見られた (Fig 2)。

黄体と共に存する卵胞では、退行途中の細胞が多く見られ、また脂肪滴の多くなっている細胞も観察された (Fig 3)。

### 考 察

Mattonら<sup>15)</sup>は、未経産牛における卵巢の経時的観察により、性周期の3日目から少なくとも8日目、

おそらく13日目まで直径10 mm 大以上の卵胞が存在する過程で、新しい卵胞が性周期の8日目-13日目に発育すると述べている。またIrelandら<sup>9</sup>は、組織学的、内分泌学的観察により、性周期の7-13日目に存在する直径10 mm 大以上の大卵胞は、7日目より退行し、新しい卵胞が発育してくると述べている。さらに、Siroisら<sup>19</sup>は、超音波診断装置を用いて1性周期の卵巣を観察した結果、直径5 mm 大以上の卵胞の発育は、一般的に、3つの波(wave) から成り、その始まりは性周期の 2日目、9日目、16日目であったと報告している。

本実験における卵巣149個の形態学的観察では、黄体期(性周期の5-9日目)にある機能性の黄体は直径21-25 mm、これと共存する卵胞は直径11-15 mm のものが有意に多かった。これは、先に述べたMattonら<sup>15</sup>、Irelandら<sup>9</sup>、Siroisら<sup>19</sup>の性周期における卵胞の発育に関する報告に準じるものであった。つまり、性周期のおよそ 3-13日目(発情日=0日)においては、直径10 mm 大以上の卵胞がごく自然な状態で共存することが再確認された。

共存卵胞液の1回吸引による卵子の回収率は、35.6%(53/149) と低かった。しかし、黄体の大きさと吸引卵子の形態との関係においては、直径16-30 mm の充実した黄体に共存する卵胞内卵子の約60% が、裸化あるいは卵丘細胞に囲まれて変性していたことから、共存卵胞はかなりの割合で閉鎖過程にあることがうかがわれた。

卵胞液中のP<sub>4</sub>、E<sub>2</sub>濃度の測定結果から、Irelandら<sup>9,10</sup>、De loosら<sup>13</sup>の方法に従い、検討した結果、これは共存卵胞の約70% が閉鎖あるいは黄体化過程にあるということを示唆している。

卵胞の組織学的観察においてDe loosら<sup>13</sup>は、発育ステージの指標として顆粒層細胞を選択している。その理由として、卵胞膜内における変化よりもかなり劇的であるということを挙げている。本研究においても、卵胞壁のうち顆粒層細胞を観察し、Irelandら<sup>9,10</sup>、Brawら<sup>2</sup>の報告に従って核濃縮像の存在や Cell debris の有無、その他顆粒層の基底膜配列などを検討し、成熟あるいは閉鎖卵胞とに区分した。観察の結果、顆粒層細胞が存在した16例のうち成熟過程の卵胞は1例のみで、他の15例は閉鎖過程であった。また、組織学的観察を行った共存卵胞23例からの卵子の回収において、回収できたものはすべて顆粒層細胞の存在しない卵胞からであった。Marion<sup>14</sup>ら、Hinrichs<sup>8</sup>らは退行中の卵丘細胞は、部分的に卵胞壁から離れやすくなっているために、卵子を吸引しやすくなっているのではないかと述べている。これは本研究において、顆粒層細胞の存在しなかった7例についてはすべて初回で回収できること、卵子が回収できなかった例では300 IU/ml のHyaluronidase 加 PBS にて再吸引することにより、半数例以上から卵子が吸引できたことなどから支持される<sup>20</sup>。また、卵子の吸引できなかった例では、成熟過程に見られる橢円形核の顆粒層細胞が基底膜上に並んだ像と閉鎖過程に特徴のある核濃縮像や Cell debris とが混在する例が多く見られたことなどから、多くの例が

閉鎖過程の初期段階にあったのではないかと思われた。

Marionら<sup>14)</sup>は、卵胞壁の組織学的観察において、退行初期に現れる変化として 1) 卵胞に沿った顆粒層細胞の消失、脱落 2) 固有層の消失と顆粒層の基底膜配列の消失 3) 卵胞膜内層細胞の縮小、円形化などを挙げている。また、De loosら<sup>12)</sup>は卵胞壁成熟度の指標として 1) 細胞密度 2) 顆粒層の有糸分裂指数 3) 血管裂孔周囲における好酸性顆粒球の出現性などを用いている。また、顆粒層細胞の厚さおよび層数、卵胞膜内層の厚さなど、研究者によりさまざまな観察法が報告されている<sup>1,4,6)</sup>。しかし、本研究においては、顆粒層細胞の厚さおよび層数、卵胞膜内層の厚さ および 100 μmあたりの顆粒層細胞の数を観察した場合、共存卵胞の23例と対照の囊腫卵胞5例、小卵胞5例とのあいだには、ある程度の差は見られるものの有意差は認められなかった。このことは、卵胞壁を形態的に観察してその発育ステージを推定するには、卵子の発育ステージや卵胞液中のホルモン濃度などを加味して推定する必要のあることを示唆している。TEMによる観察でも、共存卵胞5例においては、小卵胞に比較して退行途中の細胞や、脂肪滴つまり黄体化の進んだ細胞が多くなっており、閉鎖あるいは黄体化を示唆する所見であった。

以上のことより、性周期7日前後の胚移植時、あるいは胚回収時において、機能性の黄体に共存する直径 10 mm 大の卵胞は、多くの場合 P<sub>4</sub>DF で、形態学的にも閉鎖あるいは黄体化の進んだ卵胞であり、胚の受胎性や発生に影響を与える可能性は少ないものであるということが明らかにされた。

#### 謝　　辞

本研究を遂行するにあたり有益な御助言をいただきました山口大学家畜解剖学教室 利部 聰 助手 および大上美穂氏に感謝いたします。

#### 文　　献

- 1) Al-dahash SYA and David JSE. (1977): Histological examination of ovaries and uterus from cows with cystic ovaries. *Vet. Rec.*, 101, 342-347.
- 2) Braw RH and Tsafriri A. (1980): Effect of PMSG on follicular atresia in the immature rat ovary. *J. Reprod. Fert.*, 59, 267-272.
- 3) Callesen H, Greve T and Hyttel P. (1988): Preovulatory evaluation of the superovulatory

- response in donor cattle. *Theriogenology.*, 30, 477-488.
- 4) Dielman SJ, Kruip THAM, Fontijne P, Jong WH and Weyden GC. (1983): Changes in oestradiol, progesterone and testosterone concentrations in follicular fluid and in the micro morphology of preovulatory bovine follicles relative to the peak of luteinizing hormone. *J. Endocr.*, 97, 31-42.
- 5) Gue Z and Kuo T. (1989): The practical aspect of study of using the technique of bovine embryo transfer in Xinjiang. *Anim. Res. of Xinj. Res. Ins. of Anim. Sci.*, (In Chinese)
- 6) Hay MF, Moor RM, Cran DG and Dott HM. (1979): Regeneration of atretic sheep ovarian follicles in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 55, 195-207.
- 7) Herrler A, Beckers JF, Donnay JV and Niemann H. (1988): Purified FSH supplemented with defined amounts of LH for superovulation in dairy cattle. *Theriogenology.*, 29, 260 (abstr).
- 8) Hinrichs K. (1991): The relationship of follicle atresia to follicle size, oocyte recovery rate on aspiration, and oocyte morphology in the mare. *Theriogenology.*, 36, 157-168.
- 9) Ireland JJ and Roche JF. (1983): Development of non ovulatory antral follicles in heifer: Changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins. *Endocrinology.*, 112, 150-156.
- 10) Ireland JJ and Roche JF. (1983): Growth and differentiation of large antral follicles after spontaneous luteolysis in heifers: Changes in concentration of hormones in follicular fluid and specific binding of gonadotropins of follicles. *J. Anim. Sci.*, 57, 157-167.
- 11) Kruip TAM, Cran DG, Van Beneden TM and Dieleman SJ. (1983): Structural changes in bovine oocytes during final maturation in vivo. *Gamete. Res.*, 8, 29-47.
- 12) Loos FAM, Bevers MM, Dieleman SJ and Kruip ThAM. (1991): Morphology of preovulatory bovine follicles as related to oocyte maturation. *Theriogenology.*, 35, 527-535.
- 13) Loos FAM, Bevers MM, Dieleman SJ and Kruip ThAM. (1991): Follicular and oocyte maturation in cows treated for superovulation. *Theriogenology.*, 35, 537-546.
- 14) Marion GB, Gier HT and Choudary JB. (1968): Micromorphology of the bovine

- ovarian follicular system. *J. Anim. Sci.*, 27, 451-465.
- 15) Matton P, Adelakoun V, Couture Y and Dufour JJ. (1981): Growth and replacement of the bovine ovarian follicles during the estrous cycle. *J. Anim. Sci.*, 52, 813-819.
- 16) Okuda K, Kito S, Sumi N and Sato K. (1988): A study of the central cavity in the bovine corpus luteum. *Vet. Rec.*, 123, 180-183.
- 17) O'Shea JD, Hay MF and Cran DG. (1978): Ultrastructural changes in the theca interna during follicular atresia in sheep. *J. Reprod. Fert.*, 54, 183-187.
- 18) Quirk SM, Hickey GJ and Fortune JE. (1986): Growth and regression of ovarian follicles during the follicular phase of the oestrous cycle in heifers under going spontaneous and PGF-2 $\alpha$  induced luteolysis. *J. Reprod. Fert.*, 77, 211-219.
- 19) Sirois J and Fortune JE. (1988): Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by realtime ultrasonography. *Biol. of Reprod.*, 39, 308-317.
- 20) Takeishi M, Takagi K, Tsumagari S, Moriki K and Namba S. (1990): Difference in servival rates of oocytes in follicular cysts between freely-grazing and feed lot Holstein daily cows. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 36, 31- 34.

## 牛における分娩後の経過日数と1卵採取

Single flushing upon the passing of dates after delivery in cattle.

山本政生、藤井千春<sup>1)</sup>大江正人<sup>2)</sup>鈴木達行

Masao YAMAMOTO, Chiharu FUJII<sup>1)</sup>, Masato OOE<sup>2)</sup>, Tatsuyuki SUZUKI

山口大学大学院連合獣医学研究科

United Graduate School of Veterinary Sciences, Yamaguchi University,

Yamaguchi 753

広島県経済連<sup>1)</sup>

Hiroshima Economic Agricultural Cooperation, Hiroshima 731

山口県酪農協<sup>2)</sup>

Yamaguchi Dairy Agricultural Cooperation, Shimonoseki 750

**abstract:** Collection of embryos from 47 cows, whose sexual cycle was confirmed to be normal, was made by perfusing their uterine horn beside of corpus luteum by such non-surgical methods as automatic perfusion technique, 7~8 days after artificial insemination during spontaneous estrus period. The percentage of success in collecting embryos and the collecting rate of transferable embryos was 77.6% (38/49), 61.2%(30/49) respectively.

The relationship among the period from the delivery to the collection of embryos the percentage of success in collecting embryos and the collecting rate of transferable embryos was also investigated according to the date on the 150th day after the delivery. Before the 150th day the percentage of success in collecting embryos and the collecting rate of transferable embryos were 100%(16/16) and 88%(14/16), while after the 150th day they became 67%(21/31) and 51%(16/31), respectively. These rate were significantly higher before the 150th day ( $p < 0.05$ ).

As the result of transferred 12 collecting embryos to 12 recipient Holstein cows, the high pregnancy rate 75%(9/12) was obtained.

**KEY WORDS:** cattle, delivery, single, flushing

(受付 1992年2月10日, 受理 1992年7月6日)

## 緒 言

牛の自然発情時に、通常の人工授精を行いその7-8日目に黄体側子宮角を還流して1卵を採取する方法は、牛がホルモン剤投与によるストレスを受けないこと、ホルモン剤投与により誘起される卵巣嚢腫や漏乳、乳量の減少<sup>1)</sup> 卵巣機能回復までに要する時間的、経済的損失<sup>2)</sup>を避けることができるなどの利点がある。これまで牛において自然発情を利用した一卵採取の報告<sup>1,3,4,6~9,12)</sup>は多くみられるが、分娩後の経過日数と胚の正常性との関連を追求した報告は見あたらない。そこで本研究では、自動還流法により一卵採取を試み、供卵牛の分娩後の経過日数と移植可能胚率との関連について追求し、併せて、回収胚の移植を試み、興味ある所見を得たので、これらの概要を述べる。

## 材料及び方法

正常な性周期を確認した牛47頭（黒毛和種；17頭、ホルスタイン種；30頭）について自然発情時に人工授精し、その7-8日目に黄体側子宮角を自動還流装置<sup>8)</sup>（ニッショ一製）を用いて還流した。還流液は、結晶ペニシリソG 100IU/mlおよび5%牛胎児血清加局方リンゲル液で子宮を還流後、75 μmのメッシュ付き回収シャーレ内<sup>11)</sup>に浸せきし、実体顕微鏡下で卵検索を行った。卵は、0.3%牛血清アルブミン加修正P B S 内に集め、Garyらの方法<sup>13)</sup>にしたがって胚のランクづけを行った。分娩後の発情発現による人工授精までの経過日数により、それぞれ40-99日（1区）、100-149日（2区）、150-210日（3区）及び220日以上（4区）の4群に分けて採卵し、その成績を比較検討した。回収胚の12個については、性周期を同期化した受卵牛（ホルスタイン種未経産）の12頭に非手術的に移植し、30日と60日目の2回にわたって超音波診断装置により妊娠鑑定を行った。

## 結 果

供卵牛の分娩から採卵までの経過日数と回収卵率との関係は、表1に示したように1区と2区で高く、それぞれ100%(8/8), 100%(8/8)となり、3区と4区のそれぞれ64.3%(9/14), 76.5%(13/17)に比べて有意に高い成績であった( P<0.05 )。同様に移植可能胚率は1区と2区でそれぞれ100%(8/8), 75%(6/8), 3区と4区でそれぞれ50%(7/14), 52.9%(9/17)となり、いずれも150日以前で高く、150日以後で低下する( P<0.05 )傾向がみられた。回収胚の12個を12頭に移植した実験では、75%(9/12)の高い受胎率が得られた（表2）。

## 考 察

F S HやP M S Gなどのホルモン剤による過剰排卵処理では、移植可能胚の回収成功率が全処理頭数の50-60%に過ぎず<sup>14,15)</sup>また牛によっては過剰排卵処理にまったく反応しないものが11%にみられ

TABLE 1. Relationship among the period after the delivery and collecting embryo.

regimen	1	2	total	3	4	total
<b>Days after</b>						
delivery	40-99	100-149	<150	160-210	220<	160<
No. Cows	8	8	16	14	17	31
No. Cows embryo	8	8	16	9	13	22
recovery						
Recovery rate(%)	100	100	100a	64.3	76.5	71b
<b>No. Cows obtained</b>						
Trans. embryo	8	6	14	7	9	16
<b>Rate of</b>						
trans. embryo(%)	100	75	87.5a	50	52.9	51.6b
<b>No. Cows obtained</b>						
non-fertilized ova	0	1	1	1	1	2
<b>No. Cows obtained</b>						
degenerate ova	0	1	1	1	3	4
<b>No. Cows not</b>						
obtained ova/embryo	0	0	0	5	4	9

a,b,; P&lt;0.05

る<sup>14)</sup>。1卵採取では、過剰排卵処理に対して無反応の牛であっても通常の人工授精が可能であることから、この手法を活用することによって効率的に産子を得ることが可能である。1卵採取法では通常1個の卵を得ることを目的にしているため、採卵操作、卵処理を少ない人員でしかも短時間で経済的に済ませる必要がある。本研究では、安価で簡便な局方リソゲル液を還流液として用い、一人の術者で卵の回収が可能な自動還流装置<sup>8)</sup>を用いて還流を行った。その結果、卵の回収率は78%となり、石田ら<sup>10)</sup>の68%、Sheltonら<sup>4)</sup>の71%をはるかに上回る成績が得られた。供卵牛1頭当たりに要した卵回収と卵探索時間は約14分程度であり、従来法<sup>5,12)</sup>の20-30分に比べて時間の短縮が図られた。これは本研究で用いた、卵の還流システムが有効であったことを明らかにしている。

供卵牛の分娩後の経過日数からみた卵の回収率及び移植可能胚率は、分娩後の日数を経過するに従って低下する傾向がみられた。すなわち150日を境にして、それ以前では移植可能胚率が87.5%であったのに対し、それ以後では51.6%となり有意な低下を示した。これは、繁殖障害牛と繁殖遅延牛の境界は、分娩後次の受胎までに要する日数が130日であるとした本田の報告<sup>17)</sup>を支持している。分娩後日数が大幅に経過したものでは、複数回の人工授精が施されたものであり、それまで結果として受胎しなかった牛であることから、繁殖機能に何等かの障害があったものと思われる。これらの牛では、1卵採取により卵が回収されなかったり、不授精卵であったり、初期発生の段階で変性過程をたどっていたりするなど様々な像が観察された(表1)。特に150日以降の3、4区では、卵の回収されない例がそれぞれ5/14、4/17頭と増えてくることから、これらの牛では正常な性周期を繰り返しても排卵が誘起されない場合の多いことが推測された。このような観察結果は繁殖機能の診断につながり<sup>18)</sup>、その時点で適切な治療を講ずることが可能と思われる。実際に、本研究では長期にわたり受胎をしなかった牛において、1卵採取法が繁殖機能診断法として有効であった。

1卵採取法により回収された胚の移植後の受胎率は、75%(9/12)と高く、本法の有効性が示唆された。1卵採取法により回収された胚は、過剰排卵処理法により回収された胚に比べて細胞の充実度が高く、受胎率が高いという利点があり、高泌乳牛のようにホルモン投与により影響を受け易い個体では、過剰排卵処理法よりも1卵採取法の選択が有効と思われる。

TABLE 2. Transfer of recovered embryo and pregnancy rate.

No. embryo transfer cows	No. transferable embryos	No. pregnant cows	Pregnancy rate (%)
12	12	9	75

## 文 献

- 1) Miller, B., (1981): What we've learned with embryo transfer. HOARD's Dairyman, 268-287.
- 2) Seidel, G.E.Jr., (1981): Superovulation and embryo transfer in cattle. Science, 23, 351-358.
- 3) Elsden, R.P., Hasler, J.F. and Seidel, G.E.Jr., (1976): Non - surgical recovery of bovine eggs. Theriogenology, 6, 523-532.
- 4) Shelton, J.N., Heath, J.D., Old, K.G. and Turnbull, G.E. (1978): Non - surgical recovery of eggs from single-ovulating bovines. theriogenology, 11, 149-152.
- 5) Drost, M., Brand, A. and Aarts, M.H.,(1976): A device for non-surgical recovery of bovine embryos. Theriogenology, 6, 503-507.
- 6) Elsden, R.P., Nelson, L.D. and Seidel, G.E. Jr.(1978): Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. Theriogenology, 9, 17-26.
- 7) Yamamoto, M., Ooe, M. and Suzuki, T.,(1990): Difference of superovulation according to donars from which transferable embryos were not obtained by single flushing. Theriogenology, 33, abstr.357.
- 8) 鈴木達行、山本政生、大江正人ほか(1989)：開発した自動還流器具によるウシ胚の回収。第76回家畜繁殖学会講演要旨、p. 68 .
- 9) 山本政生、鈴木達行ほか(1989)：自然発情による1卵採取を指標としたウシの過剰排卵処理。第108回日本獣医学会講演要旨 p.207 .
- 10) Ishida, T., Suzuki, T. and Matsuda, S.,(1987): The effect of single flushing before the treatment of superovulation on embryo recovery in cattle. Proc. 104th Ann. Meeting of Jpn. Vet. Soc., (abstr.)p204.
- 11) Suzuki, T. and Matsuda, S., et al.,(1987): Recovery of bovine embryos by intended cervical mucus remover and ova collector dish. Jpn. J. Anim. Reprod., 33, 160-162.
- 12) Sugie, T., Soma, T. and Otsuki, K.,(1972): Studies on the ovum transfer in cattle with special reference to collection of ova by

- means of non - surgical techniques. Nat. Inst. Anim. Ind. Bull., 25, 27-34.
- 13) Gary, M.L. and R.W.Wright Jr.,(1883): Proceedings of the workshop. IXth Annual Meeting of IETS. Theriogenology, 21, 30.
- 14) 鈴木達行、下平乙夫ほか(1986) : 和牛に対するF S Hによる過剰排卵処理試験。畜産の研究、40, 18-21
- 15) Chupin, D.,(1985): Applications partiques du transfert d'embryons chez les bovins. Elevage et Insemination, 206, 3-16.
- 16) Wright, J.M.,(1985): Pregnancy rates of bovine embryo with the time from collection to freezing. Theriogenology, 23,17-30.
- 17) 本田一良(1989) : 繁殖用和牛の受胎促進について。臨床獣医、Vol.4,11,29-33
- 18) 山本政生、藤井千春、大江正人、鈴木達行(1991) : 胚移植技術を活用した長期不受胎牛の繁殖機能診断。第111回日本獣医学会講演要旨、p.260

Development of Bovine In Vitro Matured and Fertilized Oocytes Co-Cultured with

Oviductal Epithelial Tissue in Serum-Free Medium

Yoshikazu NAGAO, Kazuhiro SAEKI, Masaki HOSHI, Noboru SEIKE and  
Hiratoshi KAINUMA

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

119 Uenae, Tomakomai, Hokkaido 059-13, Japan

**Abstract:** Examination was made of the effects of supplementation of fetal calf serum(FCS) on the blastocyst development of bovine in vitro matured and fertilized (IVM/IVF) oocytes in co - culture with bovine oviductal epithelial tissue (BOET). IVM/IVF oocytes were co - cultured in tissue culture medium 199 supplemented with or without FCS and/or BOET. The frequency of cleavage was the same with or without FCS (10%, v/v) and/or BOET ( $P>0.05$ ). Blastocyst development by co - culture with BOET was higher than without BOET ( $P<0.001$ ). When embryos were co - cultured with BOET, blastocyst development without FCS was similar to that with FCS ( $P>0.05$ ). The developmental stage and total cell number of the blastocysts from co - culture without FCS were essentially the same as with FCS ( $P>0.05$ ). Blastocysts from serum - free co - culture developed into normal calves after transfer.

**KEY WORDS:** Bovine, Embryo, In vitro, Co - culture, Serum

(Received 4 April 1992, Accepted 6 August 1992)

### Introduction

By the in vitro culturing of bovine oocytes matured and fertilized in vitro (IVM/IVF) early embryonic development can be studied and the results applied to other fields of biotechnology such as gene and nuclear transfer. Co - culturing with somatic cells supported embryonic development from one - cell stage to the blastocyst stage in cattle<sup>1~5</sup>.

However, the manner by which somatic cells exert beneficial effects on a co-culture remain unclear. In previous studies, serum was routinely used as a component of embryo culture media, but the effects of supplementation of serum in co-culture media have yet to be fully clarified. Takagi *et al.*<sup>6)</sup> have reported that co-culture with cumulus cells supported bovine embryonic development in serum-free medium.

In this study, examination was made of the effects of supplementation of fetal calf serum on blastocyst development of bovine IVM/IVF oocytes in a co-culture with bovine oviductal epithelial tissue.

## Materials and Methods

### In vitro maturation and fertilization of follicular oocytes

Bovine cumulus oocyte complexes were obtained from slaughterhouse ovaries that had been stored and transported at 21–24°C<sup>7)</sup> for 7–9 h in physiological saline. In vitro maturation and fertilization of oocytes were carried out as previously described<sup>8,9)</sup>.

Frozn semen from two bulls was used for all replicates.

### Preparation of Bovine Oviductal Epithelial Tissue

Bovine oviductal epithelial tissue (BOET) was taken from oviducts obtained from a slaughterhouse and prepared as previously described<sup>2)</sup> with some modification. Briefly, the mucosal tissue was washed in four changes of tissue culture medium 199 with 25 mM HEPES buffer (GIBCO, N.Y.) supplemented with 0.3% (w/v) polyvinylpyrrolidone (PVP; M.W. 40,000; Sigma Chemical Co., M.O.), 0.5 mM Na-pyruvate (Nacalai, Kyoto, Japan), 1% (v/v) antibiotic-antimycotic solution (Cat. No. 600–5240, GIBCO, N.Y.) (m-TCM-199). The pellet thus obtained was resuspended in m-TCM-199 to a ratio of 1:100 (v/v) and cultured in m-TCM-199 with or without 10% (v/v) heat treated fetal calf serum (FCS; GIBCO, N.Y.) at 39 °C under 5% CO<sub>2</sub> in air at high humidity for 30–35h prior to co-culturing with embryos. A suspension of floating cell masses was used as the co-culture. The medium was changed once at 3–4 days following the start of the cell culture.

### In Vitro Culture of IVM/IVF Embryos and Evaluation of Embryonic Development

Five hours after insemination, the embryos were denuded by vortex agitation<sup>10)</sup> and cultured in m-TCM-199 with or without FCS (10%) and/or BOET at 39 °C under 5% CO<sub>2</sub> in air at high humidity.

Cleavage ( $\geq$  2-cells) and blastocyst development were followed with a stereomicroscope (x 60) at 45–50 h and 192 h (8 days) after insemination, respectively. The frequency of blastocyst development was determined based on the proportion of cleaved embryos. The blastocysts showed three developmental stages according to a morphological criteria<sup>11)</sup>. Some blastocysts were fixed immediately, stained with 0.05% acridine orange and the number of their nuclei was counted under a fluorescent microscope for determination of cell numbers<sup>12)</sup>.

### Embryo Transfer and Pregnancy Diagnosis

Blastocysts from the co-culture with or without FCS were transferred non-surgically to synchronized recipient heifers 7–8 days after estrus (1 embryo/1 recipient). Pregnancy was confirmed by ultrasonography and rectal palpation at 35 and 55 days following transfer, respectively.

### Statistical Analysis

Statistical analysis was conducted according to Duncan's multiple range test.

## Results and Discussion

The effects of FCS and BOET on the development of bovine IVM/IVF embryos are shown in Table 1. The frequency of cleavage was the same for all groups ( $P>0.05$ ). BOET enhanced blastocyst development ( $P<0.001$ ), while FCS had no effect ( $P>0.05$ ). BOET formed vesicle-like tissue with active ciliary movement with or without FCS.

As shown in Table 2, developmental stage and total cell number of blastocysts from co-culture were the same with or without FCS ( $P>0.05$ ).

Assessment was made of blastocyst viability. Thirteen blastocysts from co-culture

without FCS were transferred to 13 recipients. Seven recipients became pregnant (54%).

Of these, two have delivered normal calves with one abortion to date. Five blastocysts from co-culture with FCS were transferred to 5 recipients. Two recipients became pregnant (40%). Of these, one delivered normal calves with one abortion.

The beneficial effects of BOET on bovine embryo development have been reported<sup>2,4,5)</sup>.

Eyestone *et al.*<sup>2,13)</sup> discussed that oviductal tissue might possibly produce embryotrophic factors and/or remove embryo-suppressive substances in the culture media. In previous studies, serum or serum albumin (BSA) was used as a component of embryo culture media. Sera or BSA may make difficult determination of the roles of oviductal tissue, since they contain unknown factors and vary in their chemical composition<sup>14,15)</sup>. In this study, there was no need to use serum for blastocyst development in a co-culture with oviductal tissue. Mermilliod *et al.*<sup>16)</sup> have observed bovine embryos to be capable of developing in a serum-free oviductal tissue-conditioned medium. Serum-free culture systems should facilitate determination of the roles of oviductal tissue in the early development of bovine embryos.

Table 1. Effects of fetal calf serum (FCS) and bovine oviductal epithelial tissue (BOET)<sup>a</sup> on in vitro development to the blastocyst stage of bovine IVM/IVF embryos

Treatment	No. embryos cultured	No. (%) embryos cleaved	No. (%) <sup>b</sup> blastocysts
None	121	92 (76)	1 (1) <sup>c</sup>
FCS alone	119	83 (70)	6 (7) <sup>c</sup>
BOET alone	136	93 (68)	39 (42) <sup>d</sup>
BOET + FCS	131	97 (74)	50 (52) <sup>d</sup>

a: Data pooled from 6 replicates.

b: Percentage of cleaved embryos.

c-d: Significantly differing values ( $P < 0.001$ ).

Table 2. Developmental stages and cell numbers of bovine IVM/IVF blastocysts co-cultured with BOET with or without supplementation of FCS<sup>a</sup>

Supple- ment of FCS cultured	No. embryos cultured	No. (%) embryos cleaved	No. (%) blastocysts				
			[Cell No.±SD, n= No. blastocysts examined]				
			b Total	Early blastocysts	c Blastocysts	c ≥ Expanded blastocysts	c blastocysts
+	193	155(80) [107±39, n=29]	46(30) [78±20, n=3]	6(13) [74±21, n=8]	12(26) [126±35, n=18]	28(61)	
-	187	133(71) [105±35, n=34]	45(34) [74±21, n=6]	10(22) [88±25, n=7]	12(27) [120±34, n=21]	23(51)	

a: Data pooled from three replicates.

b: Percentage of cleaved embryos.

c: Percentage of total number of the blastocysts.

Values within columns the same ( $P>0.05$ ).

## Acknowledgments

The authors express their appreciation to the meat inspecting offices and M.P.I. of Hayakita and Nemuro, and Dairy Service Sec., Bekkai Plant, Snow Brand Milk Products Co., Ltd. for providing the materials used in this study.

## References

- 1) Goto, K., Kajihara, Y., Kosaka, S., Koba, M., Nakanishi, Y. and Ogawa, K. (1988) :Pregnancies after co - culture of cumulus cells with bovine embryos derived from in - vitro fertilization of in - vitro matured follicular oocytes. J. Reprod. Fert., 83, 753-758.

- 2) Eyestone, W.H. and First N.L. (1989) : Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fert.*, 85, 715-720.
- 3) Fukuda, Y., Ichikawa, M., Naito, K. and Toyoda, Y. (1990) : Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells in vitro up to the blastocyst stage. *Biol. Reprod.*, 42, 114-119.
- 4) Ellington, J.E., Carney, E.W., Farrell, P.B., Simkin, M.E. and Foote, R.H. (1990) : Bovine 1-2-cell embryo development using a simple medium in three oviduct epithelial cell coculture systems. *Biol. Reprod.*, 43, 97-104.
- 5) McCaffrey, C., McEvoy, T.G., Diskin, M.G., Gwazdauskas, F.C., Kane, M.T. and Sreenan, J.M. (1991) : Successful co-culture of 1-4-cell cattle ova to the morula or blastocyst stage. *J. Reprod. Fert.*, 92, 119-124.
- 6) Takagi, Y., Mori, K., Tomizawa, M., Takahashi, T., Sugawara, S. and Masaki, J. (1991) : Development of bovine oocytes matured, fertilized and cultured in a serum-free, chemically defined medium. *Theriogenology*, 35, 1197-1207.
- 7) Yang, N.S., Lu, K.H. and Gordon, I. (1990) : In vitro fertilization (IVF) and culture (IVC) of bovine oocytes from stored ovaries. *Theriogenology*, 33, 352 Abstr.
- 8) Saeki, K., Hoshi, M., Leibfried-Rutledge, M.L. and First, N.L. (1990a) : In vitro fertilization and development of bovine oocytes matured with commercially available follicle stimulating hormone. *Theriogenology*, 34, 1035-1039.
- 9) Saeki, K., Hoshi, M., Leibfried-Rutledge, M.L. and First, N.L. (1991) : In vitro fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. *Biol. Reprod.*, 44, 256-260.
- 10) Sirard, M.A., Parrish, J.J., Ware, C.B., Leibfried-Rutledge, M.L. and First, N.L. (1988) : The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biol. Reprod.*, 39, 546-552.
- 11) Lindner, G.M. and Wright, R.W. Jr. (1983) : Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, 20, 407-416.

- 12) Saeki, K., Nagao, Y., Utaka, K. and Ishimori, H., (1990b) : Maturation of bovine oocytes by co-culture with rabbit preovulatory follicle cells. Jpn. J. Zootech. Sci., 61, 89-90.
- 13) Eyestone, W.H., Jones, J.M. and First N.L. (1991) : Some factors affecting the efficacy of oviduct tissue-conditioned medium for the culture of early bovine embryos. J. Reprod. Fert., 92, 59-64.
- 14) Kane, M.T. and Headon, D.R. (1980) : The role of commercial bovine serum albumin preparations in the culture of one-cell rabbit embryos to blastocysts. J. Reprod. Fert., 60, 469-475.
- 15) Price, P.J. and Gregory, E.A. (1982) : Relationship between in vitro growth promotion and biophysical and biochemical properties of the serum supplement. In Vitro, 18, 576-584.
- 16) Mermilliod, P., Mourmeaux, J.-L., Wils, C., Massip, A. and Dessy, F. (1992) : Protein-free oviduct-conditioned medium for complete bovine embryo development. Vet. Rec., 130, 13.

無血清培地におけるウシ体外成熟・体外受精卵の  
ウシ卵管上皮細胞との共培養

長尾慶和・佐伯和弘・星 雅樹・清家 昇・貝沼平敏  
雪印乳業株式会社受精卵移植研究所

ウシ体外成熟・体外受精卵をウシ卵管上皮細胞と共に培養する際のウシ胎仔血清 (FCS) 添加の影響について検討した。授精後45-50時間における卵割率 ( $\geq 2$  細胞) および8日目における胚盤胞への発育率は、FCS の有無に影響されなかった ( $P > 0.05$ )。さらに、得られた胚盤胞の発育ステージとその細胞数を調べたところ、FCS の有無による差は認められなかった ( $P > 0.05$ )。FCS 無添加の共培養で得られた胚盤胞を受卵牛へ移植したところ、正常な産仔に発育することが確認された。

Morphological Studies on Junctional Complexes  
in Compacted Mouse Embryos Developed in  
a Tunicamycin-Containing Medium

Ikuko YOTSUTANI\*, Sueo NIIMURA  
and Kazuo ISHIDA

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

**Abstract:** Morphological states of junctional complexes were compared between two groups of compacted mouse embryos: one developed in a tunicamycin-containing medium (TCM) and the other in at unicumycin-free medium (TFM). Both groups of compacted embryos had gap junctions between all pairs of round blastomeres, and between a round blastomere and a flattened one, while had zonula occludens, predesmosomes and gap junctions between all pairs of flattened blastomeres, but in embryos developed in a TCM, the junctional areas of the zonula occludens and of each predesmosome were smaller, and the number of the latter was fewer. While actin fluorescence showed no difference as to location and strength between the two groups, cytokeratin fluorescence did: it was filamentous and stronger in the cytoplasm of blastomeres in the embryos developed in a TFM, whereas it was granular and weaker when developed in a TCM. Decompacted embryos cultured in a TCM, meanwhile, showed no junctional complexes nor actin fluorescence, though they showed very weak cytokeratin fluorescence.

**KEY WORDS:** Compacted mouse embryo, Junctional complex, Actin, Cytokeratin  
(Received 24 July 1992, Accepted 15 September 1992)

## Introduction

In mouse embryos during blastocyst formation which starts at the 8-or 16-cell stage, outer blastomeres become flat while inner ones stay round if compaction has occurred<sup>1,2)</sup>. In such compacted embryos, zonula occludens, predesmosomes and gap junctions can be seen between any pair of flattened blastomeres, and further gap junctions are seen between a pair of round blastomeres and around blastomere and a flattened one<sup>2)</sup>. Because of the development of such junctional complexes, binding among blastomeres grows stronger, and finally blastocysts form, composed of trophoblast and inner-cell-mass cells<sup>1,2)</sup>.

When 2-cell mouse embryos are cultured in a tunicamycin-containing medium (TCM), compaction occurs at the 8-or 16-cell stage, but the embryos do not develop into blastocysts; when cultured continuously in a TCM, all the blastomeres become round (decompaction)<sup>3-8)</sup>. Surani et al.<sup>5)</sup> electron microscopically studied junctional complexes in mouse embryos developed in a TCM, and found a few gap junctions between each pair of round and flattened blastomeres of compacted embryos, as well as zonula occludens and gap junctions between each pair of flattened blastomeres. They did not however mention the existence of predesmosomes in compacted embryos, of junctional complexes in decompactated embryos, nor of cytoskeletal proteins as the constituents in junctional complexes.

This investigation dealt with electron microscopic observation of junctional complexes, and histochemical detection of actin and cytokeratin, both in uncompacted and compacted mouse embryos developed in a TCM. We wanted to compare the findings with those from embryos developed in a tunicamycin-free medium (TFM), such examinations being performed on decompactated embryos also. We then discussed the influence of tunicamycin on junctional complexes and the binding ability of blastomeres in mouse embryos.

### Materials and Methods

Seventy female mice of the ICR strain were kept and fed normally in a room at 24°C, lit 14 hrs a day from 4 a.m. till 6 p.m. Superovulated with 5 i.u. PMSG (Teikoku Hormone Manufacturing Co. Ltd., Tokyo, Japan), and with 5 i.u. hCG (Teikoku Hormone Manufacturing Co. Ltd.) 48 hrs later, they were mated with ICR strain males of proven fertility.

Two-cell embryos collected from oviducts 48 hrs after hCG injection were cultured in 1 ml of Whittingham medium<sup>9</sup> with and without 0.5 µg tunicamycin (Sigma, St. Louis, U.S.A.) for 20 to 32 hrs at 37°C with 5 % CO<sub>2</sub> and 95 % air. Observations were made on uncompacted 8-and 16-cell embryos, compacted 8-and 16-cell embryos, and on decompactated 16-and 32-cell embryos recovered after further culturing in a TCM.

In order to observe the ultrastructure, about one third of the embryos were fixed in a 0.1 M cacodylate buffer solution (pH 7.4) containing 4 % glutaraldehyde and 2 % paraformaldehyde at 4°C for 3 hrs. Rinsed 3 times in a 0.1 M cacodylate buffer solution (pH 7.4) over night, they were post-fixed in a 0.1 M cacodylate buffer solution (pH 7.4) containing 1 % osmium tetroxide. The embryos thus fixed were dehydrated through an acetone series, and then embedded in Epon 812. The embedded samples were cut using an ultramicrotome, stained with uranium acetate and lead nitrate, and then were photographed under a JEM-100B electron microscope.

For the detection of actin, approximately one third of the embryos were fixed in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)<sup>10</sup> containing 3.7 % formaldehyde at room temperature for 30 min. Rinsed in a PBS, they were immersed in a PBS containing 0.25 % Tween-20 (Bio-Rad Laboratories, Richmond, U.S.A.). Again rinsed in a PBS, the embryos were immersed in 100 µl PBS containing 16.5 ng phallacidin (Molecular Probes Inc., Junction City, U.S.A.) at room temperature for 20 min. As for the controls, some embryos were immersed in a PBS devoid of phallacidin.

For the detection of cytokeratin, the remaining embryos whose zonae pellucidae had been removed with pronase (Sigma) were fixed in a PBS containing 2 % paraformaldehyde at room temperature for 30 min. After being rinsed in a PBS containing 100 mM

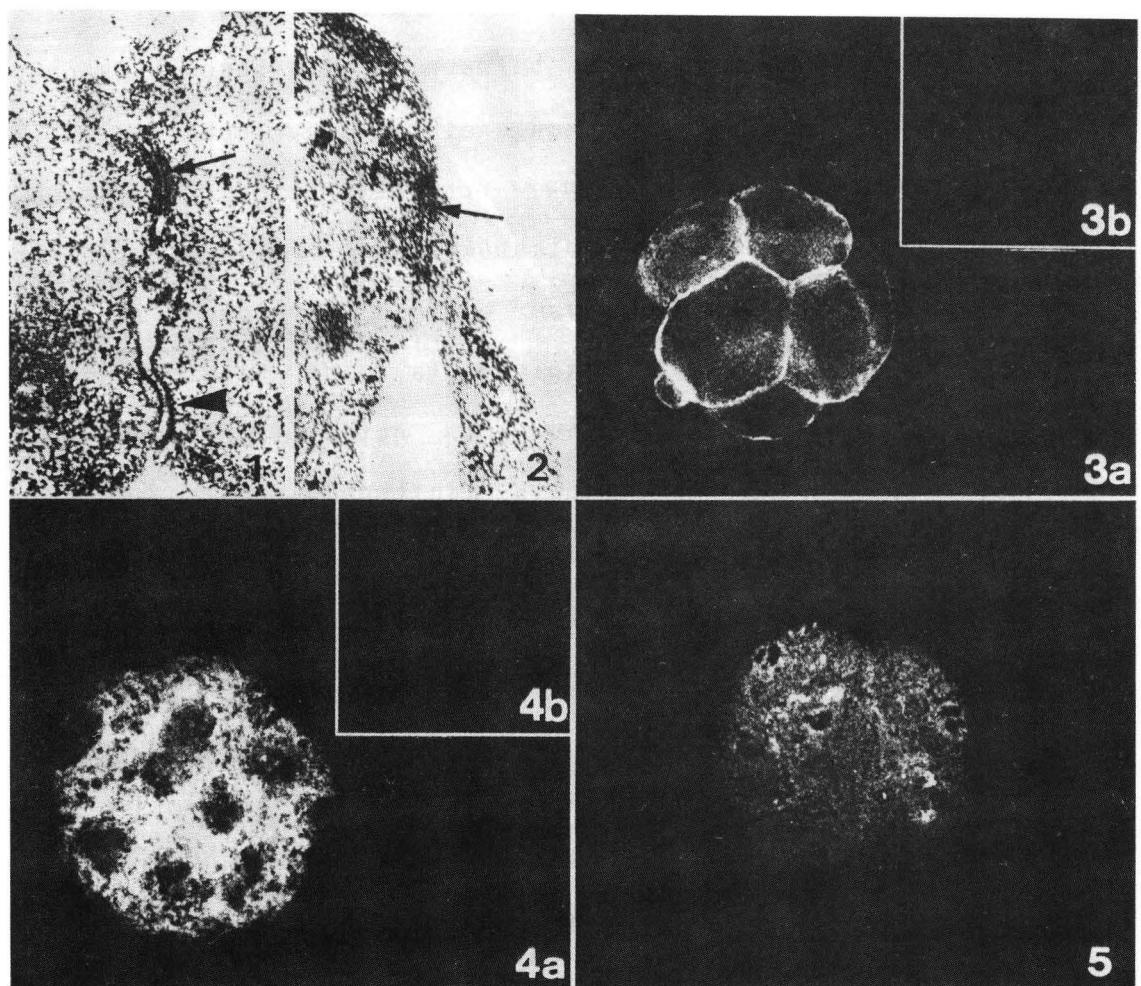
glycine (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) and 0.3 % bovine serum albumin (BSA, Sigma) (BSA-PBS), they were immersed in a BSA-PBS containing 0.25 % Tween-20 at room temperature for 5 min. Again rinsed in a BSA-PBS, the embryos were immersed in rabbit anti-keratin serum (Transformation Research Inc., Framingham, U.S.A.) that reacts with cytokaratin polypeptides (molecular weights; 50,000, 54,000 and 57,000) (the primary antibody), this antiserum having been diluted 30 times with a PBS. The embryos thus treated with the antiserum were rinsed in a PBS, and immersed in FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (Cappel, West Chester, U.S.A.) (the secondary antibody) at room temperature for 60 min. As for the controls, a few embryos were treated with normal rabbit serum or treated simply with FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG.

Each of the embryos thus prepared for light microscopic observation was placed in the center of 4 vaseline spots on a slide. A cover slip was then carefully placed on the vaseline spots and pressed gently to anchor the embryos in between the cover slip and the slide. Observation was carried out under a reflected-light fluorescing microscope (Nikon Corporation, Tokyo, Japan).

## Results

### Junctional complexes

In uncompacted 8-and 16-cell embryos developed both in a TCM and in a TFM, no junctional complexes were found between any pair of blastomeres. In compacted 8-and 16-cell embryos developed both in a TCM and in a TFM, gap junctions appeared between each pair of round blastomeres and between a round blastomere and a flattened one; zonula occludens, predesmosomes and gap junctions also appeared between each pair of flattened blastomeres (Figs. 1 and 2). In compacted 8-and 16-cell embryos developed in a TCM, however, junctional areas of zonula occludens and predesmosomes were smaller (Fig. 2), and the number of predesmosomes was fewer. In decompact 16-and 32-cell embryos which developed as a result of keeping them longer in a TCM, no junctional complex was found between each pair of blastomeres.



- Fig. 1. A compacted 16-cell mouse embryo developed in a TFM.  $\times 25,000$ . A *zonula occludens* (arrow) and a predesmosome (arrowhead) are seen between two flattened blastomeres.
- Fig. 2. A compacted 16-cell mouse embryo developed in a TCM.  $\times 25,000$ . A small *zonula occludens* (arrow) is seen between two flattened blastomeres.
- Fig. 3. Compacted 8-cell mouse embryos developed in a TFM, treated with phallacidin (a) and with PBS devoid of phallacidin (b).  $\times 250$ . a. Actin fluorescence is seen in the cytoplasm of both flattened and round blastomeres, and is especially bright in the peripheral cytoplasm where two blastomeres adhering to each other. b. No fluorescence is seen in the cytoplasm of any blastomere.
- Fig. 4. Compacted 8-cell mouse embryos developed in a TFM, treated with rabbit anti-keratin serum and FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (a) and only with FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (b).  $\times 250$ . a. Cytokeratin fluorescence is filamentous and brighter in the cytoplasm of both flattened and round blastomeres. b. No fluorescence is seen in the cytoplasm of any blastomere.
- Fig. 5. A compacted 8-cell mouse embryo developed in a TCM, treated with rabbit anti-keratin serum and FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG.  $\times 250$ . Cytokeratin fluorescence is granular and weak in the cytoplasm of both flattened and round blastomeres.

### Actin

Immersed in phallacidin solution, the cytoplasm of uncompacted and compacted embryos showed fluorescence (Fig. 3a), but the embryos immersed in a solution devoid of phallacidin did not (Fig. 3b). This finding has been interpreted to mean that the fluorescence shows the presence of actin. No difference was observed in the strength of the fluorescence among the embryos developed in a TCM and in a TFM. In uncompacted and compacted embryos at the 8- and 16-cell stages, the fluorescence was brighter in the peripheral cytoplasm of blastomeres than in the subcortical cytoplasm, but in compacted embryos, it was much brighter in the peripheral cytoplasm where two blastomeres adhered (Fig. 3a). In decompact 16- and 32-cell embryos, there was no fluorescence traceable anywhere.

### Cytokeratin

Treated with the primary antibody and then with the secondary antibody, fluorescence appeared in the cytoplasm of the embryos (Figs. 4a and 5), but none appeared when immersed in normal rabbit serum or when treated with the secondary antibody only (Fig. 4b). This finding indicates the fluorescence seen shows the presence of cytokeratin. The fluorescence was granular in all the blastomeres of uncompacted 8- and 16-cell embryos, and there was no difference in its strength among the embryos either developed in a TCM or in a TFM. In compacted 8- and 16-cell embryos developed in a TFM, the fluorescence was filamentous in their blastomeres and was brighter in flattened blastomeres than in round ones. When developed in a TCM, it was granular and weaker in all the blastomeres (Fig. 5). In decompact 16- and 32-cell embryos, meanwhile, the fluorescence, which was also granular, was very weak.

### Discussion

Molecular biological mechanisms of cell-cell recognition preceding the construction of junctional complexes and compaction in mouse embryos have been explained as follows: when embryos reach the 8- or 16-cell stage, calcium-dependent cell-cell adhesion molecules on the cell surface and cytoskeletal filaments in the cytoplasm are activated<sup>11-13)</sup>; then,

stage-specific embryonic antigen-1 (SSEA-1) containing either glycoproteins or glycolipids appears on the surface of blastomeres, in order to bind to the receptors on the surface of adjacent blastomeres, and thus the blastomeres recognize each other<sup>14-18)</sup>; finally, compaction occurs accompanied by simultaneous junctional complexes between pairs of blastomeres.

In the present investigation we electron microscopically examined junctional complexes in mouse embryos developed in a medium containing tunicamycin, an inhibitor of glycoprotein synthesis<sup>4,5,19)</sup>, and observed the poor development of zonula occludens and predesmosomes in compacted embryos, and in decompactated embryos, moreover, there were no junctional complexes left. These findings suggest that in 8-or 16-cell embryos cultured in a TCM, compaction occurs because of the incomplete state of SSEA-1, which subsequently ends decompaction at the 16-or 32-cell stage. This is probably preceded by destruction of junctional complexes, owing to the synthesis inhibitor against glycoproteins contained in SSEA-1.

Concerning cytoskeletal proteins, one of the constituents of junctional complexes, cytokeratin was granular and the amount was small in compacted embryos developed in a TCM. While there was no actin in decompactated embryos, there was some cytokeratin found, though the amount was very small. These findings seem to show that incomplete development of junctional complexes in the embryos developed in a TCM may be due to a decrease in the amount of cytoskeletal proteins, which is known to be affected by tunicamycin. Iwakura and Nozaki<sup>8)</sup> have biochemically ascertained the inhibition of cytokeratin synthesis in mouse embryos by tunicamycin .

References

- 1) Ducibella, T. and Anderson, E. (1975) : Cell shape and membrane changes in the eight-cell mouse embryo : Prerequisites for morphogenesis of the blastocyst. Dev. Biol., 47, 45-58.
- 2) Yotsutani, I., Niimura, S. and Ishida, K. (1992) : The incidence and morphology of transformed embryos in the course of blastocyst formation in four mammalian species. Jpn. J. Fertil. Steril., 37, 74-82.
- 3) Surani, M. A. H. (1979) : Glycoprotein synthesis and inhibition of glycosylation by tunicamycin in preimplantation mouse embryos : Compaction and trophoblast adhesion. Cell, 18, 217-227.
- 4) Antienza-Samols, S. B., Pine, P. R. and Sherman, M. I. (1980) : Effects of tunicamycin upon glycoprotein synthesis and development of early mouse embryos. Dev. Biol., 79, 19-32.
- 5) Surani, M. A. H., Kimber, S. J. and Handyside, A. H. (1981) : Synthesis and role of cell surface glycoproteins in preimplantation mouse development. Exp. Cell Res., 133, 331-339.
- 6) Sutherland, A. E. and Calarco-Gillam, P. G. (1983) : Analysis of compaction in the preimplantation mouse embryo. Dev. Biol., 100, 328-338.
- 7) Iwakura, Y. and Nozaki, M. (1985) : Effects of tunicamycin on preimplantation mouse embryos : Prevention of molecular differentiation during blastocyst formation. Dev. Biol., 112, 135-144.

- 8 ) Iwakura, Y. and Nozaki, M. (1989) : Role of cell surface glycoproteins in the early development of the mouse embryos. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 294, 199-210.
- 9 ) Whittingham, D. G. (1971) : Culture of mouse ova. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 14, 7-21.
- 10) Dulbecco, R. and Vogt, M. (1954) : Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. Exp. Med.*, 99, 167-182.
- 11) Fleming, T. P. and Johnson, M. H. (1988) : From egg to epithelium. *Ann. Rev. Cell Biol.*, 4, 459-485.
- 12) Takeichi, M. (1988) : The cadherins : cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development*, 102, 639-655.
- 13) Ogou, S., Okada, T. S. and Takeichi, M. (1982) : Cleavage stage mouse embryos share a common cell adhesion system with teratocarcinoma cells. *Dev. Biol.*, 92, 521-528.
- 14) Solter, D. and Knowles, B. B. (1978) : Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 75, 5565-5569.
- 15) Gooi, H. C., Feizi, T., Kapadia, A., Knowles, B. B., Solter, D. and Evans, M. J. (1981) : Stage-specific embryonic antigen involves  $\alpha$  1-3 fucosylated type 2 blood group chains. *Nature*, 292, 156-158.
- 16) Bird, J. M. and Kimber, S. J. (1984) : Oligosaccharides containing fucose linked  $\alpha$  (1-3) and  $\alpha$  (1-4) to N-acetylglucosamine cause decompaction of mouse morulae. *Dev. Biol.*,

104, 449-460.

- 17) Richa, J. and Solter, D. (1986) : Role of cell surface molecules in early mammalian development. In Experimental Approaches to Mammalian Embryonic Development (Rossant, J. and Pederson, R., eds) p293-320, Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- 18) Kimber, S. J. (1988) : The role of fucosylated glycoconjugates in cell-cell interactions of the mammalian pre-implantation embryo. In Eukaryote Cell Recognition (Chapman, G. P., Ainsworth, C. and Chatham, C., eds) p194-224, Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- 19) Takatsuki, A., Arima, K. A. and Tamura, G. (1971) : Tunicamycin, a new antibiotic. I. Isolation and characterization of tunicamycin. J. Antibiotics, 24, 215-223.

ツニカマイシン添加培養液で発生した

マウス胚の割球接合に関する研究

四谷伊公子\*・新村末雄・石田一夫

新潟大学大学院自然科学研究科\*, 新潟大学農学部, 新潟市950-21

ツニカマイシン添加培養液(TCM) で2細胞期から発生したマウス胚について、割球接合の状態を無添加培養胚のものと比較した。TCM および無添加培養液でコンパクションを起こした胚では、球形割球間および球形割球と扁平割球の間にはギャップ結合が、扁平割球間にはこれ以外に閉鎖帶とデスマソーム前駆体がみられたが、TCM で発生した胚では、扁平割球間の閉鎖帶とデスマソーム前駆体の接合面は小さく、デスマソーム前駆体の数も少なかった。一方、アクチンの存在を示す蛍光の局在と強さは、両種培養液で発生した胚で相違なかった。サイトケラチンの存在を示す蛍光は、無添加培養液でコンパクションを起こした胚では割球の細胞質に線維状を呈して強度に認められたが、TCM で発生した胚では顆粒状で弱かった。また、TCM でデコンパクションを起こした胚では、接合装置とアクチンは観察されず、サイトケラチンの蛍光も著しく弱かった。

Strain difference in the development of preimplantation  
mouse embryos in a medium supplemented with superoxide  
dismutase or ethylenediamine tetraacetic acid

Yutaka Toyoda, Sadahiro Azuma, Yoshiaki Itagaki <sup>1)</sup> and Satoshi Takeda <sup>2)</sup>

Department of Reproductive and Developmental Biology, The Institute of Medical Science,

The University of Tokyo, Minato - ku, Tokyo 108

Present address:<sup>1)</sup> Central Research Institute, Itoham Foods Inc., Moriyamachi, Ibaraki 302 - 01, <sup>2)</sup> Otsuka Assay Laboratories, Otsuka Pharmaceutical Co.,Ltd, Tokushima - shi 771 - 01

**Abstract:** Effects of superoxide dismutase (SOD, from bovine erythrocytes) or ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA - 2Na) on the preimplantation development of mouse embryos obtained by fertilization in vitro were examined in different strains. In "the partially blocking strains" (ICR and DDD) in which small proportions of in vitro fertilized embryos develop beyond the 2 - cell stage in Whitten's medium, both SOD and EDTA exerted significant effects in promoting the development to the 4 - cell and to the blastocyst stage. In "the completely blocking strain" (AKR) in which none of the embryos develop beyond the 2 - cell stage, neither SOD nor EDTA was effective in overcoming the 2 - cell block. A significant paternal effect was observed when the development of DDDxDDD embryos was compared with that of DDDxC57BL embryos. It is suggested that both SOD and EDTA may share a common mechanism in promoting the embryonic development in vitro.

**Key words:** SOD; EDTA; In vitro fertilization; Embryo culture; Two - cell block

(Received 30 August 1992, Accepted 20 September 1992)

### Introduction

Preimplantation embryos from most outbred and inbred mouse strains do not develop into blastocysts when cultured from the one - cell stage but are likely to arrest the

Table 1. Effect of superoxide dismutase (SOD) and catalase on preimplantation development of ICR mouse embryos fertilized and cultured in vitro

<u>Conc. (ug/ml)</u>		No. of embryos	<u>No. (%) of embryos developed to:</u>		
SOD <sup>a</sup>	catalase <sup>b</sup>	cultured	2-cell	4-cell	Blastocyst
—	—	160	160 (100)	89 (56)	26 (16)
12.5	—	72	72 (100)	61 (85)*	38 (53)*
25	—	64	64 (100)	62 (97)*	50 (78)*
50	—	160	160 (100)	153 (96)*	121 (76)*
100	—	67	67 (100)	66 (99)*	62 (93)*
200	—	72	71 (99)	67 (93)*	60 (85)*
—	12.5	48	48 (100)	21 (44)	3 (6)
—	25	48	48 (100)	29 (60)	15 (31)
—	50	120	120 (100)	65 (54)	19 (16)
—	100	48	48 (100)	17 (35)	4 (8)
50	50	48	48 (100)	46 (96)*	42 (88)*

<sup>a</sup> Cu/Zn-SOD from bovine erythrocytes (3,000  $\mu$ /ml, Sigma)

<sup>b</sup> Catalase from bovine liver (11,000  $\mu$ /ml, Sigma)

\* Significantly different from control ( $p < 0.05$ )

On the other hand, the addition of catalase did not give any significant effect at the concentration between 12.5 and 100  $\mu$ g/ml. Combination of SOD and catalase (50  $\mu$ g/ml each) gave a significantly higher developmental rate as compared to the control and catalase alone, but the rate was not significantly different from that of SOD alone. From these results, 100  $\mu$ g/ml SOD was chosen as the standard dose for the subsequent experiments.

Strain difference in the effect of SOD and EDTA on preimplantation development of embryos derived from B6 or AKR eggs

In this experiment, eggs from one of two strains each represents non-blocking (B6) or completely blocking (AKR) strains with regard to "the in vitro 2-cell block", were fertilized with ICR spermatozoa and the resulting embryos were cultured in WM with or without supplementation with SOD (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) or EDTA (100  $\mu\text{M}$ ). The results presented in Table 2 clearly indicate that neither SOD nor EDTA could overcome the 2-cell block in the completely blocking strain (AKR), although Embryos from the eggs of non-blocking strain (B6) developed at high rates regardless of the supplementation.

Table 2. Effect of superoxide dismutase (SOD) and EDTA on preimplantation development of mouse embryos derived from C57BL or AKR eggs fertilized with ICR sperm and cultured *in vitro*

Strain of eggs	SOD ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	EDTA ( $\mu\text{M}$ )	No. of embryos	No. (%) of embryos developed to:		
				2-cell	4-cell	Blastocyst
C57BL	—	—	70	70 (100)	70 (100) <sup>a</sup>	59 (84) <sup>a</sup>
	100	—	70	70 (100)	70 (100) <sup>a</sup>	65 (93) <sup>a</sup>
	—	100	90	90 (100)	90 (100) <sup>a</sup>	82 (90) <sup>a</sup>
AKR	—	—	39	39 (100)	0 ( 0) <sup>b</sup>	0 ( 0) <sup>b</sup>
	100	—	43	43 (100)	1 ( 2) <sup>b</sup>	0 ( 0) <sup>b</sup>
	—	100	41	41 (100)	0 ( 0) <sup>b</sup>	0 ( 0) <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Values with different superscript differ significantly in the same column ( $p < 0.05$ )

Paternal effect in preimplantation development of mouse embryos derived from DDD eggs fertilized with DDD or C57BL sperm and cultured in WM with or without supplementation of SOD or EDTA

As shown in Table 3, most DDD x DDD embryos arrested the development at the 2-cell stage (9.6% development to the 4-cell and none to the blastocyst) when cultured in WM.

development at the two - cell stage. This phenomenon has been referred to as "the 2 - cell block"<sup>1)</sup>. The block has been known to be partially alleviated by the supplementation with several metal chelators, including ethylenediamine tetraacetate (EDTA)<sup>2-4)</sup> or activin<sup>5)</sup> into the medium, but the exact nature of the block has not been fully understood yet.

Recently, Noda et al<sup>6)</sup> reported that the culture of mouse pronuclear embryos in the presence of superoxide dismutase (SOD) significantly increased the rate of development to the blastocyst stage, suggesting the involvement of superoxide radicals in the block to development<sup>7)</sup>. Nasr - Esfahani and Johnson<sup>8)</sup> has also suggested that the increased production of reactive oxygen species may be related to the in vitro 2 - cell block of mouse embryos. On the other hand, it has been known that the embryos from certain inbred strains, such as C57BL, and their F<sub>1</sub> hybrids are capable of developing from the one - cell to the blastocyst stage completely in vitro<sup>9,10)</sup>. In this paper we examined the effect of EDTA and SOD on the development of in vitro fertilized embryos of different mouse strains.

#### Materials and Methods

##### Recovery of gametes and in vitro fertilization

Eight to 12 weeks old female mice of Jcl:ICR (ICR), C57BL/6N (B6), DDD, and AKR/N (AKR) strain were used for the recovery of ovulated eggs, and 10 - 15 - week - old ICR, B6 or DDD male mice were used for the recovery of epididymal spermatozoa. ICR and B6 mice were purchased from Clea Japan Inc. DDD and AKR mice were obtained from the Laboratory Animal Research Center, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo. The procedures for the IVF are essentially the same as previously described<sup>11)</sup>. Briefly, the female mice were induced to superovulate by i.p. injections of 5 i.u.eCG (Sankyo Zoki, Tokyo) and 5 i.u.hCG (Sankyo Zoki) given 48h apart. The mice were killed by cervical dislocation at 15 - 16h after the hCG injection and cumulus - egg complexes were introduced into the fertilization medium (TYH)<sup>12)</sup>. Cauda epididymal sperm were preincubated for 2h in TYH and then introduced into the fertilization medium at the final concentration of 150 cells/ul. All incubations were performed at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in air.

### Embryo culture

At 6 - 8h after the insemination, eggs with a male and a female pronucleus were picked up from the medium, washed twice in Whitten's medium (WM)<sup>13)</sup>, and transferred into 0.1ml drops of WM supplemented with or without either EDTA (EDTA - 2Na, Dojin Laboratories, Kumamoto), or SOD (from bovine erythrocytes, 3,000 $\mu$ /ml, Sigma, St.Louis, MO) and /or catalase (from bovine liver, 11,000 $\mu$ /ml, Sigma) (12-20 embryos/drop). Development of cultured embryos were examined at 24h intervals starting from the time of insemination. The development beyond the 4 - cell stage at 48h was the criterion for the breakthrough of the 2 - cell block. Final rate of preimplantation development was evaluated by the formation of expanded blastocysts at the end of the culture period of 120h.

### Statistical analysis

Experimental data were analyzed using  $\chi^2$  test and Fischer's exact probability test.

## Results

### Effect of SOD and catalase on preimplantation development of ICR embryos

As shown in Table 1, SOD exerted a beneficial effect on the development of ICR embryos in culture. The effect was significant at all concentrations tested (12.5-200 $\mu$ g/ml), as compared to the control embryos cultured in WM. At 100 $\mu$ g(300u)/ml, almost all (99%) embryos developed beyond the 2 - cell and the final developmental rate to the blastocysts exceeded 90%, in sharp contrast to the low rate of development in the control (16%).

The addition of SOD or EDTA significantly improved the development beyond the 2-cell stage (49 and 61%, respectively). The development to the blastocyst stage was still very low, however (2.1 and 3.8%, respectively). Embryos derived from DDD eggs fertilized with B6 sperm showed slight but significant increase in the developmental rate to the 4-cell embryos in WM (29%) but none of the embryos developed to the blastocysts. Both SOD and EDTA supported better development to the 4-cell stage (48 and 65%, respectively). Furthermore, significant proportions of the embryos (16/45 and 27/61 in SOD and EDTA group, respectively) could successfully developed to the blastocyst stage.

Table 3. Effect of superoxide dismutase (SOD) and EDTA on preimplantation development of mouse embryos derived from DDD eggs fertilized with DDD or C57BL sperm and cultured in vitro

Strain of eggs	SOD ( $\mu$ g/ml)	EDTA ( $\mu$ M)	No. of embryos	No. (%) of embryos developed to:		
				2-cell	4-cell	Blastocyst
DDD	—	—	94	93 (99)	9 (10) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>
	100	—	94	94 (100)	46 (49) <sup>c</sup>	2 (2) <sup>a</sup>
	—	100	79	78 (99)	48 (61) <sup>c</sup>	3 (4) <sup>a</sup>
C57BL	—	—	94	94 (100)	27 (29) <sup>b</sup>	0 (0) <sup>a</sup>
	100	—	94	94 (100)	45 (48) <sup>c</sup>	16 (17) <sup>b</sup>
	—	100	94	94 (100)	61 (65) <sup>d</sup>	27 (29) <sup>b</sup>

<sup>a,b,c,d</sup> Values with different superscript differ significantly within the same column ( $p < 0.05$ )

### Discussion

The present study demonstrates that the addition of SOD into the culture medium improve the preimplantation development of mouse embryos of "partially blocking strains, such as ICR (outbred) and DDD (inbred). This confirms the previous reports by Noda et al.<sup>6)</sup>

Umaoka et al<sup>7</sup>, in which outbred strains (ICR and TUCK) were used for experiment. These authors have suggested that active oxygen is involved in the 2-cell block phenomenon and this harmful effect can be prevented by culturing embryos under low oxygen conditions<sup>1</sup><sup>3,14</sup> and in the presence of SOD. Nasr-Esfahani and Johnson<sup>8</sup> have also suggested that the increase in production of reactive oxygen species such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at the G<sub>2</sub>/M phase of the 2-cell stage may be related to the block to development.

SOD catalyzes the dismutation reaction in which two superoxide radicals (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) are transformed to a molecule of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and a molecule of oxygen (O<sub>2</sub>), while catalase catalyzes the decomposition of hydrogen peroxide to water and oxygen<sup>15</sup>. As it is the SOD but not the catalase that promoted the development (Table 1), the rate limiting step must be the degradation of superoxide radicals rather than that of hydrogen peroxide, if active oxygen species is really the cause of the developmental block. This seems not to be perfectly consistent with the view of Nasr-Esfahani and Johnson<sup>8</sup> who observed the rise in peroxide level in cultured mouse embryos and suggested that the arrest of embryonic development by peroxidative damage might involve the conversion of hydrogen peroxide to hydroxy radicals (HO<sup>•</sup>).

Although SOD is highly effective in promoting the preimplantation development of "partially blocking" strains, it is totally ineffective in overcoming the 2-cell block in "completely blocking" strain (AKR). Neither could EDTA do so. Even in the partially blocking strains, the effect is less apparent in embryos derived from DDD eggs in which development beyond the 2-cell stage is more severely arrested.

Throughout this study, a striking similarity is observed between the effect of SOD and that of EDTA. The effect of 100 uM EDTA which is the optimal concentration for promoting the preimplantation development of ICR embryos *in vitro*<sup>3,4)</sup>, exerted essentially the same effects on the B6xICR, AKR<sub>x</sub>ICR, DDD<sub>x</sub>DDD and DDD<sub>x</sub>B6 embryos, as that of 100 μg/ml (300 μ/ml) SOD which is also the optimal concentration for ICR embryos (Table 1). This parallelism strongly suggest that SOD and EDTA share the same mechanism in exerting the beneficial effect on the preimplantation development *in vitro*.

The most likely explanation might be that some metal ion(s) is involved in the cell damage caused by the reactive oxygen species and EDTA prevents the damage by chelating

it. Iron(Fe) might be involved because it catalyzes Harber - Weiss reaction in generating hydroxy radicals from superoxide and hydrogen peroxide <sup>16)</sup>. In our previous study <sup>17)</sup>, however, Fe - EDTA was found to promote the development of in vitro fertilized ICR embryos beyond the 2 - cell stage as effectively as EDTA - 2Na, although the final development to the blastocyst was not improved by the Fe - EDTA. It is conceivable therefore that the excess amount of Fe ions might exert harmful effect on the later stages of preimplantation development, but not specifically on the 2 - cell stage embryos.

Another point of interest in this study is the finding that the paternal effect is involved in the improvement of preimplantation development by SOD and EDTA. (Table 3). It has been known that the genotype of the oocyte alone, regardless of that of the fertilizing spermatozoon, determines whether embryos will arrest the development at the 2 - cell stage when cultured in vitro <sup>8,18)</sup>. The present results show, however, that there is a slight but significant difference in the development to the 4 - cell stage in WM, between DDDxD<sub>n</sub> (10%) and DDDxB6 (29%) embryos. Whether this difference is an indication of the activation of transcription of embryonic genome has not been determined yet <sup>19)</sup>, but it is noteworthy that the effects of SOD and EDTA are apparent in the improvement of the development to the blastocyst stage. These results suggest that the beneficial effects of SOD and EDTA are not restricted to "the 2 - cell block" but can be extended to the whole period of preimplantation development.

As neither SOD nor EDTA was effective in overcoming "the 2 - cell block" in a completely blocking strain (AKR), newer aspect must be introduced to investigate the problem of in vitro block to development further. Modification of the basic medium (WM), as proposed by Chatot et al <sup>20)</sup> is undoubtedly one of the most urgent subjects which is now being underway.

#### Acknowledgments

We wish to thank Drs.S.Kanegasaki and M.Nakamura, Department of Bacterial Infection, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, for valuable advice on the experiments using SOD. This study was supported in part by a Grant - in - Aid for

Scientific Research from the Ministry of Education, Culture and Science, Japan (04404016).

### References

- 1) Biggers,J.D. (1987):Pioneering mammalian embryo culture. In *The Mammalian Preimplantation Embryos* (Bavister,B.D.,ed) p1-22, Plenum Press, New York.
- 2) Fissore,R.A.,Jackson,K.V. and Kiessling,A.A.(1989):Mouse zygote development in culture medium without protein in the presence of ethylenediamine tetraacetic acid. *Biol. Reprod.*,41,835-841.
- 3) Hoshi,M. and Toyoda,Y. (1985):Effect of EDTA on the preimplantation development of mouse embryos fertilized in vitro. *Jpn.J.Zootech.Sci.*,56,931-937.
- 4) Toyoda,Y.,Azuma,S. and Takeda,S.(1989):Effects of chelating agents on preimplantation development of mouse embryos fertilized in vitro. In *Development of Preimplantation Embryos and Their Environment* (Yoshinaga,K. and Mori,T. eds)p171-179, Alan R.Liss, New York.
- 5) Lu,R-z.,Shiota,K.,Toyoda,Y. and Takahashi,M. (1990):Activin(EDF) releases the two-cell block of mouse embryos in culture. *Jpn.J.Anim.Reprod.*,36,127-132.
- 6) Noda,Y.,Matsumoto,H.,Umaoka,U.,Tatsumi,K.,Kishi,J. and Mori,T. (1991):Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block. *Mol.Reprod.Devel.*,28,356-360.
- 7) Umaoka,Y.,Noda,Y.,Narimoto,K. and Mori,T. (1992):Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. *Mol.Reprod.Devel.*,31,28-33.
- 8) Nasr-Esfahani,M.M. and Johnson,M.H.(1991):The origin of reactive oxygen species in mouse embryos cultured in vitro. *Development* 113,551-560.
- 9) Kasai,K.,Minato,Y. and Toyoda,Y.(1978):Fertilization and development in vitro of mouse eggs from inbred strains and F1 hybrids.*Jpn.J.Anim.Reprod.*,24,19-22.
- 10) Brown,J.J.D. and Whittingham,D.G.(1991):The role of pyruvate, lactate and glucose during preimplantation development of embryos from F1 hybrid mice in vitro. *Development* 112,99-105.
- 11) Toyoda,Y. and Takasugi,M.(1982):Early development of mouse embryos fertilized in vitro. In *Genetic Approaches to Developmental Neurobiology* (Tsukada,Y.ed)p57-64, Univ.of

Tokyo Press, Tokyo.

- 12) Toyoda, Y., Yokoyama, M. and Hosi, T. (1971): Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro. I. In vitro fertilization of eggs by fresh epididymal sperm. Jpn. J. Anim. Reprod., 16, 147-151.
- 13) Whitten, W.K. (1971): Nutritional requirements for the culture of preimplantation embryos in vitro. Adv. in Biosci., 6, 129-139.
- 14) Quinn, P. and Harlow, G.M. (1978): The effect of oxygen on the development of preimplantation embryos in vitro. J. Exp. Zool., 206, 73-80.
- 15) McCord, J.M. and Fridovich, I. (1969): Superoxide dismutase. J. Biol. Chem., 244, 6049-6055.
- 16) Halliwell, B. (1987): Superoxide-dependent formation of hydroxy radicals in presence of iron chelates. FEBS letters, 92, 321-326.
- 17) Suzuki, H., Fukuda, Y. and Toyoda, Y. (1988): Effect of metal-EDTA chelates on the preimplantation development of mouse embryos fertilized in vitro. J. Mamm. Ova Res., 5, 84-88.
- 18) Goddard, M.J. and Pratt, H.P.M. (1983): Control of events during early cleavage of the mouse embryo: an analysis of the 2-cell block. J. Embryol. exp. Morph., 73, 111-133.
- 19) Telford, N.A., Watson, A.J. and Schultz, G.A. (1990): Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: A comparison of several species. Mol. Reprod. Devel., 26, 90-100.
- 20) Chatot, C.L., Lewis, J.L., Torres, I. and Ziomek, C.A. (1990): Development of 1-cell embryos from different strains of mice in CZB medium. Biol. Reprod., 42, 432-440.

スーパーオキサイドジスムターゼまたはエチレンジアミン四酢酸を添加された培地内での  
マウス初期胚発生における系統差について

豊田 裕・東 貞宏・板垣 佳明<sup>1)</sup>・武田 聖<sup>2)</sup>

東京大学医科学研究所獣医学研究部、東京都港区 108  
現所属：伊藤ハム中央研究所<sup>1)</sup>茨城県守谷町 302-01、  
大塚アッセイ研究所<sup>2)</sup>徳島市 771-01

マウス初期胚の発生に必要な条件を明らかにする目的で、種々の系統の体外受精由来胚をスーパーオキサイドジスムターゼ (SOD、ウシ赤血球由来) またはエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を添加された培地内で前核期から胚盤胞期まで (精子添加後 6 時間から 120 時間まで) 培養して、4 細胞期以降および胚盤胞への発生を比較検討した。基礎培地としては、WHITTEN の培地を用いた。ICR 胚の発生は SOD の添加により濃度依存的に改善され、0.1 mg/ml (300 μ/ml) の濃度で 90% 以上の胚が胚盤胞に達した。カタラーゼの添加は無効であった。一方、基礎培地では 2 細胞期で発生が完全に停止する AKR 卵子由来胚に対しては、SOD, EDTA ともに無効であった。DDD 卵子由来胚の発生は DDD 精子による受精卵よりも C57BL 精子による受精卵において有意に高く、これらの胚の発生は、SOD または EDTA の添加により更に改善された。SOD と EDTA の効果が類似していることから、両者に共通する作用機序の存在が示唆された。

剥皮期ミンク卵巣から回収した  
卵母細胞の体外成熟

*In vitro* maturation of mink oocytes obtained from ovaries at pelting time.

亀山祐一・竹田秀一・石島芳郎

Yuichi KAMEYAMA, Hidekazu TAKEDA and Yoshiro ISHIJIMA

東京農業大学生物産業学部

Faculty of Bioindustry, Tokyo University of Agriculture

Key word : Mink, Oocyte, Maturation, Pelting.

(受付1992年8月28日、受理1992年9月17日)

季節繁殖動物のミンクは3月の繁殖季節に集中して交尾するため<sup>3)</sup>、成熟卵母細胞や受精卵を用いる研究は実施の機会がかなり制限される。一方、11月の剥皮期には大半のミンクが屠殺され、何ら利用することなく臓器が廃棄されるため、この廃棄卵巣から卵母細胞を回収して実験材料とすることが期待される。そこで、本実験では剥皮期の卵巣から回収した卵母細胞の体外成熟を試みた。

実験は既報<sup>1)</sup>に準じて行った。卵巣は、繁殖期（2月下旬～3月上旬）および剥皮期（11月中旬）に無処理もしくはPMS G処理した成熟雌から摘出した。卵母細胞は、PBS中で卵胞を穿刺または卵巣を細切することにより回収した。卵丘細胞が緊密に付着した卵母細胞は、10%のFCSを添加したTYHもしくはTCM 199で48時間まで成熟培養した。培養条件は、温度37℃、炭酸ガス5%、空気95%とした。核相の判定は、カルノア液で固定後、1%オルセインで染色して行った。

培養0時間すなわち回収直後に検査した卵母細胞は、剥皮期では退行像を示さないかぎり卵核胞期であったが、繁殖期では一部の卵母細胞に減数分裂の再開が認められた。

48時間の成熟培養の結果、剥皮期においてTYHで12.0%、TCM 199で29.8%の成熟卵を得ることに成功した。一方、繁殖期ではTYHで25.8%、TCM 199で41.8%の卵母細胞が成熟し、繁殖期に回収した卵母細胞の方が高い成熟能を示した（P<0.05）。成熟培地としては、TYHよりもTCM 199の方がいずれの時期においても有効であった（P<0.05）。また、剥皮期に回収した卵母細胞の体外における中期IIへの移行速度は、繁殖期と同様に<sup>1)</sup>体内とほぼ一致することがうかがわれた。

非繁殖期のミンク卵巣は重量が軽く、エストラジオールやプロジェストロンの血漿濃度を見るかぎ

り卵巢活性は非常に低い<sup>4)</sup>。しかしながら、卵胞の形成は最小ながらも保たれており<sup>2)</sup>、グラーフ卵胞も観察される<sup>4)</sup>。今回、剥皮期に回収した卵母細胞が低率ながら中期IIに発達したことから、剥皮期に限らずとも非繁殖期卵巢で形成された卵母細胞も体外成熟能を有する可能性が示唆された。

これらのことから、剥皮期のミンク卵巢から回収した卵母細胞もTYHもしくはTCM 199で48時間培養することにより10~30%程度が中期IIまで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。本実験は、東京農業大学一般プロジェクト研究「ミンク卵子の体外受精と培養法の確立に関する研究」の一部として実施された。

Table 1 *In vitro* maturation of mink oocytes recovered at pelting.

Duration of culture	Season of recovery	Media	No. of oocytes examined	Stage of maturation*			Maturation rate (%)
				GV	MI~TI	MII	
0 hr	pelting		41	35		6	0
			75	67	2	6	0
48 hr	pelting	TYH	100	46	3	12	39
		199	47	8	7	14	18
	breeding	TYH	93	44	10	24	15
		199	134	53	17	56	8

\*GV: Germinal vesicle, MI~TI: Metaphase I ~ Telophase I, Met II: Metaphase II, Deg.: Degeneration.

#### 文献

- 1) 亀山祐一, 橋詰良一, 石島芳郎 (1992) : ミンク卵母細胞の回収および体外成熟. 哺乳卵学誌, 9, 1-6.
- 2) Kolpovskii, V. M. (1979) : Postnatal changes of uterus and ovaries in Mink *Mustela vison* (Carnivora, Mustelidae). Zool. Zh., 58, 409-418.
- 3) 野田 寛 (1989) : 毛皮動物. 畜産大辞典 (内藤元男監修) p1278-1283, 養賢堂, 東京.
- 4) Sundqvist, C., Amador, A. G. and Bartke, A. (1989) : Reproduction and fertility in the mink (*Mustela vison*). J. Reprod. Fert., 85, 413-441.

# 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  
評議員 若干名  
幹事 若干名

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

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

第11条 役員の選出は、次によって行う。

- (1) 会長および副会長は、理事の互選による。
- (2) 理事および監事は、理事会で推薦し、総会で決定する。
- (3) 評議員は理事会の推薦により、総会の議を経て選出される。
- (4) 幹事は、会員中より会長が委嘱する。

第12条 役員の任期は2年とし、再任を妨げない。

#### 第5章 会 議

(理事会)

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

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

(評議員会)

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

をもって出席とみなす。

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

(総会)

第15条 総会は毎年1回開催する。ただし、会長または理事の過半数が必要と認めたときは、臨時にこれを聞くことができる。

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

(学長選任)

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

(学術集会の運営)

第18条 学術講演会は学長が主催する。

第7章 会務

(会計)

第17条 本会の会計年度は、毎年4月1日に始まり翌年3月31日に終わる。

2. 本会の経費は会費、寄付金およびその他の収入をもってこれにあてる。

附 則

この会則は、学会への移行に伴い平成3年4月1日から施行する。

## 哺乳動物卵子学会役員

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（近畿大）	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（北里大）
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： 新村末雄（新潟大・農）

### 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（永遠幸マタニティー）	金山喜一（日大・農獣医）
北井啓勝（慶應大・医）	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（三菱化成生命研）	吉松宜弘（福島県立医大）

# 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投稿し、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150Words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, 日不妊会誌, 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 邦、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 神奈川県藤沢市龜井野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

## 学術国際貢献特別委員会設置される

平成4年5月 日本学術会議広報委員会

日本学術会議は、去る4月15日から17日まで第114回総会（第15期3回目の総会）を開催し、新たに「学術国際貢献特別委員会」を設置しました。今回の日本学術会議だよりでは、同総会の議事内容及び3月に開催されたAASSREC執行委員会等についてお知らせいたします。

### 旧ソ連邦の科学者に対する緊急の支援措置について（会長談話）

平成4年2月25日  
日本学術会議  
会長 近藤次郎

ソ連邦が解体したことに伴い、旧ソ連邦における多くの科学者は、研究の継続が困難となり、研究組織も崩壊の危機に直面していると伝えられており、これが事実とすれば、世界に与えるその影響は計り知れないものがあると思われる。

いうまでもなく、人類の進歩にとって科学の向上発展は不可欠のものであり、その意味で、今日の旧ソ連邦の実情は憂慮に堪えないところである。

この際、我々日本の科学者は、学協会等を通じる等の方法で、旧ソ連邦の科学者に対し、能う限りの支援を行う必要があると考える。

なお、旧ソ連邦の科学者と我が国の科学者との間の一般的な国際学術交流・協力をより一層充実するための方策等については、我が国の学術の分野における国際貢献の一環として、日本学術会議において引き続き検討することいたしたい。

#### （注）

本談話は、日本学術会議において国際交流・協力問題について調査・審議を行っている第6常置委員会から2月14日（金）の連合部会に問題提起され、各部会で検討され審議を経た後、2月25日（火）の第785回運営審議会に提案され審議されたものである。

### 日本学術会議第114回総会報告

日本学術会議第114回総会（第15期3回目の総会）は、4月15日～17日の3日間開催された。

第1日（4月15日）の午前。まず、会長からの前回総会以後の経過報告及び各部・各委員会等の報告が行われた。次いで、今回総会に提案されている2案件について、それぞれ提案説明がなされた後、質疑応答が行われた。

第1日の午後。各部会が開催され、午前中に提案説明された総会提案案件の審議が行われた。

第2日（4月16日）の午前。前日提案された案件の審議・採決が順次行われた。

まず、「副会長世話担当研究連絡委員会の運営について（申合せ）」の一部改正」が採択された。これは、「副会長世話担当研究連絡委員会運営協議会」という名称を「複合領域研究連絡委員会運営協議会」に改めるとともに、運営協議会のより円滑な運営を図るために、必要な措置を講じたものである。

次いで、「学術国際貢献特別委員会の設置について（申合せ）」が採択された。これは、学術の分野における我が国の国際貢献の在り方について検討するための特別委員会を設置したものである。

なお、審議・採決の終了後、さきに会長談話として発表した「旧ソ連邦の科学者に対する緊急の支援措置について（平成4年2月25日）」に関連して、旧ソ連邦の科学者の実情調査のために、当会議からロシアに派遣された第6常置委員会幹事の宅間会員から、その調査結果について報告が行われた。

第2日の午後。各部会が開催され、各部における懸案事項について審議が行われた。

第3日（4月17日）午前には、各常置委員会が、午後には、各特別委員会がそれぞれ開催された。

### 学術国際貢献特別委員会の設置

本会議は、昨年10月に開催した第113回総会における内閣官房長官からの学術の分野における我が国の国際貢献の在り方についての検討依頼を踏まえ、今回の第114回総会において学術国際貢献特別委員会を設置した。

## AASSREC執行委員会の開催

去る3月23日から26日にかけて4日間、AASSREC（Association of Asian Social Science Research Councils）執行委員会が日本学術会議の会議室で開催された。外国代表団は前AASSREC会長で現副会長のR・トリニダード教授（フィリピン社会科学協議会）、同じく副会長代行のJ・J・スモリッツ教授（オーストラリア社会科学アカデミー）、AASSREC事務局長のD・N・ダナガーレ教授（インド社会科学研究協議会）、同じく事務幹事のV・K・メータ博士（同上）のAASSREC側4理事と、タイ国バンコック駐在のUNESCO人間社会科学地域アドバイザーのY・アタール博士の5名。

日本側は、現AASSREC会長の川田侃日本学術会議副会長のほか、来年9月に川崎市のKSP（神奈川サイエンス・パーク）で日本学術会議が共催して開く予定の「AASSREC第10回日本総会」の組織運営委員会委員長山田辰雄教授（慶應義塾大学、アジア政経学会理事長）、同事務局長・平野健一郎教授（東京大学、アジア政経学会前理事長）、及び日本学術会議AASSREC専門委員会幹事浦田賢治会員（第2部）の3名がオブザーバーの資格で参加、連日、時間を措しむかのように、AASSRECの運営や来たるべき第10回総会の打合せなどについて、熱心な討議が続けられた。

また討議の合間を縫うようにして、外国代表団は近藤次郎日本学術会議会長表敬訪問、日本学術会議運営審議会における挨拶などのほか、川崎市にも赴き市長表敬訪問、KSP視察などを精力的に行った。日本学術会議も、近藤会長主宰のレセプションを催し、関係諸国の東京駐在大使館スタッフなどを招いて、アジア・太平洋地域における学術交流と発展のための意見交換の場を設け、友好的な雰囲気のなかで談論が風発、至るところで談笑の花が開いた。

AASSRECはアジア・太平洋地域の社会科学領域における国際学術上部組織で、いわゆるアンブレラ・オーガニゼイションである。1973年にインドのシムラで「社会科学の教育・研究に関するアジア会議」が開かれた際に設立が合意され、それ以来UNESCOの協力のもとに発展を遂げてきた。AASSRECは加盟各国それぞれの文化的伝統を尊重しつつ、社会科学の研究、教育、知識の普及などを促進することを通して、この地域における社会科学の発達を図ることを目的に、加盟諸国の人間社会科学協議会、またはこれに類する団体（1国1会員）により構成されている。

加盟国はオーストラリア、インド、中国、ニュージーランド、フィリピンなど、1991年8月現在、15カ国であるが、国（くに）会員のほかに、準会員の制度もあり、将来この地域の各国の学協会や研究所等が準会員としてAASSRECの活動に参加する道も開かれている。出版活動としては、隔年に開催される総会における諸報告やシンポジウムなどの出版のほか、定期刊行物「aassrec panorama」が年2回出されている。

AASSRECには最高決定機関である総会のほかに、会長、副会長（2名制）、事務局長の4名で構成される理事会が置かれているが、これにさらにUNESCOの地域アドバイザーが加わって開かれる執行委員会に事実上の運営権限があるようみえる。今回、日本学術会議で開かれた会議はAASSRECとしては極めて重要な会議であったといえる。AASSRECはUNESCOによって承認された「非政府機関（NGO）」の地位をもち、絶えずUNESCOと緊密な関係を保っているが、同じくUNESCOによって承認されたNGOの地位をもつIFSSO（国際社会科学団体連盟）とも相互協力関係にある。

## 平成4年（1992年）度共同主催国際会議

日本学術会議では、我が国において開催される学術関係国際会議のうち毎年おおむね6件について、学・協会と共同主催している。

本年もまた、6件の国際会議を共同主催することとしており、その概要は、次のとおりである。

### ◆第5回世界臨床薬理学会議（7月26日～31日）

この会議は、臨床薬理学に関する研究を発展させるため討論を行い、最新の研究情報を交換することを目的として横浜市（横浜国際平和会議場）において開催される。

参加予定人数は3,000人（国外1,500人、国内1,500人）、参加予定国数は49か国。

### ◆第14回国際平和研究学会総会（7月27日～31日）

この会議は、平和学に関する研究を発展させるため討論を行い、最新の研究情報を交換することを目的として京都市（国立京都国際会館及び立命館大学）において開催される。

参加予定人数は450人（国外250人、国内200人）、参加予定国数は45か国。

### ◆第8回国際バイオレオロジー会議（8月3日～8日）

この会議は、バイオレオロジー学に関する研究を発展させるため討論を行い、最新の研究情報を交換することを目的として横浜市（横浜国際平和会議場）において開催される。

参加予定人数は500人（国外150人、国内350人）、参加予定国数は26か国。

### ◆国際地質科学連合評議会及び第29回国際地質学会議（8月24日～9月3日）

国際地質科学連合評議会は、同連合の最高決定機関であり、運営事項を協議、決定することを目的とするものである。また、国際地質学会議は、地質学に関する研究を発展させるため討論を行い、最新の研究情報を交換することを目的として京都市（国立京都国際会館）において開催される。

参加予定人数は5,300人（国外3,200人、国内2,100人）、参加予定国数は94か国。

### ◆第9回国際光合成会議（8月30日～9月5日）

この会議は、光合成に関する研究を発展させるため討論を行い、最新の研究情報を交換することを目的として名古屋市（名古屋国際会議場）において開催される。

参加予定人数は1,000人（国外500人、国内500人）、参加予定国数は41か国。

### ◆第11回国際光生物学会議（9月7日～12日）

この会議は、光生物学に関する研究を発展させるため討論を行い、最新の研究情報を交換することを目的として京都市（国立京都国際会館）において開催される。

参加予定人数は1,000人（国外600人、国内400人）、参加予定国数は52か国。

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

## — 共同主催国際会議閣議了解得る —

平成4年9月 日本学術会議広報委員会

平成5年度の日本学術会議の共同主催国際会議6件については、平成3年5月の第111回総会において決定されましたが、政府としても、本年6月30日の閣議において、これらの会議を日本で開催すること及び所要の措置を講ずることを了解しましたので、お知らせします。

### 平成5年度の共同主催国際会議の閣議了解

1. 日本学術会議では、昭和28年9月の国際理論物理学会議、昭和30年の国際数学会議の開催以来、平成3年度までに123件、本年度も6件の国際会議を関係の学会と共同して開催し、我が國のみならず世界の学術水準の向上に努めてきたところである。平成5年度にも、下記の6会議の共同開催を既に平成3年5月に決めているが、本年6月30日、政府全体としても、これらの会議の開催とこれについての所要の措置（会場・警備・入国手続き上の配慮・予算措置等）を講ずる旨の閣議了解を行った。

（平成5年度開催会議）

- ・アジア社会科学研究協議会連盟第10回総会  
平成5年9月5日から11日（川崎市・かながわサイエンスパーク）
- ・第15回国際植物科学会議  
平成5年8月23日から9月3日（横浜市・横浜国際平和会議場）
- ・第7回太平洋学術中間会議  
平成5年6月27日から7月3日（沖縄県宜野湾市・沖縄コンベンションセンター）
- ・第24回国際電波科学連合総会  
平成5年8月23日から9月3日（京都市・国立京都国際会館）
- ・第21回国際純粋・応用物理学連合総会  
平成5年9月20日から25日（奈良県奈良市・奈良県新公会堂）
- ・第6回国際気象学大気物理学協会科学会議及び第4回国際水文科学協会科学会議合同国際会議  
平成5年7月11日から23日（横浜市・横浜国際平和会議場）

（閣議了解の内容）

〔各国际会議ごとに了解〕

1. (各会議名)を(共同主催学会名)と共同して平成5年度に我が国において開催すること。
  2. 関係行政機関は、上記会議の開催について所要の措置を講ずること。
2. なお、国際会議共同主催の申請から決定までのスケジュールはおおむね次のようにになっている。
- ・会議開催3年前(年末まで)申請募集
  - ・会議開催2年前  
(2~3月頃)  
関係部会、運営審議会附置国際会議主催等検討委員会でのヒアリング等

（3~4月頃）

運営審議会での決定、総会への報告  
・会議開催1年前  
(6~7月頃)

閣議了解（政府としての共同主催正式決定）  
共同主催学会との合意書締結、組織委員会の発足  
現在本年年末締切りの平成7年度共同開催会議の募集を広報しているところである。（詳細は、日本学術会議月報をご覧下さい。）

### 日本学術会議主催公開講演会

本会議では、毎年公開講演会を開催しています。この講演会は会員が講師となり、一つのテーマを学際的に展開しています。この秋には二つの講演会の開催が決まりましたので、お知らせします。多数の方々のご来場をお願いします。入場は無料です。

I 「公開講演会「20世紀の意味と21世紀への展望」

日時 平成4年10月5日（月）13:30~16:30

会場 日本学術会議講堂

演題・演者

「国際政治の観点からー『長い平和』は持続可能か」  
永井陽之助 第2部会員  
(青山学院大学教授)

「文明論的観点から」 弓削達 第1部会員  
(フェリス女学院大学学長)

「科学・技術の観点から」 伊達宗行 第4部会員  
(大阪大学理学部長)

II 「公開講演会「医学からみた日本の将来」

日時 平成4年11月28日（土）13:30~16:30

会場 金沢市文化ホール 大集会室

金沢市高岡町15-1 TEL 0762-23-1221

演題・演者

「子どもたち」 馬場一雄 第7部会員  
(日本大学名誉教授)

「成人病」 五島雄一郎 第7部会員  
(東海大学教授)

「医療技術の開発」 涩美和彦 第7部会員  
(東京大学名誉教授)

「食物と栄養」 内藤博 第6部会員  
(共立女子大学教授)

「医療制度の将来」 下山瑛二 第2部会員  
(大東文化大学教授)

## **物理学研究連絡委員会報告 「物理学研究の動向と将来への課題」**

7月24日の運営審議会において標記の報告の公表が承認された。1970年代から1980年代にわたって、日本の物理学の研究動向、研究環境を、かなり厳しい批判的スタンスで蒐集した客観的データに基づいて分析し、1990年代における日本の物理学の課題を展望しようとする野心的な報告である。日本の物理学研究・教育の将来を論ずるための不可欠の資料といえる。A4版112ページにまとめられており、日本物理学会の協力を得て、同学会会誌別刷の形で関係者に公開される予定である。

本報告は、もともと第14期物理学研究連絡委員会が、久保亮五委員長の提案に基づいて「物理学の研究・教育に関する調査小委員会」（委員長長岡洋介京大基研所長、幹事中井浩二高エネ研教授、委員小林俊一東大理、鈴木洋上智大理I、玉垣良三京大理、平田邦男山梨大教育、小沼通二慶大理の各教授）を設置してデータの蒐集・分析・要約を1990年7月から1991年5月にわたって精力的に行い、1990年6月20日の物理学研究連絡委員会全体会議に提出されたものである。第14期物研連任期終了に伴い、報告書及び今後の進め方についての取扱いを次期物研連への引継事項とした。これを受け、第15期物理学研究連絡委員会は1992年5月22日の全体会議において本報告の取扱いについて協議し、公表を決定して中嶋貞雄委員長を通じて7月7日の第4部会の了承を求め、運営委員会に提案することとなつた次第である。

本報告書が、日本の物理学の研究・教育に関心を寄せる多方面で活用されることを期待したい。

## **物理学研究連絡委員会報告 「理論物理学の研究体制の充実について」**

7月24日運営審議会において標記の報告の公表が承認された。湯川秀樹博士のノーベル賞受賞にちなんで初の全国共同利用研究所として設置された京都大学基礎物理学研究所と一般相対論のユニークな研究で知られる広島大学理論物理学研究所は、1990年に統合され、内外の期待を集めつつ、理論物理学の総合的研究を目指す拡充・強化された基礎物理学研究所として再発足することとなった。しかし、現実には分野間の均衡が十分でなく、また北白川と宇治に建物が分離されている等、統合の実を十分に挙げ得ない現況である。

1992年5月22日の物研連全体会議は、このような状況の改善が速やかに改善され、理論物理学における日本の輝かしい伝統が復活されるよう、関係各方面に報告、支援を要請することとなつた。

## **材料工学研究連絡委員会報告 「繊維工学研究・教育に関する諸問題」 「産・学協力による繊維工学研究と教育の振興」**

わが国の繊維産業はかつて、日本を支える大産業であった。石油危機、貿易摩擦などによって低迷を余儀なくされた時期もあったが、今日では先端産業の要素技術ともなっ

て、その据野を拡大し、また新合織に象徴されるような高度機能商品を開発し、日本は世界のトップレベルを行く繊維技術国となった。現在繊維産業の従業員数は280万人、総取引額は約64兆円に達し、日本産業の中でも上位を占める基幹産業となっている。

この繊維産業を支える繊維科学技術教育を見ると、かつて国立大学には3つの繊維学部と、染色化学・加工学を含めて19の繊維関連学科があったが、産業構造の変化と共に改組転換されて、今日では繊維系学生の定員50人と激減するに至っている。大学院教育では、繊維学研究科の名称は一時期全廃された。その後、産・学の強い要望によって、平成3年に信州大学工学研究科に、繊維生物機能科学、繊維機能工学、繊維極限材料工学の3大講座が唯一設置されるに至った。

ところが、繊維産業の将来は、世界人口の増加、発展途上国の1人当たりの繊維消費量の増加から、繊維需要は膨大な成長力を秘めている。さらに、消費者主導型経済社会となって、ファッションにも、色、柄、デザインに加えて高機能性と加工技術が重要となってきている。また、繊維素材から最終商品までをシステム化した生産・物流技術、産業資材用途の拡大、地球環境改善への用途開発への期待高性能スーパー繊維による航空・宇宙、海洋、原子力、土木・建築分野への貢献、光ファイバーによる情報通信分野、中空糸による人工腎臓、酸素濃縮などヘルスケア分野、海水脱塩造水など先端分野でも重要な産業として自立しつつある。

こうした繊維産業発展の基礎となる高度技術の開発を促進し、その力を次世代へと継承させるためには、高度に訓練・教育された人材の育成が不可欠である。我が国にとって、繊維科学技術の研究・教育機構の再構築は焦眉の急となっている。これに対して、欧州ではE.C.統合を控え、各国の特徴に応じ産学協力し、繊維系大学の単位互換制度を指向するなど、繊維技術教育の再活性化に成功している。米国では繊維関連大学が十数校もあり、その中でノースカロライナ州立大学を繊維科学技術教育のセンターとして、ニューヨーク州立ファッション工科大学をアパレル・ファッション教育のセンターとして位置付けて、全世界へ人材を送り出している。

我が国で、産学協力して設立する機構としては、全国繊維連大学、研究所、及び地域産業を結ぶ役割を持ち、我が国の優れた繊維工学知識の世界への発信と、国際的人材育成への寄与のため、欧州、米国と並ぶ、東アジアの繊維科学・技術の中心機構として活動することが望まれる。

この活動は、我が国に全世界の人々から期待されている国際貢献の一つとなろう。

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

今秋は急に秋が到来した感じがあり、また、冬の寒さも例年なみであるとの予報であります。会員の皆様にはお変わりなく研究活動に邁進されていることと存じます。会誌第9巻2号をお届けいたします。早いもので会誌を発刊するようになります。来年で10年目を迎えるとしております。この間年2回の発刊であります。が帶ることもなく発刊できましたことは会員の皆様方のご協力によるものと感謝しております。本会誌への投稿論文も増え9巻2号には原著論文6編と短報1編を掲載することとなりました。是非一読下さいます。なお、現在第10巻の掲載論文を受け付けておりますので投稿下さいます。

(遠藤 克)

## 編集委員

委員長：石島芳郎

委員：井上正人、遠藤克、岡田詔子、小栗紀彦

久保春海、香山浩二、星和彦、横山峯介

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

第9巻 第2号

Vol. 9

NO.2

平成4年9月25日 印刷

(会員頒布)

発行者 哺乳動物卵子学会  
代表 豊田裕

発行所 哺乳動物卵子学会  
〒252 藤沢市龜井野1866  
日本大学農獣医学部獣医生理学教室  
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)

第7回「大学と科学」公開シンポジウム  
『生殖系列—親から子への生命の流れ』

—開催のお知らせ—

日 時：平成5年2月17日(水)・18日(木)  
会 場：有楽町朝日ホール(千代田区有楽町2-5-1)  
主 催：第7回「大学と科学」公開シンポジウム組織委員会  
後 援：文部省／日本組織培養学会  
参加費：無 料

17日(水)

総合講演：連続する生命—生殖と生殖系列一 毛利秀雄  
特別講演：動物の生殖行動における利己と協同 日高敏隆  
♂と♀ 高橋迪雄、中込弥男、安部真一、岸本健雄  
卵と精子の出会い 星 元紀、片桐千明、星 和彦、豊田 裕

18日(木)

親と子のきずなの始まり 館 郷、森 崇英、村松 喬、森 庸厚  
生殖のバイオテクノロジー 岩倉洋一郎、入谷 明、帯刀益夫、野口基子

申込方法：聴講ご希望の方は葉書に、①氏名、②住所(勤務先か自宅かを明記)、  
電話番号、③参加日時、④職業(勤務先)、をご記入の上、事務局宛  
に送付願います。聴講希望者が多数の場合は抽選となります。

申込先：〒102 千代田区富士見2-3-1信幸ビル  
グバプロ内『生殖系列』事務局  
TEL03-3238-1689 FAX03-3238-1837

参加申込締切：平成5年2月10日(水)

## 賛助会員

株式会社 イワケン 横浜営業所	セローノ・ジャパン 株式会社
富士平工業株式会社 涉外部	プリマハム株式会社 新規事業推進部

# 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 ブヘローケン®**  
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 ギナントール®**

日本薬局方 プログステロン注射液

**動物専用 ルテオーケン®**

ご使用の際は、添付文書の用法・用量、使用上の注意等をご覧ください。



販売元 **三共株式会社**  
東京都中央区銀座2-7-12

動物用医薬品 V.A.D.E.配合  
胎盤性性腺刺激ホルモン

**油性動物用 ブヘローケン®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<sup>三共</sup>**

動物用医薬品 受胎向上・EP複合注射液

**ルテオーケン®E**



製造元 **三共ゾーキ株式会社**  
東京都品川区広町1-4-4

健保適用

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

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



## 【効能・効果】

間脳性（視床下部性）無月経、下垂体性無月経の排卵誘発

## 【用法・用量】

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

## 【包装】

パーゴナル注 75：10管  
パーゴナル注150：10管



帝国臓器製薬株式会社  
東京都港区赤坂二丁目5番1号

## 【使用上の注意】

1. 一般的注意
  - 1) 本療法の対象は不妊症患者のうちの、間脳又は下垂体前葉の機能・器質的障害に由来する性腺刺激ホルモン低分泌無月経患者であるので次の点に注意すること。
    - ア. エストロゲン・プロゲステロンテストで初めて反応する第2度無月経又は抗エストロゲン療法（クエン酸クロミフェン、シクロフェニル等）が奏効しない第1度無月経の患者に投与すること。
    - イ. 患者の状態（例えばエストロゲン・性腺刺激ホルモン・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、下腹部痛、下腹部緊迫感、腹水・胸水を伴ういわゆる、Meigs様症候群等があらわれた場合には、直ちに投与を中止するなど、適切な処置を行うこと。
    - 2) その他 ときに恶心、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。

# 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

■牛乳中プロゲステロン定性測定キット

**オブ"チェックカウサイド"・W**

《体外診断用》

## ■特長

- 目で見て判定できるので、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、採材しやすい牛乳(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

新発売



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。

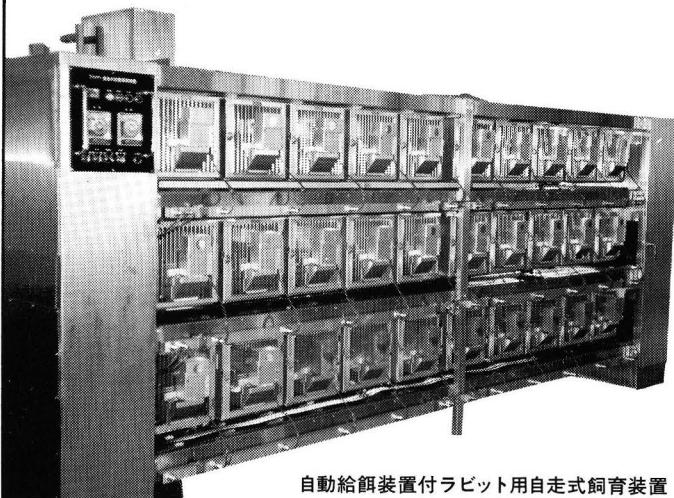
製造元 ケンブリッジ ベテリナリサイエンス社  
Cambridge Veterinary Sciences  
a division of Cambridge Life Sciences plc

輸入発売元

**テニカ製薬株式会社**  
神奈川県川崎市川崎区中瀬3丁目19番11号 〒210

## 給餌の自動化を実現いたしました!!

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

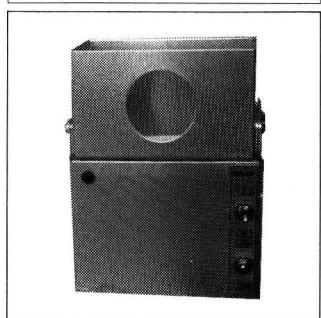


自動給餌装置付ラビット用自走式飼育装置

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

## 自動給餌装置

RF-OI ラビット用



## 特徴

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



岡崎産業株式会社

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

