



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                   |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | ウシの体外受精における精子処理法と体外受精由来の初期胚の体外培養法に関する研究                                           |
| Author(s)           | 青柳, 敬人                                                                            |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                             |
| Degree Name         | 博士(獣医学)                                                                           |
| Dissertation Number | 乙第4008号                                                                           |
| Issue Date          | 1991-12-25                                                                        |
| DOI                 | <a href="https://doi.org/10.11501/3058656">https://doi.org/10.11501/3058656</a>   |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/49746">https://hdl.handle.net/2115/49746</a> |
| Type                | doctoral thesis                                                                   |
| File Information    | 000000245525.pdf                                                                  |





ウシの体外受精における精子処理法  
と体外受精由来の初期胚の  
体外培養法に関する研究

青 柳 敬 人



ウシの体外受精における精子処理法と体外受精由来の  
初期胚の体外培養法に関する研究



## 目次

|       |                                           |       |     |
|-------|-------------------------------------------|-------|-----|
| 第 1 章 | 緒 論                                       | ----- | 1   |
| 第 2 章 | ウシ精子処理法におけるカフェインとイオノホアの併用が<br>体外受精におよぼす影響 |       |     |
|       | 緒 言                                       | ----- | 3   |
|       | 材 料 と 方 法                                 | ----- | 4   |
|       | 成 績                                       | ----- | 1 4 |
|       | 考 察                                       | ----- | 2 0 |
|       | 要 約                                       | ----- | 2 1 |
| 第 3 章 | 種雄牛の個体差が体外受精およびその後の胚発生<br>におよぼす影響         |       |     |
|       | 緒 言                                       | ----- | 2 3 |
|       | 材 料 と 方 法                                 | ----- | 2 4 |
|       | 成 績                                       | ----- | 2 7 |
|       | 考 察                                       | ----- | 3 2 |
|       | 要 約                                       | ----- | 3 4 |



第4章 体外受精由来胚の体外培養とくに共培養に関する検討

|       |       |    |
|-------|-------|----|
| 緒言    | ----- | 36 |
| 材料と方法 | ----- | 37 |
| 成績    | ----- | 45 |
| 考察    | ----- | 49 |
| 要約    | ----- | 51 |

|        |       |    |
|--------|-------|----|
| 第5章 総括 | ----- | 53 |
|--------|-------|----|

|    |       |    |
|----|-------|----|
| 謝辞 | ----- | 56 |
|----|-------|----|

|      |       |    |
|------|-------|----|
| 英文要約 | ----- | 57 |
|------|-------|----|

|      |       |    |
|------|-------|----|
| 参考文献 | ----- | 60 |
|------|-------|----|



## 第1章 緒論

家畜における人工授精の研究は20世紀初頭に始まり各国で多くの研究がなされ、雄側からの遺伝的な改良が大きく進歩した。また、雌側からの遺伝的改良を目的とした胚移植は1891年にHeapeがウサギにおいて産子を得て以来、ラット (Nicholas, 1933)、ヤギ (Warwick et al., 1935)、ウシ (Willett et al., 1951)、ブタ (Kvansnickii, 1951)、ウマ (Oguri and Tsutsumi, 1974) などで報告がみられ、現在ではとくにウシの改良と増殖を目的として本邦でも広く活用されるようになった。

一方、哺乳動物の受精現象の解明に関する研究はChang (1951) およびAustin (1951) の精子の受精能獲得の発見に始まり、Chang (1951) はウサギの精子が射出直後と受精直前では生理的に異なることを明かにした。また、Chang (1957) は精漿中の因子が受精能獲得精子を失活させることを報告し、さらに、Austin and Bishop (1958) はゲッ歯類の精子において受精前の形態的変化である精子先体反応を発見した。同時期に哺乳動物における体外受精の研究 (Dauzier et al., 1954; Dauzier and Thibault, 1956) が始まり、Chang (1959) は、ウサギで交尾後の子宮内精子と排卵卵子を用いて体外受精を行い、受精後の卵割胚を移植して産子を得ることに成功した。その後、精子の受精能獲得を体外での合成培地内で行う報告が相次いだ。それらはハムスター (Yanagimachi and Chang, 1963)、マウス (Iwamatsu and Chang, 1969)、モルモット (Yanagimachi, 1972)、ラット (Toyoda and Chang, 1974)、ウシ (Brackett



et al., 1982) などの動物種で行われた。これらの体外受精による産子は体内成熟卵子由来のものであり、とくに、ウシなどの家畜においては、外科手術を用いる体内成熟卵子の回収の煩雑さや、卵子数の制限などから実用性に乏しい一面があった。また、Sirard and Lambert (1986) も内視鏡を用いて体内成熟卵子を吸引採取して、体外受精を行い、ウサギ卵管内で培養後、受卵牛への非外科的な移植によって産子を得ている。一方、体外成熟卵子を用いた体外受精に関する研究において、花田ら (1986)、Crister et al. (1986) らは体外成熟卵子を用いて、体外受精を行い、その後の卵割胚を、ウサギ卵管内あるいはヒツジ卵管内で体内培養後、非外科的に受卵牛に移植し産子を得ることに成功した。

その後、急激に体外受精技術が進展し、体外受精由来胚の培養系についての検討がヒツジ (Gandolfi and Moor, 1987) やウシ (梶原ら、1987、Fukuda et al., 1989) で行われ、異種動物の卵管内培養を行わずに、卵管上皮細胞や卵丘細胞との共培養によって、体外でも胚盤胞まで発育することが確認されるまでにいたった。

しかしながら、ウシ卵子の体外成熟、体外受精およびその後の培養に関する知見は充分とは言えず、体外受精による安定的な胚盤胞の生産技術を確立する目的で、本研究では凍結融解精子の精子処理方法と種雄牛の個体差が体外受精におよぼす影響ならびに体外受精由来胚の体外培養系に関する検討を行った。



## 第2章 ウシ精子処理法におけるカフェインとイオノホアの併用が体外受精におよぼす影響

### 緒言

Brackett et al. (1982) は哺乳動物の体外受精の成否は精子の適確な受精能獲得にあると述べている。精子の受精能獲得処理は同種あるいは異種の生殖器内での前培養 (Iritani and Niwa, 1977) に始まり、高イオン濃度の培養液による感作 (Brackett et al., 1980)、Ca イオノホアの処理 (花田, 1985) およびムコ多糖類を含む培地内での前培養 (Parrish et al., 1985b) などが報告され、比較的再現性の高い方法が採られるようになった。しかし、これらの精子処理で体外受精を行った場合、精子が十分に受精能を獲得しているかどうか、およびその後の卵割率や桑実胚への発育については不明な点が少なくない。

以上のことから、本章ではウシ体外成熟卵子を用いて、ウシ凍結精子処理におけるカフェインとイオノホアの併用が体外受精成績、とくに受精率、卵割率およびウサギ卵管内での桑実胚への発育率におよぼす影響について検討した。



## 材料と方法

### 卵子処理

十勝畜産公社で採取したウシ卵巢を、約38℃のペニシリンG (100 IU/ml) および硫酸ストレプトマイシン (100  $\mu$ g/ml) を含む生理食塩水 (8.5 g NaCl/l) に浸漬して、3時間以内に実験室に持ち帰った。生理食塩水で卵巢を洗浄後、血液を濾紙でよく拭き取り、直径2~5 mmの卵胞を10 mlの注射器に接続した18 Gの注射針で刺し、未成熟卵子を卵胞液とともに吸引採取した。リン酸緩衝液 (phosphate buffered saline, PBS: Table 1) に10%の割合でウシ非働化胎子血清 (fetal calf serum, FCS: Gibco Lab.) を加えた液で吸引した卵胞液を時計皿または35 mmのプラスチックシャーレ (1008, Falcon) 内で数倍に希釈し、Leibfried and First (1979) の基準に従って、卵細胞質が均一で、緊密な卵丘細胞に囲まれている卵子を培養に供した (Figure 1)。卵巢は主にホルスタイン種から採取されたが、各個体の年齢、体重および産歴は不明であった。

卵子の培養には、TCM-199液 (Gibco Lab.) に10% FCS、25 mM N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid] (HEPES, Sigma)、ペニシリンG (100 IU/ml)、硫酸ストレプトマイシン (100  $\mu$ g/ml)、1  $\mu$ g/mlの卵胞刺激ホルモン (follicle stimulating hormone, FSH: FSH-P, Burns Biotech Lab.)、10  $\mu$ g/mlの黄体形成ホルモン (luteinizing hormone, LH: P-LH, Burns Biotech Lab.) および1  $\mu$ g/mlのエストラジオール17 $\beta$  (E<sub>2</sub>, オバホルモン,

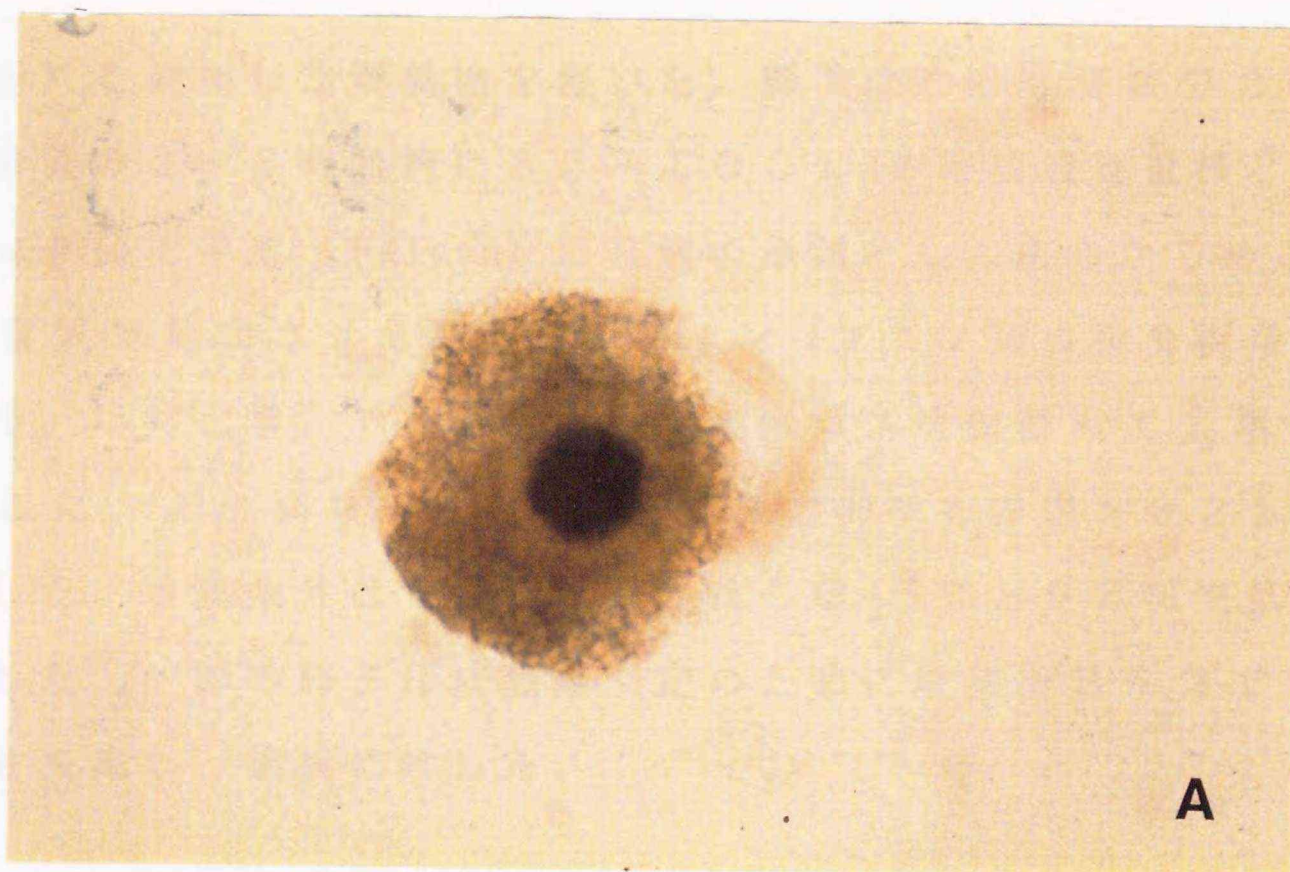


Table 1. Components of PBS in aqua dist.

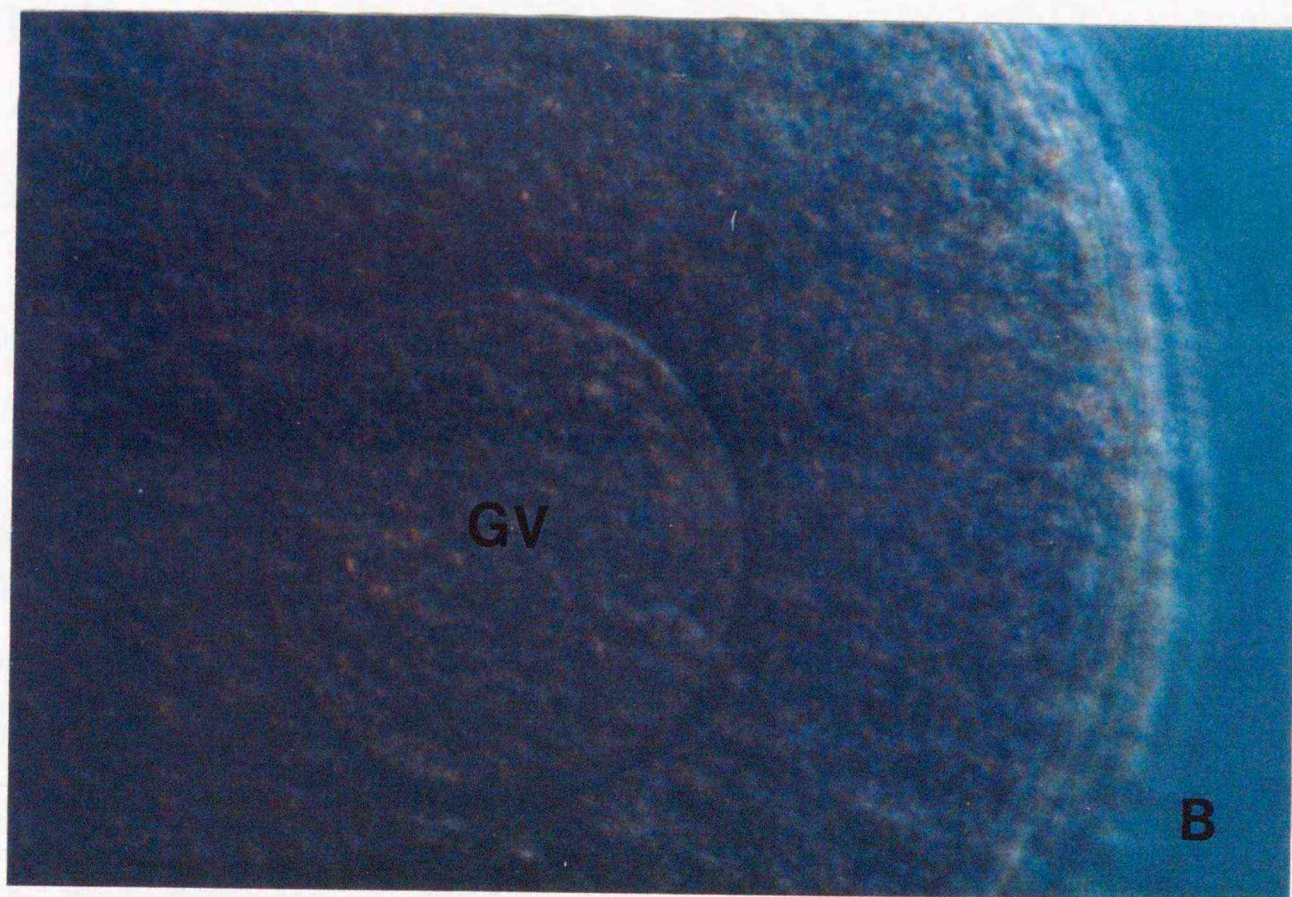
|                |                                      |          |
|----------------|--------------------------------------|----------|
| A <sup>*</sup> | NaCl                                 | 136.9 mM |
|                | KCl                                  | 2.7 mM   |
|                | NaHPO <sub>4</sub>                   | 7.4 mM   |
|                | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>     | 1.4 mM   |
| B              | CaCl <sub>2</sub>                    | 0.9 mM   |
|                | MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O | 0.5 mM   |
|                | Glucose                              | 5.6 mM   |
|                | Na-Pyruvate                          | 0.3 mM   |

\*A=PBS(-)





A



B

Figure 1.

- A) Follicular oocyte with compact cumulus cells(x 100).
- B) Follicular oocyte with germinal vesicle(GV) before in vitro maturation(x 1000).



帝国臓器)を添加した培養液を用いた。卵子はこの培養液で3回洗浄した後、培養の2～6時間前に80～100  $\mu$ lの培養液を直径35 mmのプラスチック製培養皿(Falcon)に5個の小滴とし、あらかじめ5%  $\text{CO}_2$ を含む空気で飽和させた流動パラフィン(アミノ酸自動分析用パラフィンオイル、半井化学)で上面を覆い、炭酸ガス培養器内で気相平衡させた培養皿に、1小滴あたり10～15個の卵子を浮遊させ22～24時間培養した。培養条件は38℃、気相は $\text{CO}_2$ 5%と95%空気で、飽和湿度とした。一部の卵子は成熟率判定のために培養後8～32時間で、固定染色を施し、鏡検に供した。

#### 精子処理

精子の処理は花田(1985)の方法に準じて行った。ホルスタイン種およびアバーデインアンガス種、各々1頭の種雄牛から人工腔にて採取した射出精液は卵黄クエン酸糖液(10%グリセリン)を用いて、0.5 ml ストローあたり $5 \times 10^7$ 個の精子濃度で凍結保存された。実験時に凍結精液を温湯(37℃)融解して、3本をプールし、5 mlの10 mMカフェインを含む合成塩類溶液(Brackett and Oliphant, 1975:BO液、Table 2)で精液を希釈し、2回遠沈洗浄(450 gで5分間)し、精漿および卵黄クエン酸糖液を除去した。精子濃度が $7 \times 10^7$ /mlになるように10 mMカフェインを含むBO液で精子を再浮遊させ、精子を以下の2区で処理した。カフェイン区は再浮遊液を2%ウシ血清アルブミン(bovine serum albumin, BSA:Fraction V, Sigma)を含むBO液で2倍に希釈し、直径35 mmの培養皿(1008, Falcon)に80～100  $\mu$ lのパラフィンオイル下の小滴とし、炭酸ガス培養器(38℃、5%  $\text{CO}_2$ と95%空気、飽和湿度)内で4時間の前



Table 2. Components of BO medium\*  
in aqua dist.

|                                                   |             |
|---------------------------------------------------|-------------|
| NaCl                                              | 147.47 mM   |
| KCl                                               | 5.30 mM     |
| CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O               | 2.95 mM     |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O | 1.22 mM     |
| MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O               | 0.69 mM     |
| NaHCO <sub>3</sub>                                | 61.60 mM    |
| Glucose                                           | 13.88 mM    |
| Na-Pyruvate                                       | 1.25 mM     |
| Phenol Red                                        | 0.0002μg/ml |
| Penicillin                                        | 100IU/ml    |
| Streptomycine                                     | 100μg/ml    |

\* Brackett and Oliphant(1975)  
medium without 3mg/ml BSA.



培養を行った。一方、カフェインとイオノホアの併用区はイオノホア (Ca-Ionophore A23187 free acid, Sigma) を高橋と花田 (1984) の報告にしたがって、エタノールとDMSO (3:1) で溶解希釈し2 mM 濃度の保存液を作成し、 $-20^{\circ}\text{C}$ で遮光、保存した。このイオノホア保存液は実験使用直前に超純水を用いて50倍に希釈し、 $0.1\ \mu\text{M}$  濃度になるように精子浮遊液に添加した。イオノホアを添加してから、30秒後に2% BSAを含むBO液を加えて精子浮遊液を2倍に希釈し、イオノホア的作用を抑制させた。処理精液は80~100  $\mu\text{l}$  のパラフィンオイル下の小滴とし、2~3時間前培養された。培養条件は $38^{\circ}\text{C}$ 、気相は $\text{CO}_2$  5%、空気95%で、飽和湿度とした。

#### 体外受精

体外成熟培養後の卵子は、あらかじめ気相平衡したパラフィンオイル下の2% BSA-BO液で3回洗浄した。その後、成熟培養卵子は無差別に2区に分け、実験に供した。前培養された精子浮遊液 (精子数  $3 \times 10^7 / \text{ml}$ ) の小滴に膨潤化した卵丘細胞群 (Figure 2) とともに卵子を10~15個ずつ注入し、カフェイン区は5時間、カフェインとイオノホアの併用区は4時間培養された。培養条件は $38^{\circ}\text{C}$ 、気相は $\text{CO}_2$  5%、空気95%で、飽和湿度とした。

#### 受精後の卵子の体外培養

TCM-199に10% FCS、25 mM HEPES、硫酸ストレプトマイシン100  $\mu\text{g} / \text{ml}$ 、およびペニシリンG 100 IU / mlを含むパラフィンオイル下の培地内で体外受精した卵子は3回洗浄した。さらに、パラフィンオイル下の小滴 (80~100  $\mu\text{l}$ ) に10~15個ずつ洗浄卵子を入れ、43~44時間培養された。培養条件は $38^{\circ}\text{C}$ 、



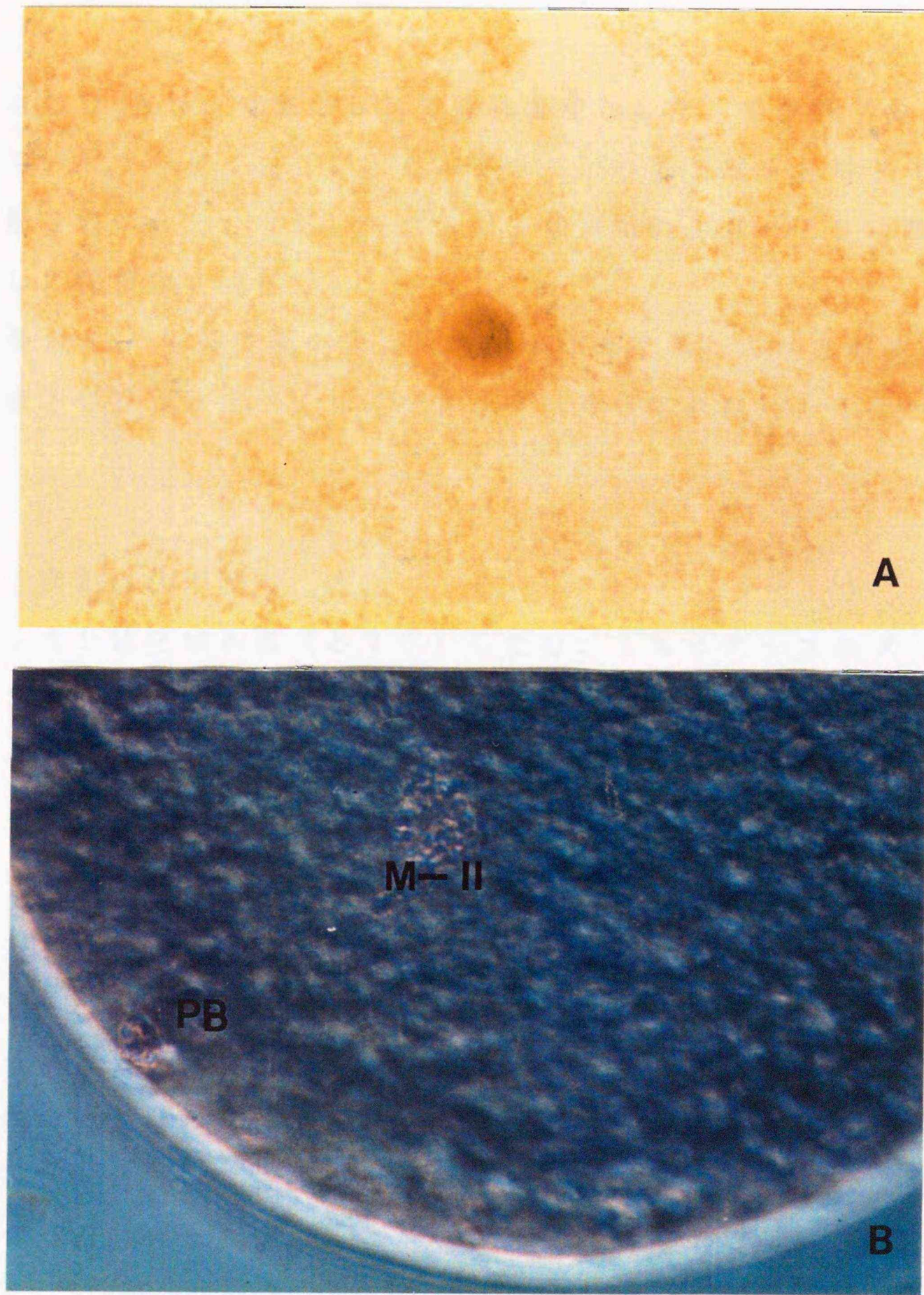


Figure 2.

- A) Follicular oocyte with dispersed cumulus cells cultured in a maturation medium for 22 h(x 100).
- B) An oocyte with metaphase-II plate(M-II) of chromosome and first polar body(PB, x 1000).



気相はCO<sub>2</sub>5%、空気95%で飽和湿度とした。培養終了後、実体顕微鏡下で、ピペティングにより、できる限り卵丘細胞を除去して、卵割の状態を観察した。なお、一部の卵子は媒精後16～18時間目に固定、染色して受精率を調べた。

体外成熟、体外受精および受精後の体外培養における卵子または胚の顕微鏡下の操作はすべて加温プレート（38℃設定）上で行った。

#### 卵子または胚の固定、染色

卵子または胚は加温（37℃）した0.1%ヒアルロニダーゼを含むPBS（-）（Table 1）中で振盪され、卵丘細胞が除去された。これら卵子は4隅にワセリンとパラフィンで配したスライドグラスに置き、カバーグラスで軽く圧した。その後、25%アセトエタノールで24～72時間固定した。固定後卵子を0.5%アセトオルセインで1～3分間染色後アセトグリセロールで透徹し、位相差顕微鏡（x400～1000）で観察した。

体外成熟卵子は成熟の過程を調べ、体外受精後の受精の判定は、卵細胞質内の精子侵入（精子頭部の膨化）あるいは雄性前核とその精子尾部を確認したものを受精卵とした。さらに、受精卵の中で、雌雄両前核が1個ずつ認められるものを正常受精卵（Figure 3A）と判定した。

#### 体外受精由来胚のウサギ卵管内培養

体外受精由来胚は2～3細胞期および4細胞期以上の2区に分けられ、PBS+10%FCSで3回洗浄後、ウサギ卵管内（Boland, 1984）で4～5日間培養された。ウサギ（体重4～5kg）は性成熟に達した日本白色種を使用した。移植2～5日前にヒト絨毛性性腺刺激ホルモン



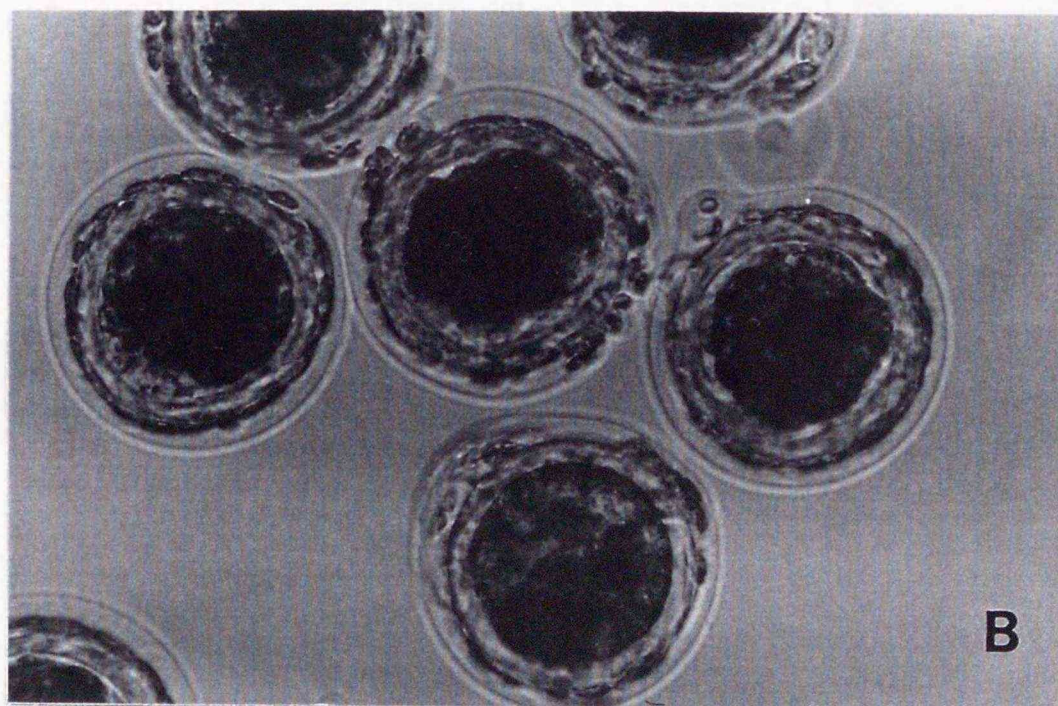
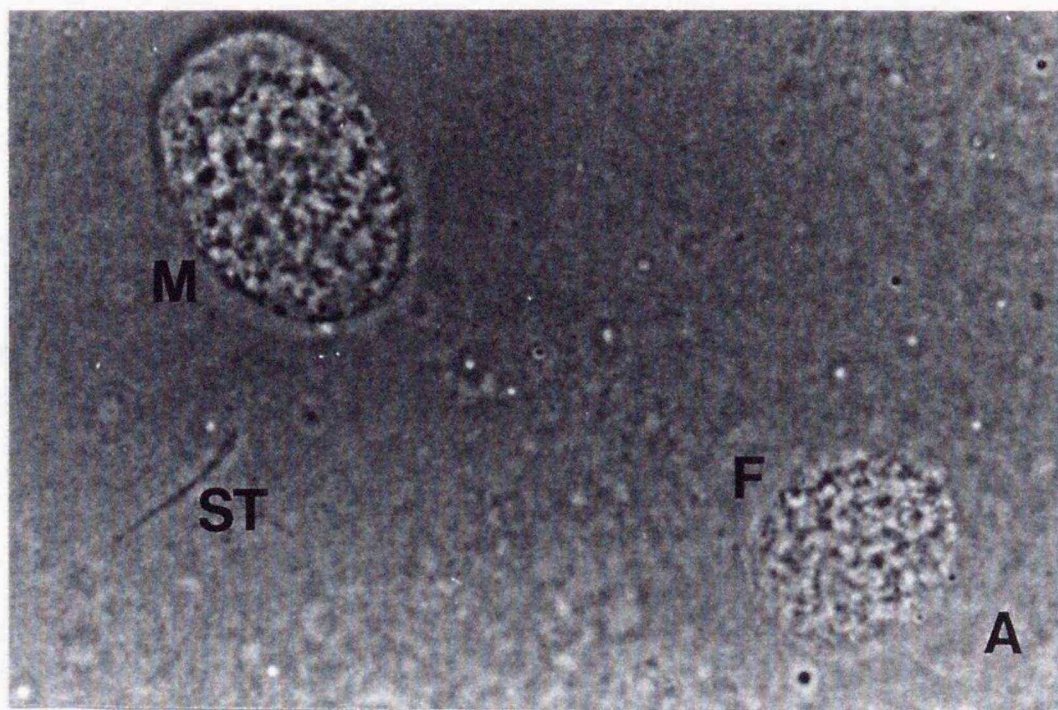


Figure 3.  
 A) In vitro fertilized embryo formed both pronuclei with a sperm tail (F:female pronucleus, M:male pronucleus, ST:sperm tail, x 1000).  
 B) Embryos (compacted morula to early blastocyst) developed in rabbit oviducts (x 200).



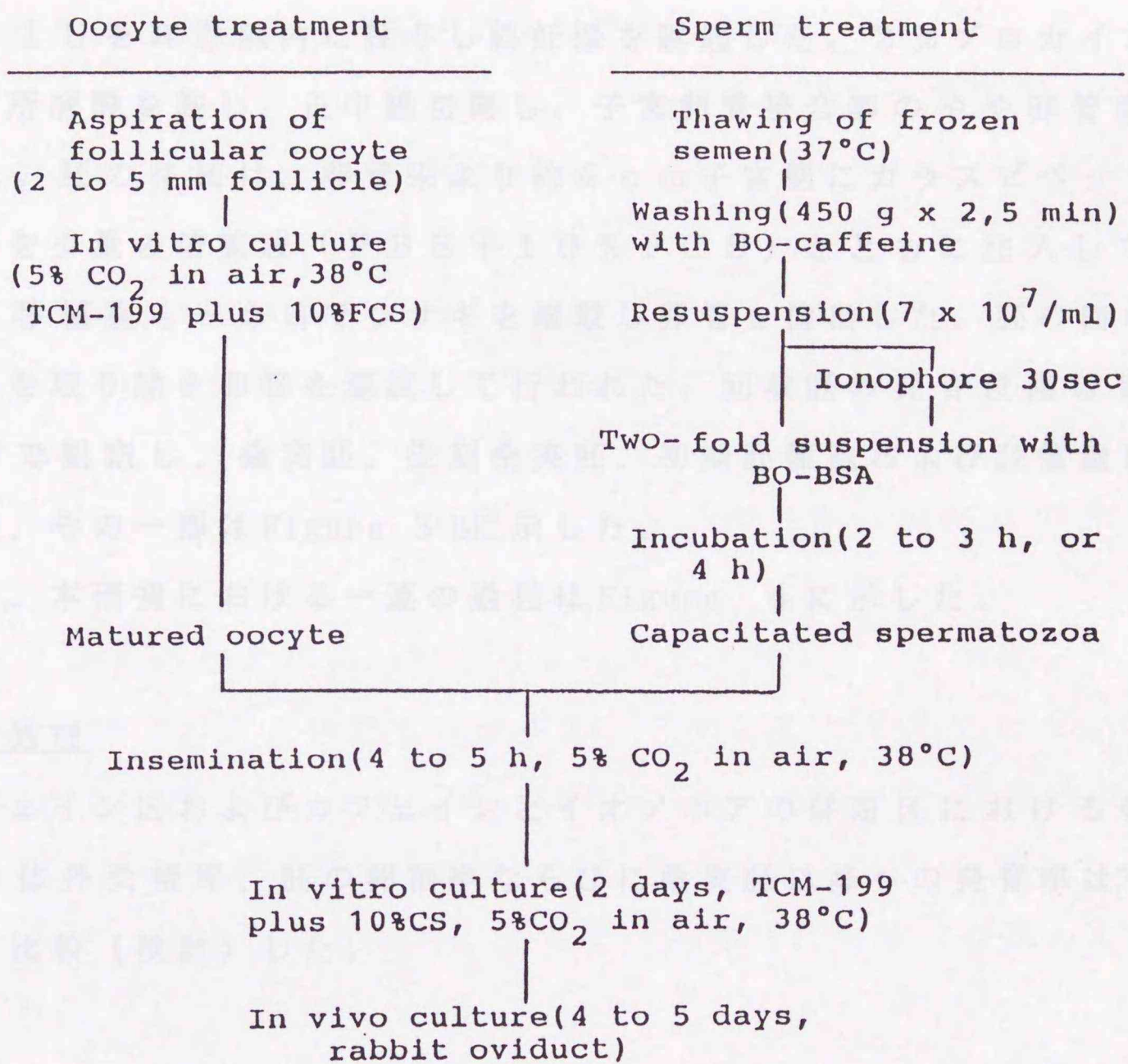


Figure 4. Procedure of in vitro fertilization in chapter 2.



(human chorionic gonadotropin, hCG:ゴナトロピン、帝国臓器) 100 IUを耳静脈内に投与し偽妊娠を誘起した。2%プロカインを用い、局所麻酔を施し、正中線切開し、子宮卵管接合部のやや卵管側を結紮した。胚の移植は、卵管采より約4 cm子宮側にガラスピペットを用いて胚を少量の培養液(PBS + 10% FCS)とともに注入して行われた。移植後4~5日でウサギを屠殺し卵管を摘出した。胚の回収は、結紮糸を取り除き卵管を灌流して行われた。回収胚の発育段階は倒立顕微鏡下で観察し、桑実胚、後期桑実胚、初期胚盤胞および胚盤胞に分類したが、その一部はFigure 3 Bに示した。

なお、本研究における一連の過程はFigure 4に示した。

#### 推計処理

カフェイン区およびカフェインとイオノホアの併用区における体外成熟率、体外受精率、胚の卵割率ならびに桑実胚以降への発育率は $\chi^2$ 検定により比較(検討)した。

#### 成績

体外成熟培養時間と成熟過程との関連はTable 3に示した。卵核胞の核膜は培養開始後16時間目で完全に消失し、第一減数分裂中期像のピークが認められた。第二成熟分裂中期像(Figure 3)は培養開始後22時間で固定した35個の卵子すべてに認められた。その後、時間の



経過とともに核の変性が増加する傾向があり、また、32時間の培養区においては1個の前核を持つ卵子が2個認められた。

カフェイン区およびカフェインとイオノホアの併用区の受精率はTable 4に示した。カフェイン区の受精率は53.3% (49/92)、また、カフェインとイオノホアの併用区の受精率は88.5% (69/78)で両者間に有意差が認められた ( $P < 0.01$ )。さらに、受精卵中の正常受精卵 (Figure 3 A) の占める割合はカフェイン区で22.4%およびカフェインとイオノホアの併用区で53.6%と両者間に有意差が認められた ( $P < 0.01$ )。しかし、多精子侵入率は両者間で有意差は認められなかった。

カフェイン区の卵割率は23.8% (87/366)、また、カフェインとイオノホアの併用区のそれは42.7% (214/501)で併用区が有意 ( $P < 0.01$ ) に高い値を示した。さらに、卵割胚中の4細胞期以上の胚の占める割合はカフェイン区で26.4%、カフェインとイオノホアの併用区では57.5%で、両者間に有意差が認められた ( $P < 0.01$ ) (Table 5)。

ウサギ卵管から回収後の桑実胚以降への発育率は2~3細胞期の移植の場合、カフェイン区で5.9%、また、カフェインとイオノホアの併用区では13.0%であった。さらに、4細胞期以上の胚の移植ではカフェイン区で35.3%、イオノホア区で37.5%と両者間に有意差は認められなかった (Table 6)。



Table 3. In vitro maturation of bovine follicular oocytes cultured in TCM-199.

| Duration of incubation (hour) | No. of oocytes examined | Stages of maturation* |      |     |                          | No. of degenerated oocytes |
|-------------------------------|-------------------------|-----------------------|------|-----|--------------------------|----------------------------|
|                               |                         | GV                    | GVBD | M-I | M-II(%)                  |                            |
| 8                             | 32                      | 10                    | 16   | 3   | 1( 3.1) <sup>a</sup>     | 2                          |
| 16                            | 35                      | 0                     | 0    | 27  | 7(20.0) <sup>a</sup>     | 1                          |
| 20                            | 35                      | 0                     | 1    | 9   | 23(65.7) <sup>b</sup>    | 2                          |
| 22                            | 35                      | 0                     | 0    | 0   | 35(100 ) <sup>c</sup>    | 0                          |
| 24                            | 35                      | 0                     | 0    | 1   | 34(97.1) <sup>bc</sup>   | 0                          |
| 26                            | 34                      | 0                     | 0    | 2   | 29(85.3) <sup>bc</sup>   | 3                          |
| 28                            | 31                      | 0                     | 0    | 0   | 27(87.1) <sup>bc</sup>   | 4                          |
| 30                            | 35                      | 0                     | 0    | 0   | 28(80.0) <sup>b</sup>    | 7                          |
| 32                            | 33                      | 0                     | 0    | 0   | 28(84.8) <sup>bc**</sup> | 5                          |

Maturation rates with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

\*GV=germinal vesicle, GVBD=germinal vesicle breakdown, M-I=metaphase I, M-II=metaphase II.

\*\*Two oocytes showed formation of one pronucleus each.



Table 4. The result of two sperm treatments on in vitro fertilization.

| Sperm                         | No.of                 | No.of                 | No.of                   | No.of       | No.of   |
|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|-------------|---------|
| treatment                     | oocytes               | oocytes(%)            | Both(%)                 | An enlarged | Poly-   |
|                               | examined <sup>*</sup> | fertilized            | pronuclei <sup>**</sup> | sperm head  | spermia |
| Caffeine                      | 92                    | 49(53.3) <sup>a</sup> | 11(22.4) <sup>a</sup>   | 31          | 7       |
| Caffeine<br>plus<br>ionophore | 78                    | 69(88.5) <sup>b</sup> | 37(53.6) <sup>b</sup>   | 23          | 9       |

a versus b(P<0.01).

\*Total of in vitro fertilized results derived from two bulls.

\*\*No.of embryos that formed two pronuclei / No.of oocytes fertilized.



Table 5. The result of two sperm treatments on cleavage rates.

| Sperm treatment         | No.of oocytes examined <sup>*</sup> | No.of embryos(%)<br>cleaved <sup>**</sup> | No.of <u>&gt;4cell</u> (%)<br>embryos <sup>***</sup> |
|-------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Caffeine                | 366                                 | 87(23.8) <sup>a</sup>                     | 23(26.4) <sup>a</sup>                                |
| Caffeine plus ionophore | 501                                 | 214(42.7) <sup>b</sup>                    | 123(57.5) <sup>b</sup>                               |

a versus b(P<0.01).

\* Total of cleavage results derived from two bulls.

\*\* No.of embryos cleaved / No.of oocytes examined.

\*\*\* No.of >4cell embryos / No.of embryos cleaved.



Table 6. The result of two sperm treatment on development after transfer of cleaved embryos into rabbit oviducts.

| Sperm treatment         | No.of embryos transferred* | No.of embryos(%) recovered | Stages of development** |    |    |    | Total(%) |
|-------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------|----|----|----|----------|
|                         |                            |                            | M                       | CM | EB | BL |          |
| Caffeine                | 49(2 to 3cells)            | 34(69.4)                   | 0                       | 1  | 1  | 0  | 2( 5.9)  |
|                         | 19(4 to 8cells)            | 17(89.5)                   | 1                       | 5  | 0  | 0  | 6(35.3)  |
| Caffeine plus ionophore | 49(2 to 3cells)            | 46(63.9)                   | 2                       | 4  | 0  | 0  | 6(13.0)  |
|                         | 62(4 to 12cells)           | 48(77.4)                   | 4                       | 10 | 2  | 2  | 18(37.5) |

\*Total of embryos.

\*\*M=morula, CM=compacted morula, EB=early blastocyst and BL=blastocyst.



## 考察

体外での成熟培養時間は22時間が最も適切な間隔であることが示唆された。Suss and Wuthrich (1985)はウシ卵胞卵子の体外培養時間と成熟過程について、培養開始後16時間目から第二成熟分裂中期像が出現し始め、20～24時間でピークを示したと報告しており、今回の試験結果とほぼ一致している。

カフェインに対しカフェインとイオノホアの併用は受精率および雄性前核の形成率を、また、卵割率ならびに受精後2日目における4細胞期以上の胚の占める割合を向上させることのできる有効な精子処理方法であることが明かとなった。さらに、正常な胚の発育に悪影響をおよぼす多精子侵入に両区で差がないことからイオノホア $0.1\mu\text{M}$ 、30秒処理が適切な方法であることが示された。一方、Byrd (1981)、高橋と花田 (1984) および花田 (1985) はCaイオノホア濃度を $1\sim 10\mu\text{M}$ に高めてウシ精子処理を行うことによって急激な精子活力の低下を認めている。本試験で用いた $0.1\mu\text{M}$ 濃度のイオノホア (A23187) でも対照区 (カフェイン区) と比較した場合、受精終了時の精子活力の低下は明かであるが生存精子は認められており、花田 (1985) のウシ体外受精に用いたイオノホア濃度 $0.1\mu\text{M}$ が適切であったことが、本試験からも支持された。

卵割胚のウサギ卵管内移植による桑実胚への発育において、カフェイン区とイオノホア併用区で差がなかったことから、受精時のイオノホアの存在は受精率あるいはそれに伴う卵割率を向上させる効果があり、また、初期卵割後の桑実胚への発育には悪影響の少ないことが推察された。



## 要約

ウシ精子処理法におけるカフェインとイオノホアの併用が体外受精におよぼす影響を調べる目的で、ウシ卵胞卵子の体外培養時間と核の成熟率との関係および体外受精時の精子処理におけるカフェインまたはカフェインとイオノホア併用による体外受精率、卵割率ならびにウサギ卵管内移植後の桑実胚への発育率について比較検討を行った。

屠畜場由来のウシ卵巢から吸引採取した305個の卵胞卵子は成熟率の検討に、また、1037個の卵胞卵子は体外受精時の精子処理の検討に用いた。成熟培養はTCM-199+10%FCSを基礎培地として、微小滴培養法により、成熟率判定のために8~32時間および体外受精のために22~24時間行われた。精子処理は凍結精液を37℃温湯で融解後、遠沈洗浄を2回行い、カフェイン5mM(C区)またはカフェイン5mM+イオノホア0.1μM30秒処理(CI区)で前培養し、4~5時間の受精を行った。発生培地にはTCM-199を基礎培地として42時間培養を継続し、卵割のステージを判定後、ウサギ卵管内で4~5日間、体内培養を行った。なお、受精率は受精開始後18時間で、常法の固定と染色とを行い、精子侵入~雄性前核形成を指標として算出した。

第二成熟分裂中期像から判定した成熟率は培養開始後22時間目でピークに達した。体外受精率はC区で53.3%およびCI区で88.5%であり、また、全受精卵中の正常受精卵の占める割合はC区で22.4%およびCI区で53.6%であった。受精後、2日目の2細胞期以降への卵割率はC区で23.8%およびCI区で42.7%であり、受精率および卵割率ともにC区に対しCI区で良好な成績が得られ



た。しかし、ウサギ卵管内に移植した受精卵の桑実胚以降への発育率はC区の2～3細胞期の移植で5.9%および4細胞期のそれは35.3%であった。CI区のその発育率は2～3細胞期で13.0%および4細胞期では37.5%と、C区とCI区との間で有意差は認められなかった。

以上の成績から、カフェインに対し、カフェインとイオノホアとの併用による精子処理のほうが体外受精率および初期卵割率の向上に有効であることが示唆された。



### 第3章 種雄牛の個体差が体外受精およびその後の胚発生に およぼす影響

#### 緒言

射出精液を用いた体外受精では供用する雄個体により受精率に差異の生じることがウサギ (Brackett and Oliphant, 1975)、ヒト (Trownson, 1984) およびウシ (Sirard et al., 1984; Sirard and Lambert, 1985; Iritani et al., 1986) において報告されている。とくに、Brackett and Oliphant (1975) はウサギにおいて複数の雄の射出精液を用いた体外受精率は大きくばらつき、それは精子処理後の被覆抗原の状態が個体により異なるためと推察している。しかしながら、これらの報告は受精率だけの見地から述べており、卵割率や桑実胚への発育に対しての種雄牛の個体差の影響については何等触れられていない。

以上のことから、本章では、種雄牛の個体差が体外受精成績、とくに、受精率、卵割率およびウサギ卵管内での桑実胚への発育におよぼす影響、また、これらから得られた体外受精由来胚の胎子への発育能もあわせて検討した。



## 材料と方法

卵子および精子処理、体外受精、受精後の体外培養ならびに胚の固定と染色および体外受精後のウサギ卵管内培養は第2章で述べた材料と方法に準じた。なお、精子処理はカフェインとイオノホアの併用によって行った。ホルスタイン種(3頭)およびアバーデインアンガス種、ヘレホード種、黒毛和種各々1頭、合計6頭の種雄牛から人工膣で採取した射出精液は卵黄クエン酸糖液(10%グリセリン)を用いて、0.5 ml ストローあたり  $5 \times 10^7$  精子濃度で凍結保存後、実験に供された。

### 受卵牛への移植

ウサギ卵管から回収された小型化桑実胚以降へ発育した胚の一部は新鮮または凍結融解後、黄体側の子宮角に2個ずつ、各々3頭、発情後7~8日目の受卵牛に、子宮頸管経由法によって非外科的に移植された。凍結に用いた耐凍剤はTable 7に示した。凍結方法および凍結曲線はTakeda et al. (1985) および青柳ら(1990)の報告に従った。1.4 Mグリセリンを含むPBS溶液に1段階で胚を入れ、室温で10~20分平衡後、ストローに充填して-5.1℃のアルコールバスに浸漬し、直ちに強制植氷を行った。15分同温度で維持し、その後、毎分0.5℃の割合で-32.5℃まで冷却し、液体窒素へ浸漬し、凍結保存した。融解は凍結ストローを室温で5秒保持後、35℃温湯内で行った。融解胚はTable 8に示した0.3 M シュクロースを含むPBS溶液I, IIおよびIIIに各々5分間隔で浸漬して脱グリセリンを行った。移植液にはPBS + 20% FCSが用いられた。また、妊娠鑑定は移植後30~40日、さらに、60~70日目に直腸検査または超音波診断に



Table 8. Components of deglycerol medium  
(in PBS).

---

|               |          |
|---------------|----------|
| Glycerol      | 1.4 M    |
| BSA           | 4g/ l    |
| Penicillin    | 100IU/ml |
| Streptomycine | 100ug/ml |

---

Table 7. Components of freezing  
medium in PBS.

---

|               |          |
|---------------|----------|
| Glycerol      | 1.4 M    |
| BSA           | 4g/ l    |
| Penicillin    | 100IU/ml |
| Streptomycine | 100ug/ml |

---



Table 8. Components of deglycerol medium (in PBS).

|     |               |          |
|-----|---------------|----------|
| I   | Glycerol      | 924 mM   |
|     | BSA           | 4g/ l    |
|     | Sucrose       | 0.3 M    |
|     | Penicillin    | 100IU/ml |
|     | Streptomycine | 100μg/ml |
| II  | Glycerol      | 462 mM   |
|     | BSA           | 4g/ l    |
|     | Sucrose       | 0.3 M    |
|     | Penicillin    | 100IU/ml |
|     | Streptomycine | 100μg/ml |
| III | BSA           | 4g/ l    |
|     | Sucrose       | 0.3 M    |
|     | Penicillin    | 100IU/ml |
|     | Streptomycine | 100μg/ml |



よって行われた。

#### 推計処理

6頭の各種雄牛間の体外受精率、卵割率および桑実胚以降への発育率は $\chi^2$ 検定により比較された。

#### 成績

各種雄牛の体外受精成績はTable 9に示した。3-Hの種雄牛の体外受精率(52.5%)が最も低く、他の5頭のそれは84.2~93.5%の範囲で有意差は認められず、3-Hと他の5頭の受精率との間に危険率1%以下で有意差が認められた。また、全受精卵中の正常受精卵の占める割合は36.1~75.0%と各種雄牛間でばらつきが認められた。しかし、6頭の種雄牛の多精子侵入率は10.0~16.7%の範囲で有意差は認められなかった。

各種雄牛の体外受精後の卵割率はTable 10に示した。受精率の低かった3-Hの卵割率は17.5%で、他の5頭のそれ(38.7~48.3%)と比べて有意( $P < 0.01$ )に低値を示した。また、卵割胚中の4細胞期以上の胚の占める割合は38.8~70.9%と各種雄牛間でばらつきが認められた。

ウサギ卵管内培養後の桑実胚以降への発生率は2~3細胞期胚の移植で3.4~10.5%(平均8.1%)、4細胞期以上の胚のそれは



Table 9. Fertilization rates after in vitro insemination among the six different bulls.

| Bull<br>No.* | No.of<br>oocytes<br>examined | No.of<br>oocytes(%)<br>fertilized** | No.of                   |                           |                  |
|--------------|------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|---------------------------|------------------|
|              |                              |                                     | Both(%)<br>pronuclei*** | An enlarged<br>sperm head | Poly-<br>spermia |
| 1-A          | 40                           | 36(90.0) <sup>b</sup>               | 13(36.1) <sup>a</sup>   | 18                        | 5                |
| 2-H          | 38                           | 33(86.8) <sup>b</sup>               | 24(72.7) <sup>bc</sup>  | 5                         | 4                |
| 3-H          | 40                           | 21(52.5) <sup>a</sup>               | 8(38.1) <sup>a</sup>    | 9                         | 4                |
| 4-H          | 30                           | 27(90.0) <sup>b</sup>               | 18(66.7) <sup>bc</sup>  | 4                         | 5                |
| 5-h          | 38                           | 32(84.2) <sup>b</sup>               | 16(50.0) <sup>ab</sup>  | 10                        | 6                |
| 6-B          | 31                           | 28(93.5) <sup>b</sup>               | 21(75.0) <sup>c</sup>   | 3                         | 4                |

In vitro fertilization rates with different superscripts in the same column are significantly different ( $P < 0.05$ ).

\*A:Angus, H:Holstein, h:Hereford, B:Japanese black.

\*\*No.of oocytes fertilized / No.of oocytes examined.

\*\*\*No.of embryos formed both pronuclei / No.of oocytes fertilized.



Table 10. Cleavage rates after in vitro fertilization with sperm from different bulls.

| Bull | No.of    | No.of                  | No.of                  |
|------|----------|------------------------|------------------------|
| No.* | oocytes  | embryos (%)            | >4cell (%)             |
|      | examined | cleaved**              | embryos***             |
| 1-A  | 288      | 114(39.6) <sup>b</sup> | 45(39.5) <sup>a</sup>  |
| 2-H  | 354      | 151(42.7) <sup>b</sup> | 107(70.9) <sup>c</sup> |
| 3-H  | 326      | 57(17.5) <sup>a</sup>  | 28(49.1) <sup>ab</sup> |
| 4-H  | 257      | 107(40.5) <sup>b</sup> | 49(47.1) <sup>ab</sup> |
| 5-h  | 186      | 72(38.7) <sup>b</sup>  | 28(38.8) <sup>a</sup>  |
| 6-B  | 259      | 125(48.3) <sup>b</sup> | 67(53.6) <sup>b</sup>  |

Values with different superscripts in the same column were significantly different ( $P < 0.05$ ).

\*A:Angus, H:Holstein, h:Hereford, B:Japanese black.

\*\*No.of embryos cleaved / No.of oocytes examined.

\*\*\*No.of >4cell embryos / No.of embryos cleaved.



Table 11. Development rates after transfer of cleaved embryos into rabbit oviducts using the semen of different bulls.

| Bull<br>No.* | No.of<br>embryos<br>transferred | No.of<br>embryos<br>recovered | Stages of<br>development** |    |    |    | Total(%)              |
|--------------|---------------------------------|-------------------------------|----------------------------|----|----|----|-----------------------|
|              |                                 |                               | M                          | CM | EB | BL |                       |
| 1-A          | 65(2 to 3cells)                 | 38                            | 0                          | 1  | 3  | 0  | 4(10.5)               |
|              | 43(4 to 10cells)                | 28                            | 3                          | 5  | 0  | 1  | 9(32.1)               |
| 2-H          | 30(2 to 3cells)                 | 24                            | 0                          | 2  | 0  | 0  | 2( 8.3)               |
|              | 39(4 to 10cells)                | 30                            | 2                          | 6  | 2  | 1  | 11(36.7)              |
| 3-H          | 29(2 to 3cells)                 | 22                            | 1                          | 1  | 0  | 0  | 2( 9.1)               |
|              | 19(4 to 10cells)                | 16                            | 0                          | 5  | 0  | 0  | 5(31.3)               |
| 4-H          | 35(2 to 3cells)                 | 20                            | 1                          | 0  | 0  | 0  | 1( 5.0)               |
|              | 35(4 to 10cells)                | 13                            | 1                          | 2  | 1  | 1  | 5(38.5)               |
| 5-h          | 44(2 to 3cells)                 | 40                            | 2                          | 2  | 0  | 0  | 4(10.0)               |
|              | 28(4 to 10cells)                | 20                            | 2                          | 1  | 1  | 1  | 5(25.0)               |
| 6-B          | 32(2 to 3cells)                 | 29                            | 0                          | 1  | 0  | 0  | 1( 3.4)               |
|              | 47(4 to 10cells)                | 28                            | 4                          | 3  | 3  | 2  | 12(42.9)              |
| <hr/>        |                                 |                               |                            |    |    |    |                       |
| Total***     | 235(2 to 3cells)                | 173                           | 4                          | 7  | 3  | 0  | 14( 8.1) <sup>a</sup> |
|              | 211(4 to 10cells)               | 135                           | 12                         | 22 | 7  | 6  | 47(34.8) <sup>b</sup> |

a versus b( $P < 0.01$ ).

\*A:Angus, H:Holstein, h:Hereford, B:Japanese black.

\*\*M=morula, CM=compacted morula, EB=early blastocyst and BL=blastocyst.

\*\*\*Total of developmental results derived from six bulls.





Figure 5 . Three calves derived from in vitro maturation and in vitro fertilization including one set of twin in October 1987.



25.0～42.9% (平均34.8%) で各種雄牛間に有意差は認められなかったが、ウサギ卵管へ移植する時点での胚の卵割ステージによって、桑実胚以降への発生に影響 (2～3細胞期: 8.1%、4～10細胞期: 34.8%) が認められた ( $P < 0.01$ , Table 11)。また、ウサギ卵管から回収された小型化桑実胚～初期胚盤胞の一部を受卵牛へ移植した結果、新鮮胚の移植からは3頭中3頭が受胎、分娩し、1組の双子を含む4頭の産子を得た (Figure 5)。凍結胚では3頭中1頭が受胎し、1頭の産子を得た。

#### 考察

射出精子を用いた体外受精では雄個体により受精率に差異の生じることが示唆されている (Brackett and Oliphant, 1975)。本試験においても3-Hの種雄牛が低い受精率を示した。しかし、5頭の種雄牛では全て、安定的な受精率および卵割率が認められたにもかかわらず、媒精開始後18時間目における、正常受精率および受精後2日目の4細胞期胚の占める割合は各種雄牛間で大きなばらつきが認められた。このことは卵子側に存在する雄性前核形成因子 (Yanagimachi and Chang, 1963; Thibault and Gerard, 1973; Thibault et al., 1975) の影響と考えるよりも、精子先体表面の被覆抗原の状態が個体によって異なるため (Brackett and Oliphant, 1975) に、キサンチン誘導体とCaイオノホアによる精子細胞内へのCaイオンの流入 (豊田, 1985) に個体的差異が生じ、受精能獲得および先体反応



に要する時間、すなわち精子が卵子内へ侵入するまでの時間がばらついたためと推察された。さらに、媒精開始後18時間目における雌雄両前核の形成はその後の胚の正常な卵割と発育に関連しており、今後の体外受精技術の進展のためにも、このようなばらつきを減少できる精子処理方法の改善が望まれる。体外での精子の受精能獲得および先体反応誘起のために、多くの物質が今までに報告されている。たとえば、ヘパリン (Lee et al., 1983; Parrish et al., 1985a; Xu et al., 1986; Lu et al., 1987)、Caイオノホア (Zuckerman and Alvarez, 1980; Byrd, 1981; 高橋と花田, 1984; 花田, 1985)、BSA (Byrd, 1981; Seigel and Graves, 1981)、カフェイン (高橋と花田, 1984; Crister et al., 1984)、サイクリックAMP (Crister et al., 1984)、イオン高濃度溶液 (Brackett et al., 1980; Fukui et al., 1983; Bondioli, 1983; Sirard et al., 1985)、修正KRB (Iritani et al., 1986)、イミダゾール (Hanada and Nagase, 1981)、コンドロイチン硫酸 (Lee et al., 1983; Lenz et al., 1983) および卵胞液 (Fukui et al., 1983; 菅原ら, 1985) などがある。これらの物質の有効的な組み合わせ方法、あるいはより明確な作用機序が解明されれば、種雄牛の個体差による体外受精への影響も減少できるであろう。

ウサギ卵管内培養において、2細胞期あるいは4細胞期胚の移植後、種雄牛間で発育率に差を認めないことから、初期卵割胚から桑実胚以降への発育に対しては種雄牛の個体差がなんら影響していないことが推察された。また、媒精後2日目において2～3細胞期であった胚の桑実胚への発育率は4細胞期胚以上のそれと比べて、第2章と同様に常に低率であり、この日齢での2～3細胞期胚はすでに発育遅延あるいは退行し



た胚を多く含んでいるものと考えられた。

また、本試験から得られた新鮮または凍結胚の一部を受卵牛に移植し、正常な子牛が得られたことから、体外受精由来の胚が正常に發育していることを示している。

#### 要約

ウシ体外受精における種雄牛の個体差の影響を体外受精率、体外卵割率およびウサギ卵管内移植後の桑実胚以降への發育率から比較検討した。

屠畜場でウシ卵巢を採取し、直径2～5 mmの卵胞から吸引した1887個の卵胞卵子を実験に使用した。成熟培養はTCM-199+10% FCSを基礎培地として22～24時間、微小滴培養法により行った。精子処理は6頭の種雄牛の凍結精液を用い、37℃温湯で融解後、カフェイン5 mM+イオノホア0.1  $\mu$ M 30秒処理して、前培養(2～3時間)し、4時間の媒精を行った。発生培地はTCM-199+10% FCSを基礎培地として、43時間培養を継続し、卵割卵のステージを判定後、ウサギ卵管内で4～5日間、体内培養を行った。なお、受精率は受精開始後18時間で常法の固定、染色を行い、精子侵入～雄性前核形成を指標とした。また、体外受精由来の新鮮胚および凍結胚を各々3頭の受卵牛に2個ずつ非外科的に移植した。

体外受精率は種雄牛5頭で84.2～93.5%の範囲で有意差は認められず、1頭(3-H)は52.5%と他牛に比べて有意に低値を示した( $P < 0.01$ )。体外での卵割率は3-Hの個体のみ17.5%



と低値を示したが、他牛のそれは38.7~48.3%の範囲内にあった。受精卵中の正常受精卵の占める割合は38.1~75.0%の範囲で6頭の種雄牛間でばらつきを認めた。また、卵割胚中の4細胞期胚の占める割合は38.8~70.9%で幅が認められた。ウサギ卵管内での桑実胚以降への発育率は媒精後2日目における、2~3細胞期胚の移植で3.4~10.5%、4細胞期以上の胚のそれは25.0~42.9%であり、各種雄牛間に有意差は認められなかった。また、新鮮胚の移植により、受卵牛3頭中3頭の受胎を確認し、1組の双子を含む4頭の産子を得た。凍結胚では3頭中1頭が受胎し、1頭の産子を得た。

以上の成績から、種雄牛の個体差が体外受精に影響することが明らかとなった。とくに、正常受精卵の割合および卵割胚中の4細胞期胚の占める割合に大きく影響することが示唆された。



#### 第4章 体外受精由来胚の体外培養とくに共培養に関する検討

##### 緒言

ウシ体内受精あるいは体外受精由来の初期胚をウサギ卵管 (Boland, 1984) またはヒツジ卵管内 (Eyestone et al., 1985) で体内培養することにより、胚盤胞期まで発育させることができる。ウシに比べて外科手術が容易なことからも、この方法がウシ初期胚の培養あるいは輸送の手段に用いられてきた。一方、ウシ初期胚を体外で培養すると8～16細胞期の間で発育が停止してしまうことが知られている (Thibault, 1966; Camous et al., 1984; Eyestone and First, 1986; Heyman et al., 1987; Bavister, 1988)。ウシ初期胚の体外培養に関する種々の検討が行われてきたが8～16細胞期の体外での発育ブロックを有効に解除する方法はなかなか見いだせなかった。最近になって、Gandolfi and Moor (1987) はヒツジ初期胚の体外培養にヒツジの卵管上皮細胞の単層上での培養が発育に有効であることを報告した。ウシでも同様の試みがなされ、卵管上皮細胞との共培養によって初期胚の発育効果が認められた (Eyestone et al., 1987; Lu et al., 1988; Eyestone and First, 1989)。また、同時期に、Heyman et al. (1987) はウシおよびヒツジにおいて、胚の栄養膜が体外での初期胚の発育に有効に働くことを報告している。また、本邦においても梶原ら (1987) および Fukuda et al. (1989) がウシ体外受精由来胚の体外培養に卵丘細胞との共培養が有効であることを報告



した。しかし、ウシ体外受精由来の初期卵割胚の発育維持に関して上記細胞間あるいはウサギ卵管内の体内培養との比較は行われていない。

そこで本章では、ウシ体外受精由来8細胞期胚の胚盤胞への発育に関して、ウシ卵管上皮細胞、ウシ栄養膜の小胞、ウシ卵丘細胞およびウシ羊膜細胞との体外での共培養ならびにウサギ卵管内培養間で比較検討を行った。

### 材料と方法

本研究における一連の過程はFigure 6に示した。

#### 卵子処理

屠畜場において採取したウシ卵巢より、第2章の材料と方法に準じて卵胞卵子は吸引と選抜がなされた。卵子の培養には、TCM-199液に10% FCS、25 mM濃度のHEPES、ペニシリンG (100 IU/ml)、硫酸ストレプトマイシン (100  $\mu$ g/ml)、10  $\mu$ g/mlのLHおよび1  $\mu$ g/mlのE<sub>2</sub>を添加した培養液を用いた。卵子をこの培養液で3回洗浄した後、2～6時間前に500  $\mu$ lの培養液を4穴式のプラスチック製培養皿 (four well petridish, Nunclon Inter-Med.) に入れ、あらかじめ5% CO<sub>2</sub>を含む空気で飽和させた流動パラフィンで上面を覆い、炭酸ガス培養器内で気相平衡させた培養液に、1ウェルあたり30～40個の卵子を浮遊させ、22～24時間培養した。培養条件は39℃、気相はCO<sub>2</sub> 5%と95%空気で、飽和湿度とした。



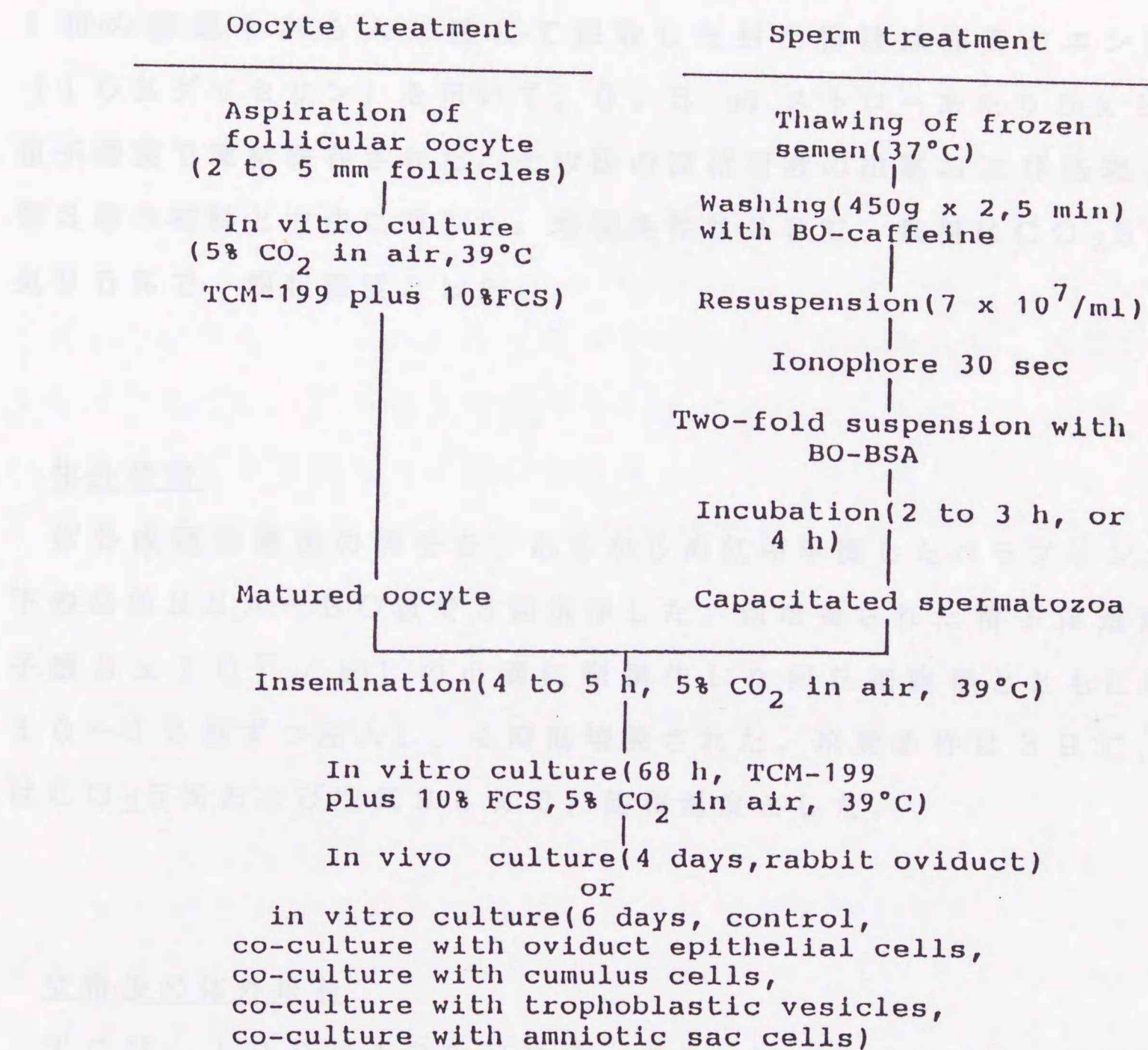


Figure 6. Procedure of in vitro fertilization in chapter 4.



### 精子処理

精子の処理はカフェインとイオノホアの併用処理で行った。黒毛和種1頭の種雄牛から人工腔にて採取した射出精液は卵黄クエン酸糖液(10%グリセリン)を用いて、0.5 ml ストローあたり  $5 \times 10^7$  の精子濃度で凍結保存された。その後の凍結精液の融解および処理方法は第3章の材料と方法に準じた。培養条件は39℃、気相はCO<sub>2</sub>5%、空気95%で、飽和湿度とした。

### 体外受精

体外成熟培養後の卵子を、あらかじめ気相平衡したパラフィンオイル下の2%BSA-BO液で3回洗浄した。前培養された精子浮遊液(精子数  $3 \times 10^7$  /ml)の小滴に膨潤化した卵丘細胞群とともに卵子を10~15個ずつ注入し、4時間培養された。培養条件は39℃、気相はCO<sub>2</sub>5%および空気95%で、飽和湿度とした。

### 受精後の体外培養

TCM-199に10%FCS、25mM HEPES、硫酸ストレプトマイシン100  $\mu$ g/mlおよびペニシリンG100 IU/mlを含むパラフィンオイル下の培地内で体外受精した卵子を3回洗浄した。さらに、パラフィンオイル下の500  $\mu$ lの入ったウェル内に30~40個ずつ洗浄卵子を入れ、68時間培養した。培養条件は39℃、気相はCO<sub>2</sub>5%および空気95%で飽和湿度とした。培養終了後、実体顕微鏡下で、ピペッティングにより、卵丘細胞を除去して、卵割の状態を観察し、均等に卵割した414個(供試卵の24.9%)の8細胞期



胚 (Figure 9 A) を選抜した。

#### 8細胞期胚のその後の培養系

上記によって得られた8細胞期胚は以下の6種類の培養系で4～6日間培養された。なお、体外培養の基礎培地にはTCM-199に10% FCS、100 IU/mlのペニシリンG、100  $\mu$ g/mlの硫酸ストレプトマイシンおよび25 mM HEPESが加えられた。4穴式プラスチック培養皿に1ウエルあたり880  $\mu$ lの培地を入れ、炭酸ガス培養器内で十分に気相平衡されたパラフィンオイルを覆って、各区とも5～15個の胚を培養した。培養条件は39℃、気相は5% CO<sub>2</sub>、95% 空気および飽和湿度とした。なお、培地交換は2日間隔で半量ずつ行われた。

1) 対照区：胚はいかなる体細胞とも共培養せずに、上記培地のみで培養された。

2) ウシ卵管上皮細胞との共培養区：開花期黄体を有する個体のウシ卵管を屠畜場にて採取し、PBSに10% FCS、100 IU/mlのペニシリンGおよび100  $\mu$ g/mlの硫酸ストレプトマイシンを加えた溶液で卵管内を灌流することにより、卵管上皮細胞が集められた。上記TCM-199の培地で遠沈洗浄(450 g、5分)を2回行い、卵管1本あたり5 mlの細胞浮遊液を880  $\mu$ lずつ各ウエルに分注した。胚との共培養の3日前に細胞浮遊液は準備された (Fukui and Ono, 1989)。

3) ウシ卵丘細胞との共培養区：本方法は梶原ら (1987)、Goto et



al. (1988) および Fukuda et al. (1989) の報告に従った。すなわち、体外受精後68時間でピペッティングによって除去された卵丘細胞を培地交換後そのまま共培養に用いた。

4) ウシ栄養膜の小胞との共培養区：ウシ栄養膜の小胞 (Heyman et al., 1987) には過剰排卵処置牛 (青柳ら, 1987) から非外科的に回収された13日齢の胚が材料として用いられた。その胚はPBS + 10% FCSの入ったガラスシャーレ内で金属刀 (バイオカット、フェザー社) を用いてembryonic discを除去後、1~2mmの小片に切断された。小片はTCM-199 + 10% FCSで1日間CO<sub>2</sub>インキュベーター (39℃、5% CO<sub>2</sub>および95% 空気、飽和湿度) 内で培養され、小胞は第3章に示した胚の凍結方法と同様に凍結保存された。凍結した栄養膜の小胞の融解および脱グリセリン方法は第3章に示した方法と同様に行った。融解した栄養膜の小胞は、2~7日間CO<sub>2</sub>インキュベーター (39℃、5% CO<sub>2</sub>および95% 空気、飽和湿度) 内で、TCM-199 + 10% FCSを用いて培養したのち体外受精由来胚の共培養に使用した (Figure 7)。

5) ウシ羊膜細胞との共培養区：ウシ妊娠子宮を屠畜場にて採取し、胎子の体長から妊娠月齢を推定した。妊娠2~4ヵ月齢のものから羊膜を無菌的に取り出し、PBS + 10% FCSの入ったガラスシャーレ内で金属刀 (バイオカット、フェザー社) を用いて、乳頭状の羊膜上皮増生の部分を除去して、約1mm<sup>2</sup>の組織片に切断した。胚との共培養の5~12日前に、1ウェルあたり6個の組織片を入れた (Figure 8, Aoyagi et al., 1990)。



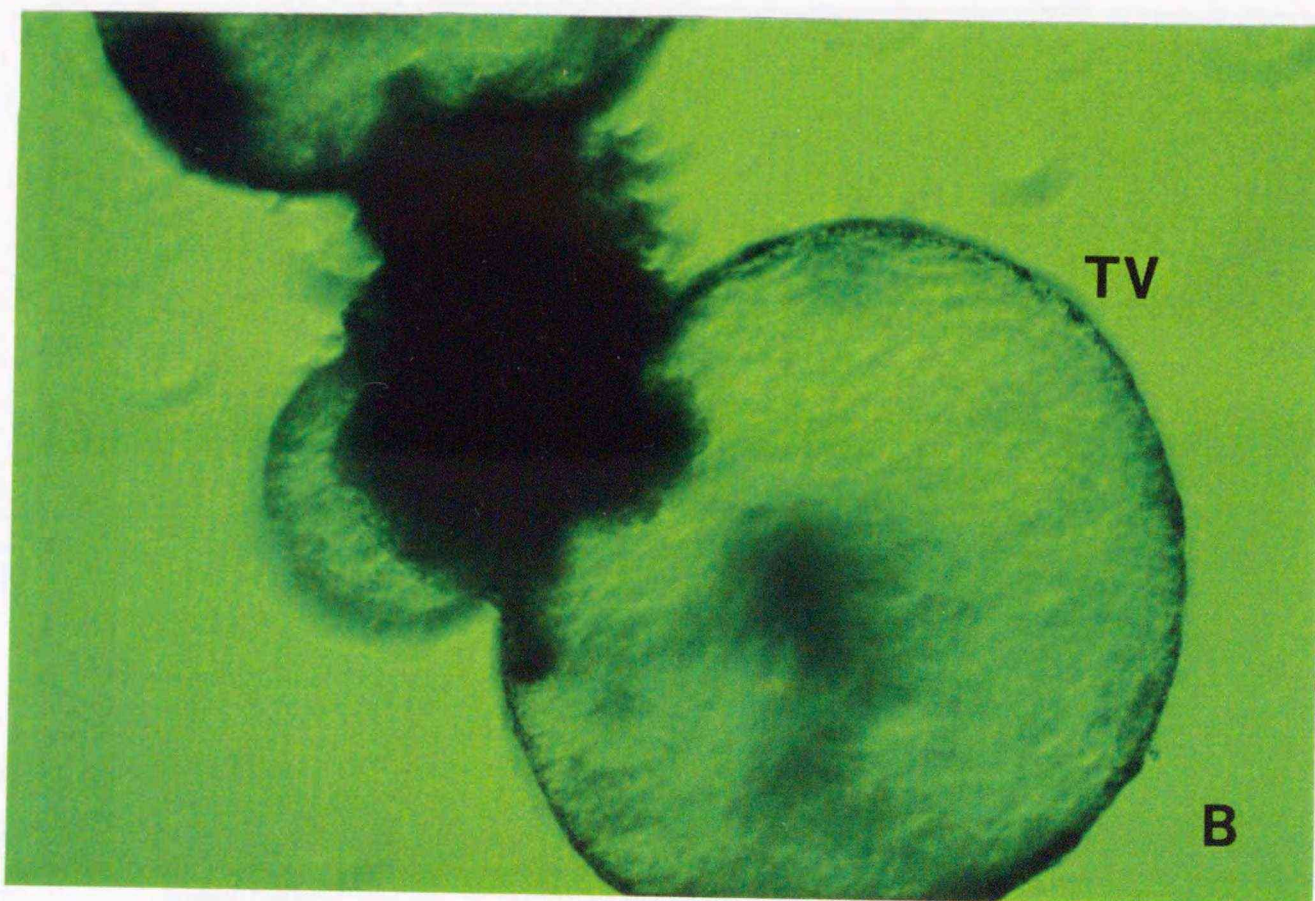
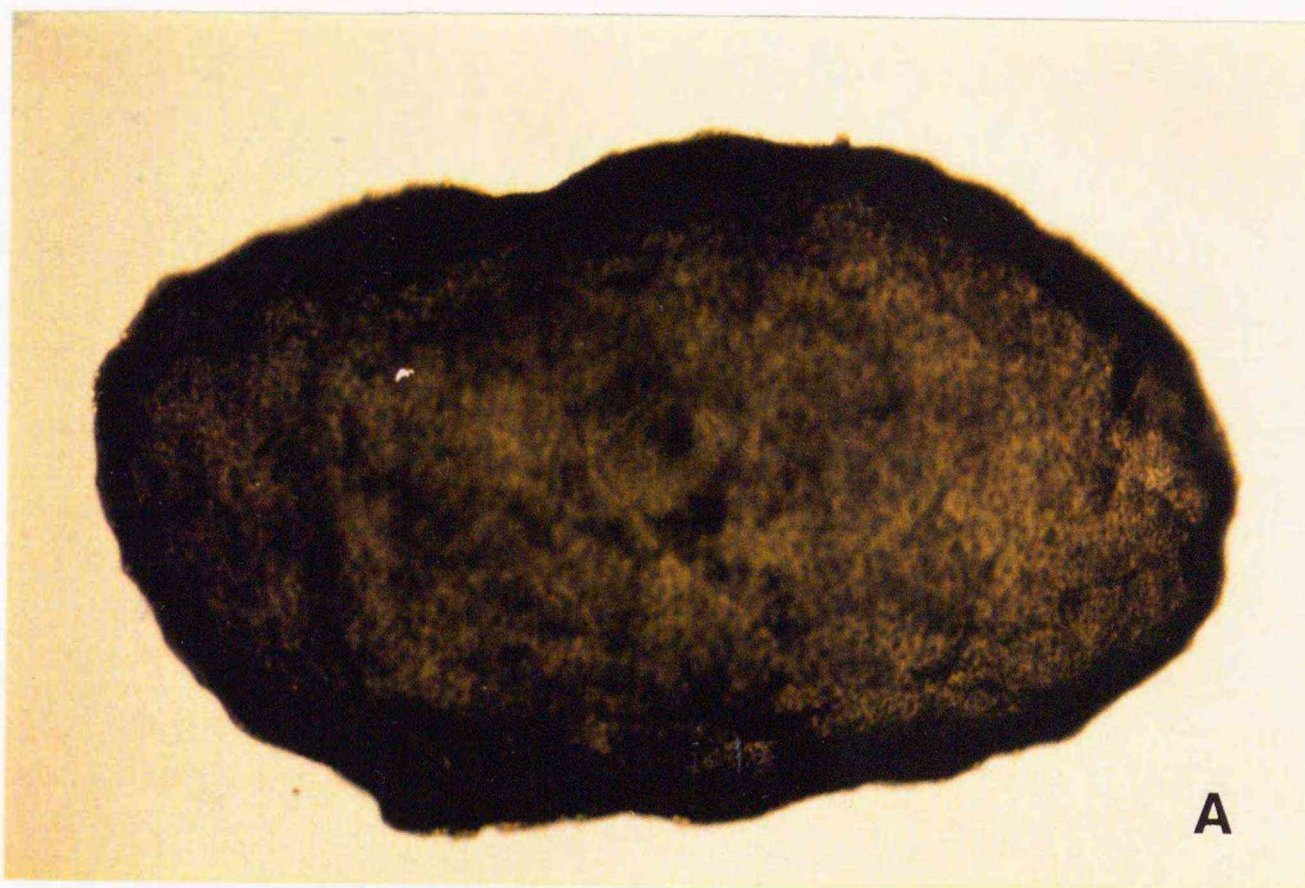


Figure 7 .

- A) A bovine embryo(13 d) nonsurgically collected from superovulated cow(x 40).
- B) Trophoblastic vesicles(TV) cultured for 2 d after frozen-thawed(x 100).



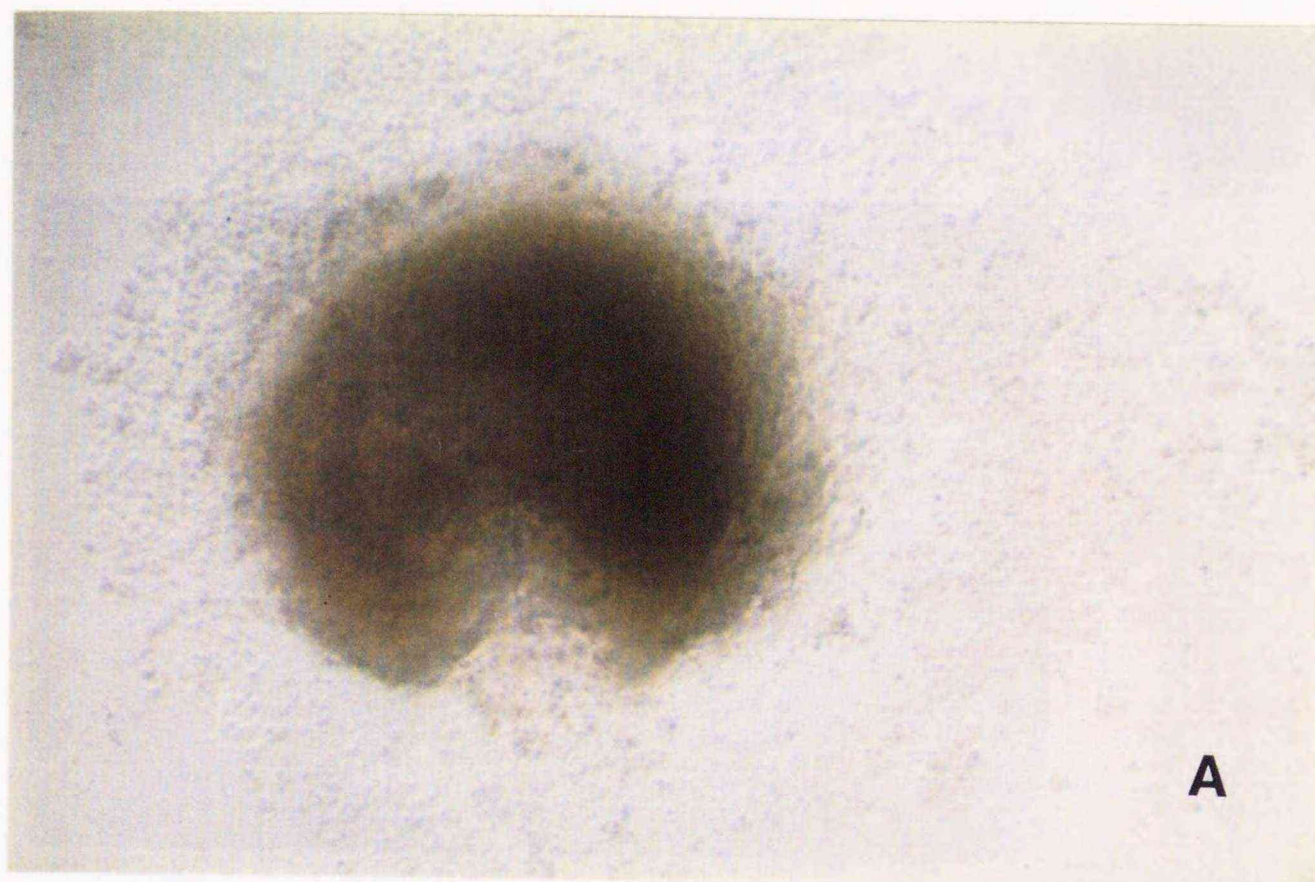
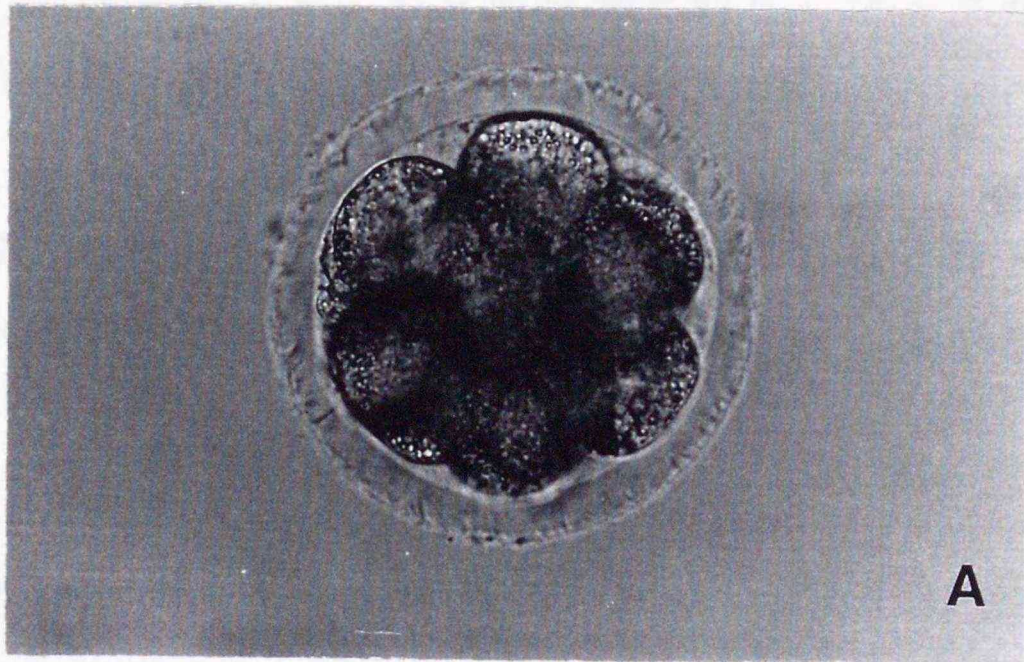
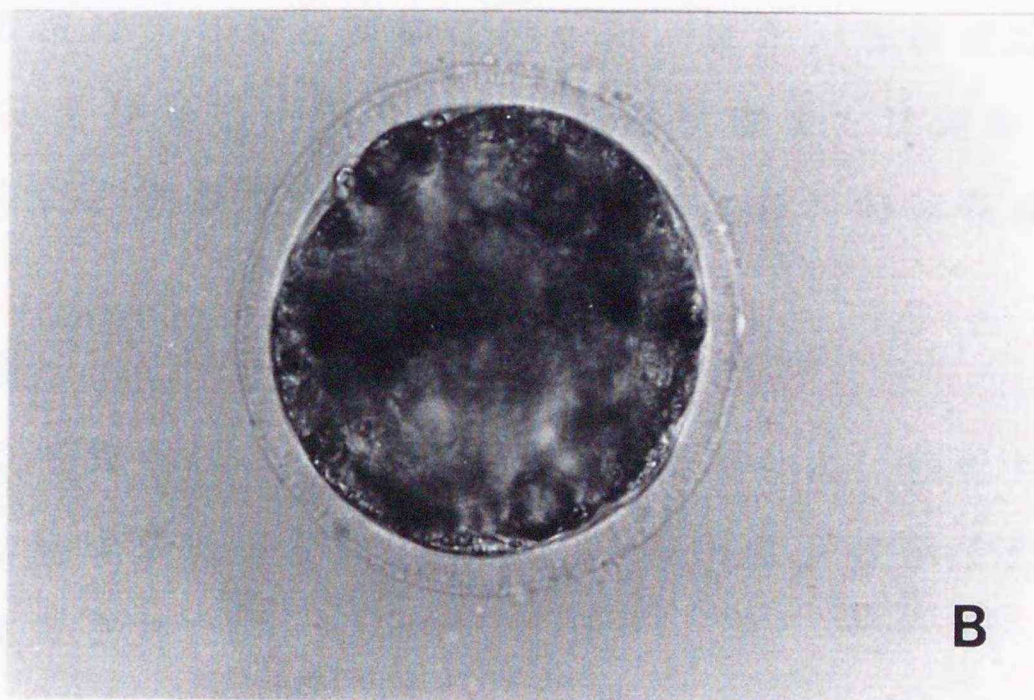


Figure 8 .  
 A) A bovine amniotic sac fragment at 60 d of pregnancy (x 40).  
 B) Monolayer of amniotic sac cells cultured for 7 d (x 200).





A



B

Figure 9.

A) An 8-cell embryo cultured for 3 d after in vitro fertilization and in vitro maturation (x 200).

B) A blastocyst developed from an 8-cell stage by co-culture with trophoblastic vesicles for 4 d(x 200).



6) ウサギ卵管内培養区： 8細胞期胚はPBS + 10% FCSで3回洗浄後、ウサギ卵管内で4～5日間培養された。ウサギ卵管への移植および回収方法は第2章の材料と方法に準じた。

体外成熟、体外受精、受精後の体外培養における卵子または胚の顕微鏡下の操作はすべて加温プレート（39℃設定）上で行った。

#### 受精卵への移植

各培養区から得られた胚盤胞（Figure 9 B）の一部は新鮮または凍結融解後、黄体側の子宮角に1～2個ずつ、発情後7～8日目の計21頭の受精卵に、子宮頸管経由法によって非外科的に移植された。凍結および融解方法は第3章と同様に行った。また、妊娠鑑定は移植後35～40日および60～70日目に直腸検査または超音波診断により行われた。さらに、妊娠期間、産子の性別および生時体重が調べられた。

#### 推計処理

6種類の培養系による胚盤胞への発育率および胚盤胞中の良好な形態（優秀または優良胚の割合、金川、1984）を示す胚の割合は $\chi^2$ 検定によって比較された。

#### 成績

各培養系による胚盤胞への発育率はTable 1 2に示した。卵管上皮細胞、栄養膜の小胞および羊膜細胞との共培養による8細胞期胚の胚盤胞への発育率はそれぞれ39.0、50.7および48.6%であり、三者間で有意差は認められなかった。対照区のそれは1.9%と低率で、



Table 12. Effects of culture systems on the development of 8-cell embryos derived from in vitro fertilization into blastocysts.

| Culture system                              |   | No.of trial | No.of 8-cell embryos | No.of embryos developed into blastocyst |    |    |   |                        | No.of(%)**            |
|---------------------------------------------|---|-------------|----------------------|-----------------------------------------|----|----|---|------------------------|-----------------------|
|                                             |   |             |                      | Total(%)*                               |    |    |   |                        | freezable embryos     |
|                                             |   |             |                      | 6                                       | 7  | 8  | 9 |                        |                       |
| cultured examined (Days after insemination) |   |             |                      |                                         |    |    |   |                        |                       |
| Control                                     | 5 | 54          | 54                   | 0                                       | 0  | 1  | 0 | 1( 1.9) <sup>a</sup>   | 0( 0) <sup>a</sup>    |
| Oviduct epithelial cells                    | 5 | 59          | 59                   | 5                                       | 8  | 10 | 0 | 23(39.0) <sup>bc</sup> | 11(18.6) <sup>b</sup> |
| Cumulus cells                               | 6 | 82          | 82                   | 1                                       | 3  | 11 | 1 | 16(19.5) <sup>b</sup>  | 3( 3.7) <sup>a</sup>  |
| Tropho-blastic vesicles                     | 6 | 69          | 69                   | 7                                       | 23 | 5  | 0 | 35(50.7) <sup>c</sup>  | 19(27.5) <sup>b</sup> |
| Amniotic sac cells                          | 6 | 74          | 74                   | 2                                       | 27 | 7  | 0 | 36(48.6) <sup>c</sup>  | 18(24.3) <sup>b</sup> |
| Rabbit oviduct                              | 5 | 76          | 58                   | 0                                       | 9  | 8  | 0 | 17(29.3) <sup>b</sup>  | 9(15.5) <sup>b</sup>  |

Values with different superscripts in the same column were significantly different (P<0.05).

\*No.of blastocyst / No.of embryos examined.

\*\*No.of good blastocyst / No.of embryos examined.



Table 13. Pregnancies after transfer of blastocysts produced in this study.

| Recipient No. | Culture system   | Fresh/ frozen embryos | No. of blasto- cysts transferred | Returned to estrus or palpated open (Days) | Gestation period (Days) | Birth weight | Sex of calves |
|---------------|------------------|-----------------------|----------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------|--------------|---------------|
| R395          | Control          | Fresh                 | 1                                | 25                                         | -                       | -            | -             |
| R4            |                  | Fresh                 | 2                                | 19                                         | -                       | -            | -             |
| R472          | Oviduct          | Fresh                 | 2                                | 17                                         | -                       | -            | -             |
| DM1           | epithelial cells | Frozen                | 2                                | 41                                         | -                       | -            | -             |
| 489           |                  | Frozen                | 2                                | -                                          | 287                     | 36Kg         | male          |
| R42           | Cumulus          | Fresh                 | 1                                | -                                          | 294                     | 56Kg         | male          |
| R48           | cells            | Fresh                 | 1                                | 18                                         | -                       | -            | -             |
| R891          |                  | Frozen                | 2                                | -                                          | 291                     | 47Kg         | male          |
| SA2           |                  | Frozen                | 2                                | 46                                         | -                       | -            | -             |
| 647           | Tropho-          | Frozen                | 2                                | -                                          | 289                     | 40,25Kg      | male, female  |
| 605           | blastic          | Frozen                | 2                                | 22                                         | -                       | -            | -             |
| 568           | vesicles         | Frozen                | 2                                | 23                                         | -                       | -            | -             |
| KY1           |                  | Frozen                | 2                                | 60                                         | -                       | -            | -             |
| KY2           |                  | Frozen                | 1                                | 20                                         | -                       | -            | -             |
| R20           |                  | Frozen                | 2                                | -                                          | 291                     | 58Kg         | male          |
| AV3           | Amniotic         | Frozen                | 2                                | 24                                         | -                       | -            | -             |
| 570           | sac cells        | Frozen                | 2                                | 25                                         | -                       | -            | -             |
| 412           |                  | Frozen                | 2                                | 21                                         | -                       | -            | -             |
| 569           |                  | Frozen                | 2                                | -                                          | 285                     | 35,34Kg      | male, male    |
| R996          |                  | Frozen                | 2                                | 25                                         | -                       | -            | -             |
| R997          |                  | Frozen                | 2                                | -                                          | 287                     | 46Kg         | male          |





Figure 10 . Normal twins derived from transfer of frozen-thawed embryos co-cultured with amniotic sac cells in March 1989.



他のいずれの区と比較しても有意差が認められた ( $P < 0.01$ )。卵丘細胞との共培養あるいはウサギ卵管内培養区の胚盤胞への発育率はそれぞれ 19.5、29.3%で栄養膜の小胞および羊膜細胞との共培養区に比べて、有意に低値を示した ( $P < 0.05$ )。

また、凍結可能とみなされた良好な形態を示す胚の割合は卵管上皮細胞、栄養膜の小胞、羊膜細胞との共培養区およびウサギ卵管内培養区で 15.5 ~ 27.5% 認められ、対照区 (0%) および卵丘細胞区 (3.7%) と比べて、有意に高値を示した ( $P < 0.05$ )。

受精後7日目に胚盤胞数がピークを示したのは栄養膜の小胞または羊膜細胞との共培養区であった。卵管上皮細胞または卵丘細胞との共培養区においては受精後8日目の方が7日目と比べて胚盤胞の出現が高い傾向にあった。また、ウサギ卵管内培養区では、明瞭なピークは認められなかった。

体外受精後、体外培養によって発育した胚の移植による受胎、分娩の結果は Table 13 に示した。卵丘細胞との共培養区から得られた新鮮胚の移植によって2頭中1頭の受卵牛が受胎、分娩した。また、卵管上皮細胞、栄養膜の小胞および羊膜細胞との共培養から得られた凍結融解胚の移植によって、16頭中6頭の受卵牛が受胎、分娩し、2組の双子を含む8頭の産子が得られた (Figure 10)。

### 考察

対照区の胚盤胞への発育率は1.9%と他の共培養区およびウサギ卵管内培養区に比べて、極端に低率であった。Thibault (1966)、Camous et al. (1984)、Eyestone and First (1986) および Heyman et al. (1987) はウシ初期胚の非共培養による体外培養で、



8～16細胞期に發育停止する胚が多く認められることを報告しており、本試験の成績と一致した。

各種細胞との共培養における胚盤胞への發育率および胚盤胞中の良好な形態を示す胚の割合は19.5～50.7%ならびに18.8～54.3%と、用いた細胞の違いによって差異が認められ、このことはウシ初期胚の体外での發育維持に対する作用機序が各種細胞によって異なる可能性が示唆された。Kuzan and Wright (1982) はウシ桑実胚のウシ纖維芽細胞との共培養による透明帯からの孵化率を検討し、胚と単層細胞との直接的な接触が發育率に影響すると述べている。しかし、本章の栄養膜の小胞あるいは羊膜細胞との共培養では、必ずしも胚と細胞との接触は必要としなかった。Heyman et al. (1987) およびEyestone and First (1989) はウシ栄養膜の小胞ならびにウシ卵管上皮細胞との培養液上清を用いても8～16細胞期以降への胚の發育が促進されることを報告している。各細胞の体外でのウシ初期胚に対する發育維持の作用機序については現在のところ不明であるが、共培養に用いた各種細胞が胚に対して何等かの代謝促進物質を産生しているか、あるいは今回用いた基礎培地の中に存在する胚にとっての有害物質を吸収代謝しているものと考えられる。

一方、ウサギを用いた卵管内培養では回収時に胚の一部損失(23.7%)が認められた。ヒツジ卵管内(Eyestone et al., 1985)あるいはウサギ卵管内(Aoyagi et al., 1988)での体内培養では約30%の胚の損失が報告されている。卵管上皮細胞、栄養膜の小胞および羊膜細胞との共培養による体外培養系の方が胚の損失を生じないこと、また、胚盤胞への發育率あるいは良好な形態を示す胚の割合からみても、これらの共培養系は体内培養と比べた場合、より有用な方法であることが明らかになった。



Heyman et al. (1987) は 1 ~ 8 細胞期のウシ体内受精胚を栄養膜の小胞と共培養して 46 % の胚が胚盤胞期に発育したことを報告している。本試験の同一の培養系の体外受精由来 8 細胞期胚の発育率は 50.7 % であり、体内受精胚と比べて遜色のないことが示された。また、栄養膜の小胞および羊膜細胞との共培養で得られた胚盤胞は他の細胞区と比べて、発育率およびその形態がより良好なこと、さらにその発育速度もより体内胚 (金川、1984) のそれに類似していること、さらにまた、それらの胚の凍結融解後に受胎性が証明されたことから、これら 2 種の培養系は体外受精由来の胚盤胞作出に有効な手段であると考えられた。とくに、体外受精由来 8 細胞期胚の体外培養にウシ羊膜細胞との共培養を行い、良好な成績を得たのは本試験が最初である。

#### 要約

ウシ体外受精卵の体外での発生率向上を目的として、各種細胞 (卵丘細胞、卵管上皮細胞、栄養膜の小胞、羊膜細胞) との共培養および細胞を含まない対照区ならびにウサギ卵管内培養で、胚盤胞への発生率を比較検討した。

T C M - 199 + 10 % F C S を基礎培地として、屠畜場由来のウシ卵巢から吸引して得た 1721 個の卵胞内卵子を  $\text{CO}_2$  インキュベーター (39℃、5 %  $\text{CO}_2$ 、95 % 空気、飽和湿度) 内で体外成熟させた。黒毛和種 1 頭の凍結精液を使用し、精子処理はカフェイン 5 m M およびイオノホア 0.1  $\mu$  M 30 秒処理によって行われた。4 時間の媒精後、T C M - 199 + 10 % F C S を基礎培地として、胚はさらに 68 時間培養され、卵丘細胞を除去して 414 個の 8 細胞期胚を選抜し、以下の



6区で培養を継続した。対照区としてTCM-199+10%FCSのみで培養、卵丘細胞の単層上で培養、卵管上皮細胞との共培養、栄養膜の小胞（過剰排卵処置牛より13日齢の胚を回収し、1~2mmに切断後、小胞化したもの）との共培養、羊膜細胞（妊娠2~4カ月齢の羊膜を約1mm<sup>2</sup>に切断した組織片）との共培養およびウサギ卵管内で体内培養を行った。なお、これらから得られた胚盤胞の一部は新鮮または凍結融解後、非外科的に受卵牛に1または2個ずつ移植された。

胚盤胞への発生率および凍結可能胚（良好な形態を示す胚）の割合はそれぞれ対照区で1.9%および0%、卵丘細胞との共培養区で19.5%および3.7%、卵管上皮細胞との共培養区で39.0%および18.6%、栄養膜の小胞との共培養区で50.7%および27.5%、羊膜細胞との共培養区では48.6%および24.3%であった。また、ウサギ卵管内培養区のそれらは29.3%および15.5%であった。卵管上皮、栄養膜の小胞および羊膜細胞との共培養によって得られた胚盤胞の凍結融解後の移植によって6頭の受卵牛が分娩し2組の双子を含む8頭の産子を得た。

以上の成績から、卵管上皮細胞、栄養膜の小胞または羊膜細胞との共培養によって体外受精由来の8細胞期胚の発生率は向上し、かつ、形態的にも良好な胚がより多く得られることが示唆された。とくに、体外受精由来の8細胞期胚の発育に羊膜細胞との共培養が有効なことは新知見である。



## 第5章 総括

ウシの体外受精による安定的な胚盤胞の生産技術を確立することを目的として、ウシの卵胞卵子の体外成熟、体外受精および体外受精由来胚の体外培養系に関する基礎的研究を行い、下記の知見を得た。

### 1) ウシ精子処理法におけるカフェインとイオノホアの併用が体外受精におよぼす影響

ウシ卵胞卵子の体外培養時間と核の成熟率との関係および体外受精時の精子処理におけるカフェイン、またはカフェインとイオノホア併用による体外受精率、卵割率ならびにウサギ卵管内移植後の桑実胚への発育率について比較検討を行った。

ウシ卵胞卵子の体外培養と成熟過程について、第二成熟分裂中期像から判定すると、培養開始後22時間目で成熟率はピークに達した。体外受精率はカフェイン区で53%、カフェインとイオノホア併用区で89%、また、全受精卵中の正常な受精卵の占める割合はカフェイン区で22%およびカフェインとイオノホア併用区で54%とどちらも両区間で有意差が認められた ( $P < 0.01$ )。受精後2日目の2細胞期以降への卵割率はカフェイン区で24%およびカフェインとイオノホアの併用区で43%を示し、両者間に有意差が認められた ( $P < 0.01$ )。しかし、ウサギ卵管内での<sup>分割胚の</sup>桑実胚以降への発育率はカフェイン区およびカフェインとイオノホアの併用区の間で有意差は認められなかった。

カフェインに対し、カフェインとイオノホアの併用による精子処理が体外受精率および初期卵割率の向上に有効であることが示唆された。



## 2) 種雄牛の個体差が体外受精およびその後の胚発生におよぼす影響

ウシ体外受精における種雄牛の個体差の影響を体外受精率、体外での卵割率およびウサギ卵管内移植後の桑実胚への発育率から比較検討した。

体外受精率は種雄牛5頭で84～94%の範囲で有意差は認められず、1頭の種雄牛(3-H)の凍結精液の受精率は53%と他牛に比べて有意に低値を示した( $P < 0.01$ )。卵割率は3-Hの個体のみ18%と低かったが、他牛のそれは39～49%の範囲内にあった。全受精卵中の正常な受精卵の占める割合は38～75%の範囲で6頭の種雄牛間でばらつきを認めた。また、卵割胚中の4細胞期胚の占める割合も39～71%で幅が認められた。卵割胚のウサギ卵管内での桑実胚への発育率は各種雄牛間で有意差は認められなかった。

種雄牛の個体差が体外受精に影響し、とくに、正常受精率および卵割胚中の4細胞期胚の占める割合に顕著に影響することが明かとなった。

## 3) 体外受精由来胚の体外培養、とくに共培養に関する検討

ウシ体外受精由来胚を各種細胞(卵丘細胞、卵管上皮細胞、栄養膜の小胞、羊膜細胞)と共培養するか、あるいはウサギ卵管内で培養し、さらに、細胞を含まない培養を対照区として、胚盤胞への発育率を比較検討した。

胚盤胞への発育率および良好な形態を示す胚盤胞の割合は、それぞれ対照区で2%および0%、卵丘細胞との共培養で20%および4%、卵管上皮細胞との共培養区で39%および18%、栄養膜の小胞との共培養区で51%および28%、羊膜細胞との共培養区では49%および



24%であった。また、ウサギ卵管内培養区のそれらは29%および16%であった。さらに、卵管上皮、栄養膜の小胞および羊膜細胞との共培養によって得られた胚盤胞の凍結融解後の移植によって6頭の受卵牛が分娩し、2組の双子を含む8頭の産子が得られた。

卵管上皮細胞、栄養膜の小胞または羊膜細胞との共培養によって体外受精由来の8細胞期胚の胚盤胞への発育率は向上し、形態的にも良好な胚がより多く得られることが示唆され、それらを受卵牛に移植した場合、正常な子牛として生まれることが確認された。



## 謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に終始暖かい御指導と御教示を賜った北海道大学獣医学部教授 金川弘司 博士に深甚の謝意を表する。また本実験を進めるに当り、たえず有意義な御指導と適切な御助言を頂いた北海道大学獣医学部助教授 高橋芳幸 博士、帯広畜産大学畜産学部教授 福井 豊博士および同大学同学部前教授 小野 斉博士に心から感謝の意を表する。

実験を行うに当り、絶大なる御支援ならびに御協力を頂いた北海道家畜改良事業団試験研究室室長 岩住安晃氏、ホクレン畜産実験牧場 古館誠氏、小坂祐司氏、北空知農業共済組合 峰岸義則氏、当時帯広畜産大学学生であった藤井勝巳君、浦河真実君、近松典子君ならびに北海道家畜改良事業団の諸氏に心から謝意を表する。

本研究の遂行上、絶大なる御支援を頂いた全農飼料畜産中央研究所 岩下宏所長はじめ、受精卵移植研究室の諸氏に深く感謝の意を表する。

本論文に対して御指導と御校閲を頂きました北海道大学獣医学部教授 波岡茂郎博士および杉村誠博士に深謝する。



STUDIES ON SPERM TREATMENTS AND CULTURE SYSTEMS OF EARLY  
STAGE BOVINE EMBRYOS IN RELATION TO IN VITRO FERTILIZATION

SUMMARY

The effects of semen treatments and semen from different bulls on in vitro fertilization results and the effect of culture systems of early stage embryos after in vitro fertilization were examined in order to establish a stable procedure to produce bovine blastocysts derived from in vitro maturation and in vitro fertilization.

Effects of two treatments on semen from different bulls  
on in vitro fertilization results of bovine oocytes

The spermatozoa from six different bulls were treated with caffeine or caffeine plus Ca-ionophore A23187 and their effects on in vitro fertilization, cleavage and development into morulae of in vitro matured bovine oocytes were investigated. In vitro fertilization results (formation of both pronuclei, cleavage and development to  $\geq$  four-cell stage) were significantly ( $P < 0.01$ ) higher using caffeine plus Ca-ionophore A23187 than those using only caffeine. The rates of fertilization and first cleavage were only slightly variable among the bulls. However, the present data showed significant variability in the formation of both pronuclei (36 to 75%) of fertilized embryos and development to the  $\geq$  four-cell stage (39 to 71%) by using semen from different bulls. Development into morulae of embryos recovered from the rabbit oviduct did not show any significant differences in relation to sperm treatments or individual bulls.



Effects of culture systems on the development of in vitro fertilized bovine embryos into blastocysts

The effects of co-culture with oviductal epithelial cells, cumulus cells, trophoblastic vesicles or amniotic sac cells on the development into blastocysts of bovine eight-cell embryos derived from in vitro maturation and fertilization were examined. Frozen-thawed spermatozoa were treated with caffeine plus Ca-ionophore A23187 for capacitation and were then co-incubated for 4 h with oocytes matured in vitro. Fertilized embryos resulting from this in vitro fertilization were cultured in HEPES-buffered TCM-199 plus 10% fetal calf serum(FCS) for 68 h and then removed from the cumulus cell mass. The eight-cell embryos were cultured using four co-culture systems either without cells(controls) or within the rabbit oviducts. The co-culture of oviductal epithelial cells, trophoblastic vesicles or amniotic sac cells significantly( $P < 0.05$ ) increased development into blastocysts(39.0 to 50.7%) when compared to co-culture with cumulus cells, control or rabbit oviducts(1.9 to 29.3%). Six of 16 recipients became pregnant with frozen-thawed embryos derived from co-culture with oviductal epithelial cells(1/2), trophoblastic vesicles(2/7) or amniotic sac cells(3/7). Eight calves, including two sets of twins, were subsequently born.

The results have demonstrated that co-culture of embryos with oviductal epithelial cells, trophoblastic vesicles or amniotic



sac cells is a useful method for enhancing development of in vitro fertilized bovine eight cell stage embryos into blastocysts and for producing normal calves using frozen-thawed embryos derived from in vitro maturation and fertilization.

It is obvious that this study is useful to stabilize production of blastocyst stage embryo by bovine in vitro fertilization and contribute to the practical application of bovine embryo transfer.

4. 斎藤【敬】，佐田【敬】，利根【敬】，堀【敬】，高田【敬】，佐藤【敬】，佐々木【敬】，藤田【敬】，正木【敬】，「日本獣医学雑誌」，47，1983，197-198。
5. 斎藤【敬】，佐田【敬】，利根【敬】，堀【敬】，高田【敬】，佐藤【敬】，佐々木【敬】，藤田【敬】，正木【敬】，「日本獣医学雑誌」，47，1983，197-198。
6. 斎藤【敬】，佐田【敬】，利根【敬】，堀【敬】，高田【敬】，佐藤【敬】，佐々木【敬】，藤田【敬】，正木【敬】，「日本獣医学雑誌」，47，1983，197-198。
7. 斎藤【敬】，佐田【敬】，利根【敬】，堀【敬】，高田【敬】，佐藤【敬】，佐々木【敬】，藤田【敬】，正木【敬】，「日本獣医学雑誌」，47，1983，197-198。
8. 斎藤【敬】，佐田【敬】，利根【敬】，堀【敬】，高田【敬】，佐藤【敬】，佐々木【敬】，藤田【敬】，正木【敬】，「日本獣医学雑誌」，47，1983，197-198。
9. 斎藤【敬】，佐田【敬】，利根【敬】，堀【敬】，高田【敬】，佐藤【敬】，佐々木【敬】，藤田【敬】，正木【敬】，「日本獣医学雑誌」，47，1983，197-198。
10. 斎藤【敬】，佐田【敬】，利根【敬】，堀【敬】，高田【敬】，佐藤【敬】，佐々木【敬】，藤田【敬】，正木【敬】，「日本獣医学雑誌」，47，1983，197-198。



# 参考文献

- 1 . Aoyagi, Y., Fujii, K., Iwazumi, Y., Furudate, M., Fukui, Y. and Ono, H. (1988) Effects of two treatments on semen from different bulls on in vitro fertilization results of bovine oocytes. *Theriogenology*, 30, 973-985.
- 2 . Aoyagi, Y., Fukui, Y., Iwazumi, Y., Urakawa, M. and Ono, H. (1990) Effects of culture systems on development of in vitro fertilized bovine ova into blastocysts. *Theriogenology*, 34, 749-760.
- 3 . 青柳 (敬), 岩住 (安), 小坂 (祐), 古館 (誠) (1990) 植氷までの時間と脱グリセリン温度がウシ凍結胚の生存および受胎におよぼす影響. *家畜繁殖誌*, 36, 245-248.
- 4 . 青柳 (敬), 岩住 (安), 和地 (秀), 権 (五), 高橋 (芳), 金川 (弘), 宮本 (明), 梅津 (元), 正木 (淳) (1987) ウシの過剰排卵処置における PMSG と FSH の比較, とくに血漿ステロイドホルモンの動態と胚回収成績について. *家畜繁殖誌*, 33, 167-172.
- 5 . Austin, C. R. (1951) Observations on the penetration of the sperm into mammalian egg. *Aust. J. Sci. Res. Ser. B*, 4, 581-596.
- 6 . Austin, C. R. and Bishop, M. W. H. (1958) Role of rodent acrosome and perforatium in fertilization. *Proc. Roy. Soc. Ser. B*, 149, 234-240.
- 7 . Bavister, B. D. (1988) Role of oviductal secretions in embryonic growth in vivo and in vitro. *Theriogenology*, 29, 143-154.
- 8 . Boland M. P. (1984) Use of rabbit oviducts as a screening tool for the viability of mammalian eggs. *Theriogenology*, 21, 126-137.
- 9 . Bondioli, K. R. (1983) In vitro fertilization of ovine and bovine oocytes. *Diss. Abstr. Int.*, 43, 2751B, P.83. Abstr.
- 10 . Brackett, B. G., Bonsquest, D., Boice, M. L., Donawick, W. J., Evans, J. F. and Dressel, M. A. (1982) Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol. Reprod.*, 27, 147-158.



- 1 1 . Brackett, B.G., Oh, Y. K., Evans, J. F. and Donawick, W. J. (1980) Fertilization and early development of cow ova. Biol. Reprod., 23, 189-205.
- 1 2 . Brackett, B. G. and Oliphant, G. (1975) Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. Biol. Reprod., 12, 260-274.
- 1 3 . Byrd, W. (1981) In vitro capacitation and the chemically induced acrosome reaction in bovine spermatozoa. J. Exp. Zool., 215, 35-46.
- 1 4 . Camous, S., Heyman, Y., Meziou, W. and Menezo, Y. (1984) Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. J. Reprod. Fertil., 72, 479-485.
- 1 5 . Chang, M. C. (1951) Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in the fallopian tubes. Nature, 168, 697-698.
- 1 6 . Chang, M. C. (1957) A detrimental effect of rabbit seminal plasma on the fertilizing capacity of sperm. Nature, 179, 258-259.
- 1 7 . Chang, M. C. (1959) Fertilization of rabbit ova in vitro. Nature, 184, 466-467.
- 1 8 . Critser, E. S., Leibfried, M. L., Eyestone, W. H., Northey, D. L. and First, N. L. (1986) Acquisition of developmental competence during maturation in vitro. Theriogenology, 25, 150. Abstr.
- 1 9 . Critser, E. S., Leibfried, M. L. and First, N. L. (1984) The effect of semen extension, cAMP and caffeine on in vitro fertilization of bovine oocytes. Theriogenology, 21, 625-631.
- 2 0 . Dauzier, L. and Thibault, C. (1956) Recherche experimentales sur la maturation des gametes males chez les mammiferes, par l'etude de la fecondation in vitro de la lapine. Proc. 3rd Int. Congr. Anim. Reprod. and AI, Cambridge, Section I, 58-61.
- 2 1 . Dauzier, L., Thibault, C. and Winterberger, S. (1954) La Fecondation in vitro de l'oeuf de la lapine. C. R. Acad. Sci., 238, 844. Abstr.



- 2 2 . Eyestone, W. H. and First, N. L. (1986) A study of the 8- to 16-cell developmental block in bovine embryos cultured in vitro. *Theriogenology*, 25, 152. Abstr.
- 2 3 . Eyestone, W. H. and First, N. L. (1989) Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fertil.*, 85. 715-720.
- 2 4 . Eyestone, W. H., Northey, D. L. and Leibfried-Rutledge, M. L. (1985) Culture of 1-cell bovine embryos in the sheep oviduct. *Biol. Reprod.*, 32, 100. Abstr.
- 2 5 . Eyestone, W. H., Vignieri, J. and First, N. L. (1987) Co-culture of early bovine embryos with oviductal epithelium. *Theriogenology*, 27, 228. Abstr.
- 2 6 . Fukuda, Y., Ichikawa, M., Naito, K. and Toyoda, Y. (1989) 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.
- 2 7 . Fukui, Y., Fukushima, M. and Ono, H. (1983) Fertilization of bovine oocytes after various sperm procedures. *Theriogenology*, 20, 651-660.
- 2 8 . Fukui, Y. and Ono, H. (1989) In vitro development to blastocysts of in vitro matured and fertilized bovine oocytes. *Vet. Rec.*, 122, 282.
- 2 9 . Gandolfi, F. and Moor, R. M. (1987) Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fertil.*, 81, 23-28.
- 3 0 . 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. Fertil.*, 83, 753-758.
- 3 1 . 花田 (章) (1985) ウシにおける体外受精 - とくにイオノホアによる精子の受精能獲得 -. *家畜繁殖誌*, 31, 56-61.



- 3 2 . Hanada, A. and Nagase, H. (1981) Effects of sperm preincubation in rabbit uterus and of imidazole on the penetration of zona-free hamster eggs by bull and boar spermatozoa in vitro. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 27, 113-119.
- 3 3 . 花田 (章) , 塩谷 (康) , 鈴木 (達) (1986) 体外成熟卵子の体外受精により得られた牛胚の非外科的移植による受胎出産例. 第78回 日本畜産学会講演要旨, 1-36, pp 18.
- 3 4 . Heape, W. (1891) Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster mother. *Proc. Roy. Soc. Lond.*, 48, 457-458.
- 3 5 . Heyman, Y., Menezo, Y., Chesne, P., Camous, S. and Garnier, V. (1987) In vitro cleavage of bovine and ovine early embryos: improved development using co-culture with trophoblastic vesicles. *Theriogenology*, 27, 59-68.
- 3 6 . Iritani, A. and Niwa, K. (1977) Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fertil.*, 50, 119-121.
- 3 7 . Iritani, A., Utsumi, K., Miyake, M. and Yamaguchi, Y. (1986) Individual variation in the in vitro fertilizing ability of bull spermatozoa. *Proc. 5th Int. Sympo. Sperma.*, 35, 45. Abstr.
- 3 8 . Iwamatsu, T. and Chang, M. C. (1969) In vitro fertilization of mouse eggs in the presence of bovine follicular fluid. *Nature*, 224, 919-920.
- 3 9 . 梶原 (豊) , 後藤 (和) , 小坂 (昭) , 中西 (喜) , 小川 (清) (1987) 牛卵胞卵子の体外受精および体外培養によるふ化. 家畜繁殖誌, 133, 173-180.
- 4 0 . 金川 (弘) (1984) ウシの受精卵移植. 近代出版, 東京.
- 4 1 . Kuzan, F. B. and Wright, R. W., Jr. (1982) Observations on the development of bovine morulae on various cellular and noncellular substrata. *J. Anim. Sci.*, 54, 811-816.
- 4 2 . Kvansnickii, A. V. (1951) Interbreed ova transplantation. *Sovetsk. Zootekh.*, 1, 36-42.



- 4 3 . Lee, C. N., Lenz, R. W. and Ax, R. L. (1983) Bovine sperm undergo capacitation where exposed to glycosaminoglycans in vitro. J. Anim. Sci., 57, 352. Abstr.
- 4 4 . Leibfried, L. and First, N. L. (1979) Characterisation of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. J. Anim. Sci., 48, 76-86.
- 4 5 . Lenz, R. W., Ball, G. D., Lohse, J. K., First, N. L. and Ax, R. L. (1983) Chondroitin sulfate facilitates an acrosome reaction in bovine spermatozoa as evidenced by light microscopy, electron microscopy and in vitro fertilization. Biol. Reprod., 28, 683-690.
- 4 6 . Lu, K. H., Gordon, I., Chen, H. B., Gallagher, M. and McGovern, H. (1988) Birth of twins after transfer of cattle embryos produced by in vitro techniques. Vet. Rec., 122, 539-540.
- 4 7 . Lu, K. H., Gordon, I., Gallagher, M. and McGovern, H. (1987) Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in-vitro fertilization of oocytes matured in-vitro. Vet. Rec., 121, 259-260.
- 4 8 . Nicholas, J. S. (1933) Development of transplanted rat eggs. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 30, 1111-1113.
- 4 9 . Oguri, N. and Tsutsumi, Y. (1974) Non-surgical egg transfer in mares. J. Reprod. Fertil., 41, 313-320.
- 5 0 . Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L. and First, N. L. (1985a) In vitro fertilization of bovine oocytes using heparin treated and swimup separated frozen-thawed bovine semen repeatable and results in high frequencies of fertilization. Theriogenology, 23, 216. Abstr.
- 5 1 . Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L. and First, N. L. (1985b) Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm in vitro. Theriogenology, 24, 537-549.
- 5 2 . Seigel, M. and Graves, C. N. (1981) Protein effects on bovine sperm acrosomal morphology and penetration and binding to bovine oocytes. J. Anim. Sci., 53, 591. Abstr.



53. Sirard, M. A. and Lambert, R. D. (1985) In vitro fertilization of bovine follicular oocytes obtained by laparoscopy. *Biol. Reprod.*, 33, 487-494.
54. Sirard, M. A. and Lambert, R. D. (1986) Birth of calves after in vitro fertilization using laparoscopy and rabbit oviduct incubation of zygotes. *Vet. Rec.*, 119, 167-169.
55. Sirard, M. A., Lambert, R. D. and Beland, R. (1984) Evaluation of bovine capacitation by in vitro fertilization. *Theriogenology*, 21, 261. Abstr.
56. Sirard, M. A., Lambert, R. D., Menard, D. P. and Bedoya, M. (1985) Pregnancies after in-vitro fertilization of cow follicular oocytes, their incubation in rabbit oviduct and their transfer to the cow uterus. *J. Reprod. Fertil.*, 75, 551-556.
57. 菅原 (七) , 浜野 (光) , 亀山 (賢) , 橋本 (伸) , 正木 (淳) (1985) ウシにおける体外受精 - ウシ卵胞液処理によるウシ凍結保存精子の受精能獲得 - . 家畜繁殖誌, 31, 62-67.
58. Suss, U. and Wuthrich, K. (1985) Stages of the first meiotic division observed in bovine oocytes matured in vitro. *Theriogenology*, 23, 231, Abstr.
59. 高橋 (芳) , 花田 (章) (1984) イオノホア A23187 で処理したウシ射出精子の体外における透明帯除去ハムスター卵への侵入. 家畜繁殖誌, 30, 30-39.
60. Takeda, T., Elsdén, R. P. and Seidel, G. E. Jr. (1985) Survival of cryopreserved bovine embryos cooled at 0.5 or 1°C/minute. *Theriogenology*, 23, 232. Abstr.
61. Thibault, C. (1966) La culture in vitro de l'oeuf de vache. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* 6, 159-164.
62. Thibault, C. and Gerard, M. (1973) Cytoplasmic and nuclear maturation of rabbit oocytes in vitro. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* 13, Suppl., 145-156.
63. Thibault, C., Gerard, M. and Menezo, Y. (1975) Acquisition par l'oocyte de lapine et veau du facteur de decondensation du noyau du spermatozoïde fécondant (MPGH). *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* 15, 705-714.

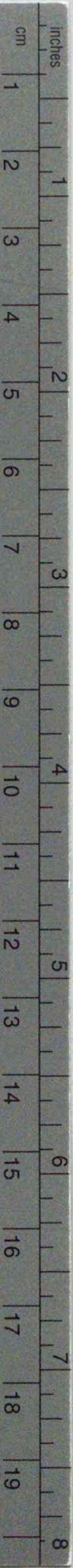


64. 豊田 (裕) (1985) ブタにおける体外受精  
-とくにイオノホアによる受精能獲得- 家畜繁殖誌,  
31, 40-44.
65. Toyoda, Y. and Chang, M. C. (1974) Fertilization of rat  
eggs in vitro by epididymal spermatozoa and development  
of eggs following transfer. J. Reprod. Fertil., 36,9-22.
66. Trounson, A. (1984) In vitro fertilization and embryo  
preservation. In "In vitro fertilization and embryo  
transfer", eds, Trounson, A. and Wood, C., Churchill  
Livingstone. UK., pp.111-130.
67. Warwick, B. L., Berry, R. O. and Horlacher, W. R. (1935)  
Results of mating rams to angora female goats. Proc.  
Am. Soc. Anim. Prod. 27th Ann. Meet., 225-227.
68. Willett, F. L., Black, W. G., Casida, L. E., Stone, W. H.  
and Buckner, P. J. (1951) Successful transplantation of  
a fertilized bovine ovum. Science, 113, 247.
69. Xu, K. P., Greve, T., Smith, S., Liehman, P. and Hyttel,  
P. (1986) Parthenogenetic activation of cattle oocytes  
matured in vitro and cultured in rabbit oviducts.  
Theriogenology, 25, 218. Abstr.
70. Yanagimachi, R. (1972) In vitro fertilization of guinea  
pig ova. Anat. Rec., 430.
71. Yanagimachi, R. and Chang, M. C. (1963) Fertilization of  
hamster eggs in vitro. Nature, 200, 281-282.
72. Zuckerman, A. and Alvarez, F. (1980) Sperm capacitation  
and in vitro fertilization in cattle. Vet. Med., 11,  
119-120. Abstr.





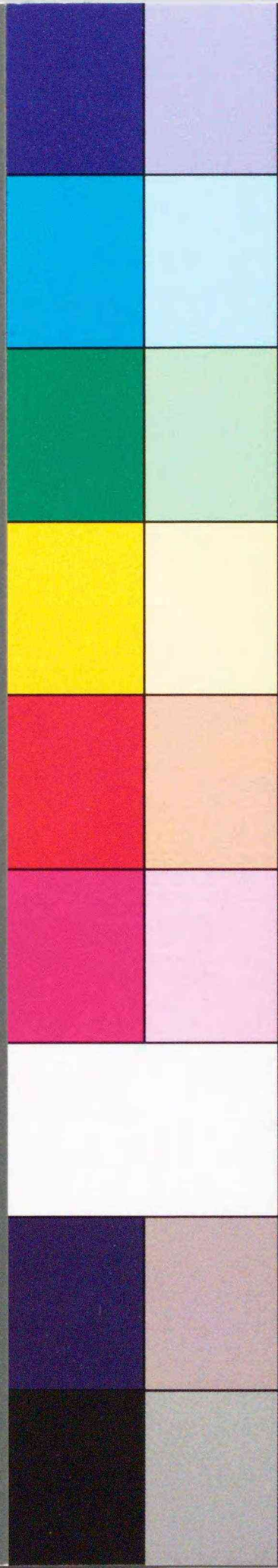




# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



# Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

