

# 排卵誘発妊娠による心身障害児発生の防止 対策に関する研究

## 特に体外受精卵の染色体標本作成法に関する 基礎的検討

東京大学医学部産科婦人科学教室

水野正彦・佐藤孝直  
是沢光彦

### 1. 目 的

排卵誘発剤を使用すると、多胎妊娠のみならず、異常卵も増加するかどうか、先天異常児発生防止と関連して注目されている。われわれは、これまで本研究において、排卵誘発剤使用妊娠では、初期流産が増加すること、またラットに、PMS-HCGによる過排卵をおこすと、受精卵の異常が増加することなどを報告してきた。

さて、排卵誘発による卵の異常のうち、染色体異常の占める意義は大きいものと思われるが、発生した染色体異常受精卵の多くは、着床前に死滅したり、着床しても早期に流産すると考えられるので、染色体異常をおこすかどうかを検討するには、受精直後の卵子の染色体分析が必要である。このような目的には、誘発された卵を体外受精させて観察するのが、最も適した方法である。

以上より、今回は、まず排卵誘発が受精卵に異常をひきおこすメカニズムを研究するため、マウスを用い、過排卵卵子の体外受精と、その受精卵の1細胞期における染色体分析の方法について、基礎的な検討を加えた。

### 2. 方 法

#### <実験方法>

Swiss-Webster Albino 成熟マウスを用いた。体外受精 (fig 1) は、基本的には、豊田らの方法に準じて行った。すなわち卵は、PMS・HCGをそれぞれ7単位48時間間隔で投与した雌マウスから、HCG投与後13-15時間後に、ミネラルオイル下の培養液中に回収した。精子浮遊液は、Cauda Epididymisを細切りして採取した精子より作成した。体外受精は、事前に2-3時間培養したミネラルオイル下の卵に、精子浮遊液を最終濃度が1000/mlになるように添加して施

行した。培養液は、豊田らの Modified Ringer Solutionを用いたが、使用直前に、1N HClでpH7.4に調節し、4mg/mlのBovine Serum Albuminを加えた。なお、受精のための培養液量は、0.4mlである。

精子添加後10時間目に、Colcemidもしくは、Vinblastine ( $1 \times 10^{-6}$  mg/cc)を加え、さらに14時間培養の後、美甘 (Chinese Hamster), Tarkowshi (M-ouse)の方法を改良した fig 2で示す方法により染色体分析を行ない、metaphase plateが、Colcemid, Vinblastineのいずれの方法でより多く得られるかを検討した。

### 3. 結 果

fig 3に示すごとく、Colcemidで25個、Vinblastineで29個の卵につき検討したが、前者で9/20 (45.0%)、後者で25/29 (92.6%)のmetaphase Plateを得ることが出来た。明らかに、Vinblastineの方が有効であることを示している。Vinblastineを用い、改良した標本作成法で作った染色体標本の一例をfig 4に示した。また、全体で3倍体の割合は、5/47 (10.6%)であった。

### 4. 考 察

Vinblastineによる方が、Colcemidに較べて明らかに高率で、観察可能なmetaphase Plateを得ることができることがわかった。Colcemidでは、PronucleusのStageで発育が止まるものが多く、これが、両者の差となって現われたものと考えられる。

また、卵の染色体標本作成法に関しては、低調液処理は種々の濃度のFetal Calf Serumを用いるよりも、1% Sodium Citrateを用いる方が適していることが推定された。更にまた、Tarkowshiの方法

では、スライドグラス上で、卵に固定液を添加するため卵を見失なうことがあるが、これに対して、美甘らの方法では、一次的な固定をスライドグラスに卵を移す前に行っている。これは、卵の流出を防止するよい方法であると思われる。一次的な固定にはDistilled Waterを用いるよりもカルノア固定液を1% Sodium Citrateで希釈したものを用いる方が、卵が破壊され

にくいことがわかった。(Fig. 4)

以上により、豊田らの方法に準じて体外受精を行ない、Vinblastineで分裂を中断し、改良した方法で染色体標本を作成すれば、分析可能な染色体標本が高率に得られることがわかった。この実験系を用いれば排卵誘発の卵に及ぼす影響を *in vitro* で効率良く研究することができると思われる。

Fig. 1 MOUSE IN VITRO FERTILIZATION (SWISS-WEBSTER ALBINO)

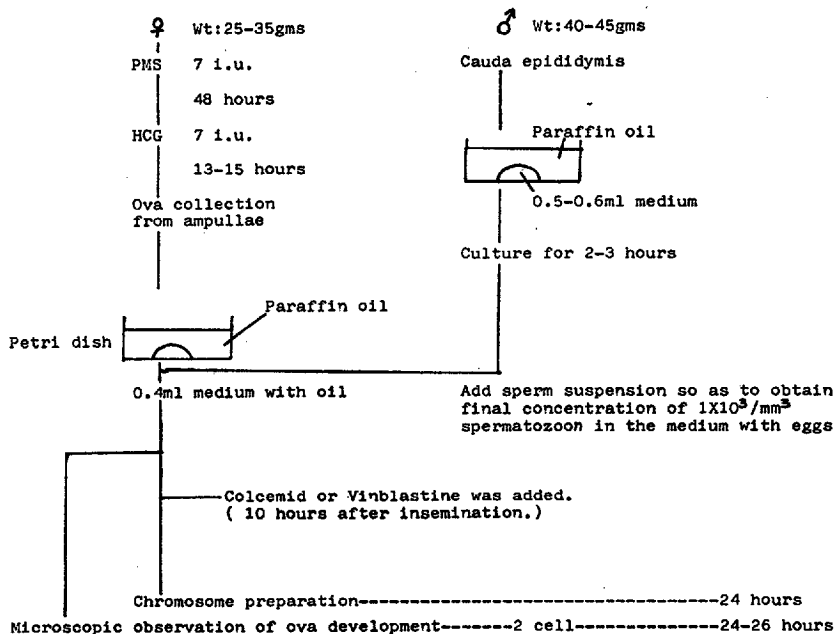


Fig. 2

METHODS TO MAKE CHROMOSOME PREPARATIONS OF MOUSE 1-CELL EGGS

- 1) Hypotonic treatment: 1% sodium citrate 10 minutes ( 5-15 minutes )
- 2) Fixation: 3 volume, metanol + 1 volume, acetic acid + 9 volume, 1 % Sodium citrate 5 minutes.
- 3) Transfer the eggs onto clean glass slide by pipette under a dissecting microscope.
- 4) Final fixation by adding 3 or 4 dtops of Carnoy fixative at enough intervals.  
Each drop should be added under a disscing microscope.
- 5) Air dried.

Fig. 3

THE EFFECT OF COLCEMID AND VINBLASTINE ON THE DEVELOPMENT OF FERTILIZED EGGS

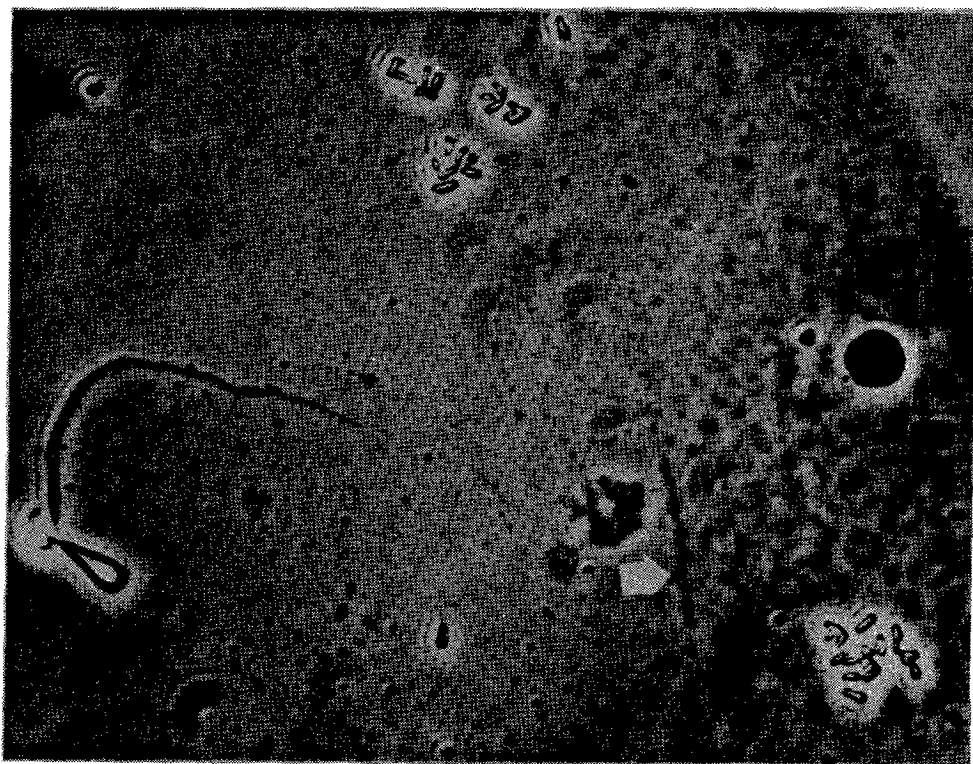
	Dish No.	No. of eggs examined	Metaphase		Pronucleus		Unclassified +Unfertilized
			Diploid	Triploid	Diploid	Triploid	
Colcemid	A1	12	5	0	4	2	1
	A2	7	0	0	4	0	3
	B1	6	3	1	1	0	1
	<b>Total</b>	<b>25</b>	8 } 1 9		9 } 2 11		<b>4</b>
Vinblastine	B2	14	10	2	0	0	2
	C1	7	6	0	1	0	0
	C2	8	7	0	1	0	0
	<b>Total</b>	<b>29</b>	23 } 2 25		2 } 0 2		<b>2</b>

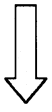
\* Colcemid and vinblastine were added to the culture medium 10 hours after insemination.

\* Summary: 1. Incidence of triploidy 5/47= 10.6%  
2. Incidence of metaphase plates

Colcemid 9/20=45.0%  
Vinblastine 25/27=92.6%

Fig. 4





**検索用テキスト** OCR(光学的文字認識)ソフト使用  
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



## 1. 目的

排卵誘発剤を使用すると、多胎妊娠のみならず、異常卵も増加するかどうか、先天異常児発生防止と関連して注目されている。われわれは、これまで本研究において、排卵誘発剤使用妊娠では、初期流産が増加すること、またラットに、PMS-HCG による過排卵をおこすと、受精卵の異常が増加することなどを報告してきた。