

誘発排卵妊娠による心身障害発生に関する研究

体外培養による胚の発生能の検討

北里大学畜産学部家畜繁殖学教室

豊田 裕

研究目的

前年度の研究結果¹⁾から、受精途上で判定する限り、自然排卵卵子と誘発排卵卵子との間に受精率および異常受精出現頻度に差は認められなかったため、本年度は受精後の発生能について比較検討した。

研究方法

前年度と同じく、実験にはすべてICR系成熟マウスを用いた。

(1) 排卵の誘起

i) 自然排卵；比較的規則正しい性周期を示す成熟雌マウス（2～5ヶ月令）について膣垢像から排卵日を判定した。排卵数（平均値±標準誤差）は 12.7 ± 1.43 であった。

ii) 誘発排卵；成熟マウスに対し、性周期の時期に関係なく、1.25、5、10または20 i.u.のPMSGを腹腔内注射し、48時間後に5 i.u.のHCGを同じく腹腔内注射して排卵を誘起した。排卵数（平均値±標準誤差）は、1.25、5、10および20 i.u. PMSG投与区でそれぞれ、 12.0 ± 2.50 、 26.6 ± 5.74 、 24.0 ± 3.13 、および 7.13 ± 1.04 であった。自然排卵数と比較し、1.25 i.u.区は差がなく、5および10 i.u.区は有意に高く、また、20 i.u.区は有意に低い値を示した。

(2) 受精卵の採取

自然排卵動物については発情前期の日の夕刻、また誘発排卵動物についてはHCG投与後直ちに成熟雄と同居させ、翌朝、膣栓の有無によって交配成立を判定した。交配の確認された動物はその翌日の午前9～10時に殺し、卵管灌流法によって2細胞期胚を採取した。

(3) 受精卵の培養

卵管から採取した2細胞期胚はマウス受精卵

培養用標準培地²⁾へ移し、炭酸ガス培養装置内で72時間培養し、胚盤胞への発生を観察した。培養途上における発生段階は12時間毎に培養顕微鏡下で検査した。

研究結果

(1) 自然排卵と誘発排卵（5 i.u. PMSG）の比較

培養開始から72時間まで、12時間毎の発生段階は表1および2に示す通りである。

自然排卵区では培養に供された30個の2細胞期胚のうち24個（80%）は24時間以内に4細胞期以上へ発生し、16個（53%）が最終的に胚盤胞へ発生した。

一方、並行して培養された誘発排卵由来胚の発生率は、培養開始後24時間で67%が4細胞期以上へ進み、最終的に胚盤胞への発生が認められたものは全体の58%に相当する26個であった。

以上の如く、両実験区の発生率には有意の差は認められなかった。

(2) PMSG投与量と胚の発生率との関連

表3、に示される如く、1.25および5 i.u. PMSG投与区では、培養72時間でそれぞれ、67%および70%の胚が胚盤胞に達し、自然排卵区と同様の高い発生率が得られた。

一方、10 i.u. PMSG投与区では受精率（2細胞期胚数/回収卵子数）は1.25および5 i.u.区とほぼ同じ高い値（81%）を示したが、培養24時間で4細胞期以上に達した胚は培養卵の61%とやや低く、最終的に胚盤胞へ達したものはわずかに17%と、著しい低下を認めた。20 i.u.区では排卵数が少なく、受精率も低い（42%）ために培養卵子数が少ないが、最終的に胚盤胞へ達した胚はわずか1個であった。

考 察

本実験の結果から、体外培養による2-細胞期から胚盤胞への発生成績で判断する限り、自然排卵数とほぼ同数の誘発排卵を招来するPMSG投与量(1.25 i.u.)では、誘発排卵に由来する胚の発生成能は自然排卵の場合と変わらないと考えられる。また、過排卵が誘起される場合でも、比較的低用量(5 i.u.)のPMSG投与は胚の発生成能に悪影響を及ぼさないと考えられる。

一方、排卵反応からみて、過剰な投与量と判断される10および20 i.u. 投与区では、明らかな発生成能の低下が認められた。この結果は、排卵誘発のための性腺刺激ホルモンの過剰投与が、排卵卵子の発生成能の低下をもたらす可能性を示唆する。ただし、本実験では、受精卵は2-細胞期で体外にとり出され培養に供されているので、発生成能の低下が排卵卵子そのものの異常に基づくのか、2-細胞期に達するまでの卵管内環境の異常に基づくのか明らかでない。今後、排卵直前または直後の卵子を一定環境下で体外受精し、発生成能を検討することが必要と思われる。また、胚盤胞の正常性を細胞遺伝学的に、さらに受精卵移植により検討することも今後に残された重要な課題と考えられる。

要 約

誘発排卵に由来する胚の発生成能を同一環境下で比較検討する目的で、PMSG-HCG投与を受けたICR系成熟雌マウスの卵管から2-細胞期胚を採取し、炭酸ガス培養装置内で72時間培養して胚盤胞への発生を観察した。

その結果、低用量(1.25および5 i.u.)のPMSG投与区では胚の発生率は自然排卵区と同じであったが、投与量が高い(10および20 i.u.)場合には発生率の低下が認められ、過剰量の性腺刺激ホルモンの投与が胚の発生成能の低下をもたらすことが推察された。

文 献

- 1) 豊田 裕：誘発排卵妊娠による心身障害発生に関する研究。本報告(昭50)
- 2) 笠井健吉・福田芳詔・豊田 裕：アンプル法によるマウスの受精卵の培養について。第17回哺乳動物卵子談話会要旨(昭51.4月)

表1

CULTURE OF MOUSE EMBRYOS FROM 2-CELL STAGE TO BLASTOCYST (SPONTANEOUS OVULATION)
(JCL-ICR♀ x JCL-ICR♂)

| CULTURE PERIOD (Hr) | STAGE OF DEVELOPMENT | | | | | | | | | | | |
|---------------------|----------------------|--------|--------|----------|--------|------------|-----|-----|---|------|-------|-----|
| | 2-CELL | 3-CELL | 4-CELL | 5-7-CELL | 8-CELL | BLASTOCYST | | | | | OTHER | |
| | | | | | | MORULA | E.B | S.B | B | LE.B | | H.B |
| 12 | 18 | 4 | 8 | | | | | | | | | |
| 24 | 2 | 4 | 19 | 4 | I | | | | | | | |
| 36 | 1 | I | 4 | 5 | | 19 | | | | | | |
| 48 | | I | 2 | 5 | | 23 | | | | | | |
| 60 | | I | 2 | 2 | | 13 | 2 | 4 | 5 | | | |
| 72 | | | | | | | 2 | 2 | 8 | 3 | I | 14 |

表2 CULTURE OF MOUSE EMBRYOS FROM 2-CELL STAGE TO BLASTOCYST (INDUCED OVULATION)
(JCL-1CR ♀ x JCL-1CR ♂)

| CULTURE PERIOD (Hr) | STAGE OF DEVELOPMENT | | | | | | | | | | | |
|---------------------|----------------------|--------|--------|----------|--------|--------|------------|-----|----|------|-----|-------|
| | 2-CELL | 3-CELL | 4-CELL | 5-7-CELL | 8-CELL | MORULA | BLASTOCYST | | | | | OTHER |
| | | | | | | | E.B | S.B | B | LE.B | H.B | |
| 12 | 29 | 4 | 12 | | | | | | | | | |
| 24 | 11 | 3 | 17 | 9 | 4 | | | | | | | 1 |
| 36 | 8 | 3 | 4 | 2 | 4 | 20 | | | | | | 4 |
| 48 | 7 | 3 | 2 | 2 | | 24 | 1 | | | | | 5 |
| 60 | 8 | 2 | | 1 | | 6 | 7 | 3 | 9 | 3 | | 6 |
| 72 | 2 | | | | | | 4 | | 13 | 8 | 1 | 16 |

表3 DOSE OF PMSG AND DEVELOPMENT OF MOUSE EMBRYOS IN VITRO

| DOSE OF PMSG (I.U) | No. OF FEMALES | No. OF 2-CELL OVA No. OVA RECOVERED | No. OVA CULTURED | No. OVA DEVELOPED TO: | | |
|--------------------|----------------|--|------------------|-----------------------|----------------|-------------------|
| | | | | ≥4-CELL (24HR) | ≥MORULA (60HR) | BLASTOCYST (72HR) |
| 1.25 | 7 | 64/73 (87.7)% | 64 | 58(94)% | 48(75)% | 43(67)% |
| 5 | 10 | 108/136(79.4) | 106 | 88(83) | 86(81) | 74(70) |
| 10 | 5 | 103/127(81.1) | 103 | 51(61) | 19(18) | 18(17) |
| 20 | 4 | 10/24 (41.7) | 10 | 5(50) | 4(40) | 1(10) |

↓ 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

研究目的

前年度の研究結果 1)から,受精途上で判定する限り,自然材排卵卵子と誘発排卵卵子との間に受精率および異常受精出現頻度に差は認められなかったので,本年度は受精後の発生能について比較検討した。