

## ラットの人工妊娠に関する研究

### 1. ラット受精卵の子宮内移植

湯原正高・内海恭三・野上与志郎

坂本寿文・奥山 博

(家畜繁殖学研究室)

Received July 2, 1973

## Studies on Artificial Pregnancy in Rat

### 1. Survival of Ova Transferred into the Uterus of Rat

Masataka YUHARA, Kyozo UTSUMI, Yoshiro NOGAMI,

Toshifumi SAKAMOTO and Hiroshi OKUYAMA

(Laboratory of Animal Reproduction)

The present experiment was designed to determine the survival of transferred ova. Adult Wister female rats, weighing 200 to 240 grams, were used as donors or recipients. The day on which the vaginal plug was first observed was called the 1st day of pregnancy or pseudopregnancy.

In order to determine whether the flushing and transferring techniques were authentic, fresh 3-day ova (4-cell in the oviduct) were transferred into the uteri of 3-day recipients. After 40-hour *in utero* incubation, the flushing was examined microscopically for normalcy of the development. The normal cleavage was observed in all recipients.

On the 5th day of pregnancy the ova were recovered from donor rats and transferred into the uteri of recipient rats of 5-day pseudopregnancy. The uterine tube was flushed *in vivo* with physiological saline and inactivated rat plasma (2:1). The flushings were examined microscopically for normalcy of the development.

In the first experiment, the ova were incubated *in vitro* for 2 hours at 30°C with flushing medium and the aging ova were transferred. The recipients were autopsied at 16 days pseudopregnancy and viable fetus was recorded, and at the same time the placental remnants of swelling were examined. The percentage of normally survived embryos were only 3.8 %.

In the second experiment, the interval between embryo (blastocyst) recovery and subsequent transference ranged from 10 to 20 minutes. In this case, the rate of implantation per uterus was 80 % and the rate of viable embryo per transferred ovum was 46 %.

Thus, the short interval between embryo recovery and subsequent transference seemed most essential to the successful transplantation of the ova of blastocyst stage. Additionally, if the embryos were transferred in a minimum volume of medium, the favorable result would be expected.

## 緒 言

マウス、ラットおよびウサギなど実験用小動物の受精卵の移植に関する研究は、受精卵の着床機構の解明、妊娠の維持と分娩および母体効果の究明など動物や家畜の繁殖にきわめて重要

な意義をもつものと思われる。とくに、家畜における受精卵の移植—人工妊娠—は家畜の改良のみならず食糧増産上にも将来大きな役割を果すことが予測される。

実験用小動物のうち、マウスやウサギについて受精卵の移植は1930年代より始められ現在までに多数の報告がある。これらの動物では、移植した受精卵の胎児への発育率は80%以上となり正常妊娠にほぼ匹敵するまでに研究が進められている。とくにマウスでは受精卵の凍結保存に成功した報告もある<sup>1)</sup>。

ラットでは、1933年に NICHOLAS<sup>2)</sup> は 2-Cell などの初期分割卵を移植して産子を得ているが、その後 1950 年代までこれに関する報告はみられない。ラット受精卵の子宮内移植について、最近では NOXES & DICKMANN<sup>3)</sup> (1960) および VICKERY ら<sup>4)</sup> (1969) など 2, 3 の報告がある。ラット卵子は外界の感作に敏感と考えられ、現在においてもラット卵子の体外培養はある stage を除いては成功していない。また被移植ラットの子宮は、受精卵の子宮内移植適期とされている偽妊娠 4～5 日頃にわずかの刺激によっても脱落膜腫ができやすく、これらのことがラットの受精卵の子宮内移植を困難にしている原因と考えられる。

この研究は家畜の人工妊娠の基礎的研究の一環としてラットにおける受精卵の子宮内移植法の確立を目的として行なったものであり、とくに生存胎児を得るための移植に関する諸条件について検討を加えた。

### 材 料 および 方 法

donor および recipient には Wister 系の体重 200～240 g の若令雌ラットを用いた。供試ラットは 14 時間照明、21℃ の条件下で飼育し、市販の固型飼料を自由摂取させた。donor および recipient とともに、4 日周期の動物を選び、供試前には 2 周期以上スメア像を観察した。donor は発情前期の午後に Wister 系の正常雄と同居させ、翌日に精子または膣栓を確認して妊娠第 1 日とした。recipient については、同じく Wister 系の精管結紮雄と交配させ、膣栓の確認により偽妊娠第 1 日とした。

受精卵の採取は、妊娠 5 日目に生体子宮灌流法と摘出子宮洗滌法によって行なった。生体灌流を行なう場合に著者らは Fig. 1 に示すような微量定量ポンプ (PM-500型、東洋科学産業製) を用いた。30℃ に加温した灌流液を定量ポンプで細いビニールチューブを通して卵管子宮接合部より下行性の灌流を行ない、子宮頸上部に接続したチューブより卵を回収した。摘出子宮洗滌は常法通りピペットを用いて摘出子宮を洗滌して採卵を行なった。妊娠 3 日目の 4-Cell 卵は摘出子宮の下部にガラス管を接続し、上記の定量ポンプを用いて卵管の上行性灌流を行ない卵管卵を採取した。採取した卵は直ちに顕微鏡で観察し、正常分割卵のみを移植に用いた。

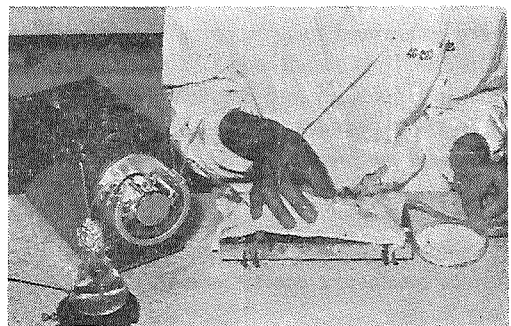


Fig. 1. Egg recovery by flushing of uterus *in vivo* using micro pump

灌流または洗滌液および培養液にはラット不活化血清 1 : 生理食塩水 2 に 1 ml 当り水性ペニンシリン G カリウム 800 単位を加えたものを用いた。

受精卵の移植法は同期化した recipient に体重 200 g 当り 5 mg のネブタールを腹腔内に注射して麻酔し、正中線を切開して子宮を露出し、毛細ガラスピペットを用いて卵を微量の培養液とともに子宮の上部に移植した。移植に際して、採卵後移植までの培養温度と時間、注入液量および空気注入の影響などについて検討を加えた。妊娠 16 日目に recipient を開腹して生存胎児の有無、胎児の発育の状態ならびにその数などを調べた。

受精卵の着床とその分割に及ぼす採卵後移植までの時間と培養温度の影響を知るために、3 日目の 4-Cell 卵を偽妊娠 3 日目の recipient に移植し、40 時間の子宮生体培養を行なった。移植の際に子宮の下部を結紮して卵の流出を防ぎ 40 時間後の偽妊娠 5 日目に摘出子宮洗滌法によって卵を回収し、その分割の状態を観察した。

## 結果 および 考察

### 1. 2 時間培養の受精卵の子宮内移植

5 日目卵 (blastocyst) を採卵後 2～3 時間 30°C で培養した後に recipient の子宮内に移植した結果を Table 1 に示した。

Table 1. Fate of aging blastocyst transferred into the uterus of synchronized recipient rat

Exp. No.	No. of recipient	No. of ova transferred	No. of ova survival*	No. of swellings (remnants)
1	2	12	0	10
2	3	15	0	13
3	2	5	0	5
4	3	7	1	5
5	1	4	1	2
6	2	(air)	—	6
7	3	(medium)	—	11

\* Raparotomized on day 16 of pseudopregnancy

Exp. 1～Exp. 5 において 11 匹の供試ラットに移植した 43 個の blastocyst のうち、妊娠 16 日目の開腹によってわずかに 2 匹の生存胎児 (胎児生存率 3.8%) を認めたにすぎない。一方、子宮内の胎盤様残遺物は 35 個であったが、これは Exp. 6 および Exp. 7 で示されるように、偽妊娠 5 日目のラットに空気または培養液だけを注入しても誘起された。したがって、この残遺物は受精卵の着床後の退化変性による場合も考えられるが、むしろ卵移植時の穿刺および子宮の保定や培養液の注入などの種々の刺激によって誘起される脱落膜腫と考えるのが妥当であろう。

本実験で胎児の生存率がきわめて低かったのは脱落膜反応の影響よりも卵採取後移植までの培養条件とくに温度と時間によるものと推察された。この研究に用いた移植卵も 30°C で 1 時間以上培養を行なうと、わずかな卵の変形が認められた。

### 2. 3 日目卵の子宮生体培養

卵採取後移植までの保存のための培養条件を 3 日目卵の子宮生体培養によって検討した結果を Table 2 に示した。本実験では採卵後 30°C で保温した卵を 20 分以内に recipient に移植した。40 時間の子宮内培養によって、3 匹の供試ラットのすべてに正常分割卵 (blastocyst と morula) が回収された。各ラットの子宮別にみると、正常分割卵の回収率はかなり低かった。

Table 2. Survival of 3-day ova transferred into the uterus of incubator rats on the 3 day of pregnancy

Rat No.	Tranferred ova (4 cell)		Recovered ova after 4 hrs. incubation	
	Right uterus	Left uterus	Right uterus	Left uterus
1	5	4	0	1 (blast.)
2	5	4	2 (blast.)	0
3	4	4	0	2 (morula)

このことはラットでは 4-Cell 卵などの初期分割卵の子宮内培養が困難なことおよび卵の回収技術の未熟さなどによるものと考えられる。この実験の結果、卵採取後移植までの卵の保存時間が生存胎児を得るための大きな要因と考えられた。

### 3. 受精卵の子宮内移植と培養温度、時間および注入液量

卵採取後移植までの保存温度を 30°C、培養時間を 10分～20分、注入液量を 0.001～0.0005 ml として 5 日目卵の移植を行ない Table 3 に示す結果を得た。

Table 3. Fetal survival in the uterus at the 16th day of pregnant rat transferred fresh ova with minimum media

Recipient No.	No. of blastocyst transferred		No. of survival foetus	
	Right uterus	Left uterus	Right uterus	Left uterus
1	5	3	0 (1)*	2 (3)
2	5	3	3 (1)	1 (4)
3	3	5	1 (0)	3 (1)
4	4	3	0 (1)	3 (0)
5	0	4	0 (4)	3 (2)

Note; \* Remunants of uterus

Ratio of foetal survival per ova 46% (16/35)

Ratio of implantation per uterus 78% (7/9)

5 匹の供試ラットに 36 個の受精卵を移植し、妊娠 16 日目における移植卵に対する胎児の生存率は 46% であった。移植子宮別にみると、その着床率は 80% であった。生存胎児は何れも正常であり、妊娠を継続させると正常な産子を分娩するものと思われる。

本実験の培養温度 (30°C) では卵子の代謝はかなり活発であると考えられ、この温度では移植までの時間の短いことが望ましく、ここに得られた結果もこのことを指向しているものと思われる。この実験で卵の移植の際に卵とともに注入した培養液の量は 0.001～0.0005 ml であった。

予備実験において、0.005 ml 以上の培養液とともに卵を移植すると、たとえ卵の保存培養時間を短縮しても胎児の生存性は低かった。注入液量については、その注入によって脱落膜腫を避ける意味からも液量の少ない程良好な結果を期待できよう。福光ら<sup>5)</sup> (1973) もラットにおいて注入する卵子浮遊液の量が少ないほど受胎成績の良いことを報告している。

以上から卵移植時における諸条件とくに培養時間の短縮と注入液量の吟味によりほぼ予期した結果を得た。本研究における移植卵に対する胎児の生存率は約 50% であったが、VICKERY ら<sup>4)</sup> も 4 日目卵を 4 日目子宮に、5 日目卵を 5 日目子宮に移植して 50% 近い生存胎児を得てい

る。また NOYES ら<sup>3)</sup> および BANIK ら<sup>6)</sup> もラットの受精卵の子宮内移植によってほぼ同様の結果を報告している。

受精卵の移植について donor と recipient の日令の関係は NICHOLAS<sup>2)</sup> は卵の日令が同期化した recipient の子宮より早い場合に良好な卵の発育を報告している。NOYES ら<sup>3)</sup> は卵令と子宮令が同じかまたは卵令が子宮令より 1 日早い場合に高い受胎率が得られることを報告した。

ラット卵子の子宮内移植の時期としては、4 日目の morula または 5 日目の blastocyst が考えられるが、李<sup>7)</sup> は Estrogen の分泌から脱落膜腫形成の最大感受期は偽妊娠 4 日目であることを指摘した。このことから、偽妊娠 4 日目の子宮が最も着床しやすい状態にあると推定されるが、脱落膜腫の胎児への影響も懸念されたので本研究では 5 日目卵-5 日目子宮移植を行なった。ラット卵子の呼吸能について菅原<sup>8)</sup> は、胚胞期の卵子の呼吸能に関する研究から、胚胞期など着床前の卵子は、その発生エネルギーを endogenous な基質の酸化一主として解糖系一のみならず exogenous な基質の酸化によって獲得していることを明らかにした。このことは、卵の移植とくに子宮卵移植についてより完全な培養液の必要性を示しているものと思われる。

また哺乳類の卵子は 20°C 以上で代謝が盛んになり、10°C 以下では代謝が著しく低下することが知られている。これらの点から考えても blastocyst を筆者らの用いたような培養液中で長時間高温保存することは問題であろう。

ラット受精卵の子宮内移植を確立するためにはラット卵子の外界感作に対する特異性と妊娠 4~5 日目に脱落膜腫のでやすいことなどを考慮に入れ、卵子の培養温度と時間、培養液の組成、卵移植時の子宮刺激や無菌的移植などの諸条件をさらに検討する必要がある。これらの諸条件が満たされれば、ラットにおいてもマウスやウサギに匹敵する生存胎児と産子が得られるものと思われる。

## 要 約

子宮内に移植したラット受精卵の生存性を知るためにこの研究を行なった。

donor および recipient には体重 200~240 g の Wister 系の雌ラットを用い、膣栓を確認した日を妊娠または偽妊娠第 1 日とし、卵の培養および移植条件を確かめるために 3 日目の 4 細胞卵を同期化した recipient の子宮に移植した。40 時間の子宮生体培養の後に卵を回収し、卵の分割状態を観察した結果、供試ラットのすべてに正常な分割卵が認められた。

卵の灌流および培養液として生理食塩水：ラット不活血清（2：1）を用いた。

妊娠 5 日目の受精卵を採取後 30°C で 2 時間培養した後に同期化した偽妊娠ラットの子宮内に移植した。recipient は妊娠 15 日目に開腹して胎児の発育状態とその数などを観察したが胎児の生存率は 3.8% にすぎなかった。

次に、採卵後移植までの時間を 20 分以内とし、子宮に注入する液量を考慮して 5 日目卵を同期化した子宮に移植した。この場合には着床率は 80% であり、移植卵に対する胎児の生存率は 46% であった。この結果から卵採取後移植までの培養時間と注入液量が高い受胎率を得るための最も基本的な条件であることが推論された。

## 文 献

- 1) WHITTINGHAM, D. G., S. P. LEIBO and P. MAZUR : *Science*, 178, 411—414 (1972)
- 2) NICHOLAS, J. S. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 30, 1111 (1933)
- 3) NOYES, R. W. and Z. DICKMANN : *J. Reprod. Fertil.* 1, 186—196 (1960)
- 4) VICKERY, B. H., G. I. ERICKMAN and J. P. BENNETT : *Endocrinol.* 85, 1202—1293 (1969)
- 5) 福光 進・杉江 信 : 卵子談話会要旨 14, 8 (1973)
- 6) BANIK, U. K. and M. M. KETCHEL : *J. Reprod. Fertil.* 10, 85—91 (1965)
- 7) 李 明智 : 日本不妊学会誌 17, 13—24 (1972)
- 8) 菅原七郎 : 家畜繁殖誌 9, 105—108 (1964)

## 第 42 号 正 誤 表

ペ ー ジ (P)	行	誤	正
27	下から14行	fetus	foetus
28	上から9行	NOXES	NOYES
29	Table 1 脚注	pseudopregnancy	pregnancy
30	Table 2 表題	3 day	day 3
30	Table 2	Tranferred	Transferred
30	Table 3 表題	Fetal	Foetal
30	Table 3 表題	at the 16th day	on the 16th day
36	Table 4 脚注	Percentage of day matter	Percentage of dry matter