

4) 哺乳動物における卵子と初期胚の正常性に関する形態学的研究

新潟大学農学部家畜生産学講座 新村 末雄

Morphological Studies on the Normality of
Mammalian Eggs and Embryos

Sueo NIIMURA

*Department of Animal Science, Faculty of Agriculture,
Niigata University*

Effects of the treatment of superovulation, culture, and freezing and thawing on mammalian eggs or embryos were electron-microscopically, cytogenetically and histochemically examined, and the normality of the treated eggs or embryos was discussed. The results obtained were as follows.

1. The higher incidence of polyspermy in hamster eggs superovulated by the injection of 90 IU PMSG was related to the smaller amount of cortical granules in these eggs.

2. Mouse blastocysts superovulated by the injections of 5 IU PMSG and 5 IU hCG were normal in their morphology.

3. The cell function was higher in the mouse blastocysts developed in vitro compared with that of blastocysts developed in vivo.

4. Bovine eggs matured and fertilized in vitro, and embryos developed in vitro were morphologically normal.

5. Morphological damages in 8-cell mouse embryos brought forth by freezing and thawing were repaired through the subsequent culture.

Key words: morphological normality, superovulated egg, cultured embryo, frozen-thawed embryo
形態学的正常性, 過排卵卵子, 培養胚, 凍結・融解胚

はじめに

近年、畜産の分野において優良家畜の増産を目指して、卵巣内卵子の体外成熟、体外受精、卵子と胚の低温・凍結保存、胚の分離・切断、胚移植などの技術が開発され、実用化されている。さらに最近では、これらの技術以外

に顕微授精、胚の雌雄判別、卵子あるいは初期胚への外来遺伝子の導入なども行われている。これらの技術には過排卵卵子を培養したものが一般に用いられており、このような卵子と胚はあらゆる面で正常であることが要求される。本論文では、これらの技術に用いられる過排卵卵子と培養胚の形態を正常性という観点から説明すると

Reprint requests to: Sueo NIIMURA,
Department of Animal Science, Faculty of
Agriculture, Niigata University
Niigata City, 950-2181, JAPAN

別刷請求先：〒950-2181 新潟市五十嵐二の町
新潟大学農学部家畜生産学講座 新村 末雄

ともに、凍結・融解胚の形態と物質代謝についても論述する。

1. 過排卵卵子

過排卵卵子の正常性に関して検討した報告によると、過排卵卵子は、1) 多倍数性と異数性の染色体を持つものが多い、2) 受精率と発生率が低い、3) 胎子の死亡率が高い、4) 奇形の出現率が高いなどといわれている。これらの異常は過排卵誘起に使用する GTH の投与量によるところが大きいようである。

著者ら¹⁾は、90 IU の PMSG を投与した場合（平均排卵数 69.0 個）のハムスターの前核卵子を観察したところ、単精子受精卵子と多精子受精卵子の出現頻度は、97.4% および 2.6% であり、多精子受精卵子の出現頻度は自然排卵卵子に比べ有意に高いことを確かめた。従って、過排卵卵子が多倍数性の染色体を持つ理由として、多精子受精によることが考えられる。また、このような過排卵卵子では表層粒の分布異常のものが 9.4% みられ、自然排卵卵子の 2.2% に比べ有意に高いことが確認された。

次いで著者ら²⁾は、マウスに過排卵を誘起するために通常用いられている量の PMSG と hCG それぞれ

5 IU を 48 時間間隔で投与して過排卵を誘起し、hCG 注射後 100 時間に胚盤胞を採取して微細構造と染色体数を調べ、同時齢の自然排卵による胚盤胞のものと比較した。

自然排卵による胚盤胞の栄養膜の透明帯側表面には短い微絨毛が密生しており、栄養膜細胞同士の境界は判然としていた（図 1a）。透過電子顕微鏡で観察すると、栄養膜の透明帯側表面には短い微絨毛が密生していたが、胚盤胞腔側の表面は比較的平坦でしばしば細胞ヒダがみられた（図 1b）。また、栄養膜細胞間には閉鎖帯と接着斑がみられた。内細胞塊細胞の表面は比較的平坦で、短い細胞ヒダが少数存在する程度であった。さらに、栄養膜細胞と内細胞塊細胞の細胞膜には、貪飲像と思われる細胞膜の陥入が随所にみられた。栄養膜細胞の核は楕円形で、内細胞塊細胞の核は円形を呈しており、両者とも細胞のほぼ中央に位置していた（図 1b）。これらの核はオイクロマチンが多く、核小体を 1 個ないし 2 個含んでいた。細胞質小器官については、栄養膜細胞と内細胞塊細胞の間で、分布上、構造上の相違はみられなかった。ミトコンドリアは球状、桿状または垂鈴状を呈して細胞質に一様に分布していた。クリステは板状であったが、これらに混じって空胞状クリステもみられた。ミト

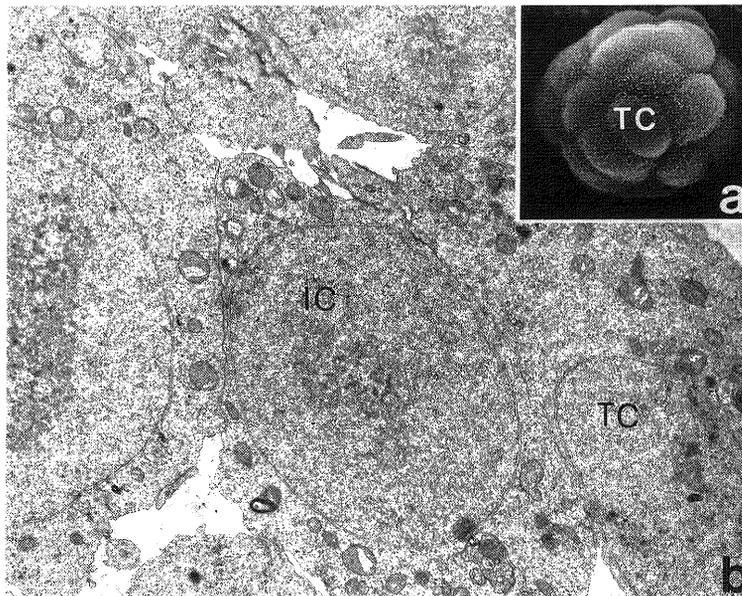


Fig. 1 Scanning (a) and transmission (b) electron micrographs of mouse blastocysts developed from spontaneously ovulated eggs. TC: Trophoblast cell, IC: Inner-cell-mass cell.

Table 1 Nuclei and chromosomes in mouse blastocysts

Blastocysts	No. of blastocysts examined	No. of nuclei in a blastocyst	No. of metaphase plates in a blastocyst	No. and (%) of blastocysts showing							
				Di-ploidy	Hypo-di-ploidy	Hyper-di-ploidy	Tri-ploidy	Hypo-tri-ploidy	Tetra-ploidy	Hypo-tetra-ploidy	Mosaic
Spontaneous ovulation In utero	300	68.6±14.0 *a	3.7±2.1	288 (96.0)	4 (1.3)	4 (1.3)	2 (0.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	1 (0.3)
Superovulation In utero	345	61.9±17.7 a	3.9±2.5	331 (95.9)	6 (1.7)	2 (0.6)	2 (0.6)	1 (0.3)	1 (0.3)	1 (0.3)	1 (0.3)
In vitro	345	52.9±18.3 b	4.6±2.5	331 (95.9)	7 (2.0)	2 (0.6)	1 (0.3)	0 (0.0)	1 (0.3)	1 (0.3)	2 (0.6)

*Mean±S. D.

Values with different superscripts in the same column are significantly different (P<0.001).

コンドリア基質の電子密度は中等度であった。粗面小胞体は槽状で細胞質に散在しており、ゴルジ装置は未発達であった。遊離リボソームは多数みられ、多くはポリソームを形成していた。その他、多胞体、自家食胞、ライソソーム様小体およびミエリン像が含まれていた。

過排卵処置によって得られた胚盤胞には、自然排卵胚盤胞との間に微細構造上の相違を見いだすことはできなかった。

また、自然排卵胚盤胞と過排卵胚盤胞における染色体についての検索結果は表 1 に示した通りである。なお、染色体数異常の出現頻度には両者の胚盤胞で有意な差はなかった。

一方、各種日齢のマウスに PMSG と hCG それぞれ 5IU を投与して過排卵を誘起し、排卵卵子について多精子受精の頻度と表層粒の量を調べた³⁾。その結果、多精子受精の頻度は、60ないし90日齢の動物では1.2%、180ないし210日齢では1.5%であったが、30日齢の動物では有意に高く、14.9%であった。さらに、表層粒の分布異常を示す卵子の割合は、60日齢以降の成熟動物では7.1%であったが、30日齢では30.4%と有意に高かった。従って、未成熟動物の過排卵卵子で多精子受精の頻度が高いのは、表層粒の不備によるものであると考えられる。

2. 培養 胚

培養胚盤胞についてはこれまでに、合成されるタンパク質の種類、加水分解酵素活性、グルコース代謝、CO₂産生量、グリコゲン含量などが調べられており、子宮内胚盤胞のものと比較されている。しかし、培養胚盤胞の微細構造を観察して、その正常性を検討した報告は少ない。

著者ら⁴⁾は、マウス2細胞胚を培養して得られた胚盤胞を用いて微細構造を観察した。

培養胚盤胞の栄養膜の透明帯側表面を走査電子顕微鏡で観察すると、前項の自然排卵胚盤胞の記載と類似の像がみられ、子宮内胚盤胞との間に相違は認められなかった。しかし、培養胚盤胞を透過電子顕微鏡で観察すると、子宮内胚盤胞との間に下記のような相違点が見られた。すなわち、培養胚盤胞は子宮内胚盤胞に比べ、1) 栄養膜細胞と内細胞塊細胞の細胞膜にみられる陥入(貪飲像)は多かったが、その陥入度は浅かった。2) 核小体はやや大型で、無形部と核小体糸が明瞭であった。3) ミトコンドリアの基質の電子密度はやや低く、空胞状クリステは少なかった。4) 多胞体、自家食胞、ライソソーム様小体およびミエリン像は、いずれも多かった。

また両者の胚盤胞で、発生のためのエネルギー源として細胞質に蓄積している封入体を組織化学的に検出したところ、グリコゲン顆粒の含量に相違はみられなかったが、脂質小滴の含量は培養胚盤胞で有意に多いことが確かめられた⁵⁾。

これら微細構造に関する結果および細胞質封入体の量に関する結果は、培養胚盤胞の各種酵素の活性が子宮内胚盤胞のものよりも高いという著者らの結果⁶⁾からもうかがえる。

一方、培養胚盤胞の染色体数について得られた成績は表 1 に示した通りである。核数は培養胚盤胞のものが子宮内胚盤胞のものに比べ有意に少なかったが、中期核板数、染色体数の異常の出現頻度および性比は両者の間に有意差が認められなかった。これらのことから、培養胚盤胞は子宮内胚盤胞に比べ若干発育が遅れているが、細胞分裂は正常に行われており、また培養によって染色

体数の異常が引き起こされることはないことが明らかとなった⁷⁾。

さらに著者ら⁸⁾⁹⁾は、体外成熟させたウシ卵巣内卵子を体外で受精させた後、培養して発生させた胚の微細構造を観察している。その結果、このような胚では、ミトコンドリアの機能とタンパク合成能が低く、細胞間の接合が緩いが、これらは培養時間の経過とともに体内で発生した胚と同程度に回復したことから、体外で成熟、受精および培養したウシ胚は形態学的に概ね正常であると考えている。

3. 凍結・融解胚

哺乳動物卵子(胚)の凍結保存技術は、現在では広い分野で用いられているが、従来の凍結保存に関する研究では、主として融解後の卵子あるいは胚の生存率や発生率の向上を目的として、凍結および融解の方法について検討したものが多く、

著者らは、凍結保存後融解したマウス8細胞胚の形態¹⁰⁾¹¹⁾、胚盤胞への発生率¹⁰⁾、各種酵素の活性¹²⁾を調べた。胚をすべての割球が正常なもの(I群)、一部の割球が退行しているもの(II群)およびすべての割球が退行しているもの(III群)に分けて、融解時に各出現頻度を調べたところ、回収した698個の胚のうちI群の胚は405個(58.0%)、II群の胚は225個(32.2%)およびIII群の胚は68個(9.7%)であった。次に、各群の胚を48時間培養して胚盤胞への発生率を調べた。その結果、I群の胚では63.6%が、II群の胚では30.5%がそれぞれ胚盤胞に発生したが、III群の胚では胚盤胞に発生したものはみられなかった。培養の結果から、III群の胚を培養しても桑実胚や胚盤胞へは発生しないが、退行割球を含むII群の胚を培養すると、胚盤胞へ発生するものがあることが明らかとなった。また、I群の胚は大部分胚盤胞へ発生するが、発生に要する培養時間は48時間であった。無処置の8細胞胚は24時間の培養で胚盤胞まで発生することが知られているので、凍結保存胚は8細胞期から胚盤胞期に発生するまでに約24時間遅れることが判明した。

また、これらの胚の微細構造を観察したところ、I群およびII群の光学顕微鏡的に正常な像を示す胚の割球では、微細構造は未凍結胚とほぼ同様であったが、ミトコンドリア基質の電子密度は低く細胞質の電子密度と同程度であった。しかし、未凍結胚にはみられない亀裂が細胞質にかなり認められた。また、線維構造物は認められず、結晶構造物も少なかったが、脂質小滴は多数含まれ

ていた。II群およびIII群の光学顕微鏡的に退行像を示す胚の割球では、細胞膜と核膜は不鮮明で、細胞質と核質は電子密度が著しく低く粗であった。細胞質にはミトコンドリアが多数含まれており、クリステは板状で少なく、基質の電子密度は高かった。ライソソーム様小体とミエリン像は正常な像を示す割球に比べ多かった。その他の細胞質小器官と封入体は全くみられなかった。融解後24時間培養して得られた桑実胚では、割球の細胞質に亀裂は全くみられなくなるとともに、線維構造物は少数ではあるが出現し、結晶構造物は増加した。脂質小滴は多数含まれていた。融解後48時間培養して得られた胚盤胞の微細構造は、前項で述べた培養胚盤胞のものと同様であった。

次いで著者ら¹²⁾は、凍結・融解胚について各種酵素の活性を組織化学的に調べたところ、融解直後の8細胞胚では、I群とII群の胚の正常割球にシクロム酸化酵素の活性がみられたのみであった。また、I群の胚を培養すると、NADH₂脱水素酵素の活性は24時間培養して得られた桑実胚に、また乳酸脱水素酵素の活性は48時間培養して得られた胚盤胞に、さらにコハク酸脱水素酵素の活性は52時間培養して得られた胚盤胞に、それぞれ初めて出現した。

おわりに

過排卵卵子の正常性を検討したところ、極端な量のGTHを投与して得られた卵子では、表層粒の不備による多精子受精が高頻度にもみられたが、成熟動物に通常の量のGTHを投与する限り、得られた卵子の多精子受精の頻度、微細構造および染色体数に異常はみられず、このような卵子を各種の技術に使用しても支障ないことが確認された。また培養胚盤胞では、子宮内胚盤胞に比べ代謝活性が高く、細胞質封入体の量も多いが、染色体数異常の出現頻度に差はみられなかったことから、このような培養胚盤胞の機能亢進像は胚盤胞が高栄養の培養液中に置かれていることに起因するもので、その範囲は正常域にあるものと考えられる。さらに、凍結保存胚を融解すると、胚の微細構造はかなり損傷を受けており、物質代謝もほとんど停止した状態であるが、その後の培養でこれらは正常に回復し得ることを明らかにした。なお、退行割球を含む分割胚も、融解後の培養によって相当数が正常に発生し得ることもつきとめた。しかし、このような処置を施した卵子と胚の正常性については形態ばかりでなくあらゆる角度から厳密に検討を加える必要があるものと考えられる。

参 考 文 献

- 1) 新村末雄, 細江実佐, 石田一夫: ハムスターの排卵卵子における表層粒の分布状態と多精子受精の頻度との相関. 日畜会報, 64: 1187~1192, 1993.
- 2) 新村末雄, 佐藤栄治, 佐々木博之, 石田一夫: 過排卵処理によって得られたマウス胞胚の正常性に関する形態学的研究. 新大農研報, 33: 53~60, 1981.
- 3) Niimura, S., Yotsutani, I. and Ishida, K.: The incidence of polyspermy and the number of cortical granules in eggs from juvenile and adult mice. J. Reprod. Dev., 38: 121~124, 1992.
- 4) 佐々木博之, 新村末雄, 佐藤栄治, 石田一夫: 培養マウス胞胚の微細構造. 日畜会報, 51: 701~705, 1980.
- 5) 佐藤栄治, 新村末雄, 石田一夫: 培養マウス胞胚における脂肪小滴及びグリコゲン顆粒の組織化学的研究. 家畜繁殖誌, 26: 145~147, 1980.
- 6) 新村末雄, 石田一夫: 培養マウス胞胚における各種酵素の組織化学的研究. 日不妊会誌, 26: 89~94, 1981.
- 7) 佐藤栄治, 新村末雄, 石田一夫: 培養マウス胞胚の細胞遺伝学的研究. 家畜繁殖誌, 26: 141~144, 1980.
- 8) Yotsutani, I., Ryoo, Z. Y., Matsumoto, H., Sugawara, S., Niimura, S. and Ishida, K.: Construction of junctional complexes in bovine embryos in the process of blastocyst formation in vitro. J. Mamm. Ova Res., 10: 152~160, 1993.
- 9) 四谷伊公子, 柳 在雄, 松本浩道, 菅原七郎, 新村末雄, 石田一夫: 培養したウシの卵子と初期胚の微細構造. 新大農研報, 46: 31~37, 1994.
- 10) 白石哲也, 新村末雄, 石田一夫: 凍結保存マウス胚における融解後の形態と発生に関する研究. 家畜繁殖誌, 27: 133~136, 1981.
- 11) 白石哲也, 新村末雄, 石田一夫: 凍結保存マウス胚の電子顕微鏡的観察. 家畜繁殖誌, 28: 67~70, 1982.
- 12) 新村末雄, 白石哲也, 石田一夫: 凍結・融解マウス胚の酵素組織化学的観察. 家畜繁殖誌, 28: 71~75, 1982.

司会 ありがとうございます。何かご質問ございましたでしょうか。最後に法学部の西野教授に来ていただきまして生殖技術と倫理・法律上の問題点についてお話いただきます。先生は市民法といいますか、市民と法律との関わりがご専門ということですが、医学部の倫理委員もお願いしていただいで、いろいろなお助言や、指導をしていただいでおります。

5) 生殖技術と法律上の問題点

新潟大学法学部 西野 喜一

Legal Problems of Artificial Insemination and in Vitro Fertilization

Kiichi NISHINO

Niigata University Faculty of Law

There have been no statutes or case law controlling AIH, AID, IVF or surrogate mother in Japan, though we have already many cases of AIH, AID, IVD, and, reportedly, some surrogate mother cases. Legal and ethical studies in these fields have been

Reprint requests to: Kiichi NISHINO,
Niigata University Faculty of Law
Ikarashi 2, Niigata-city, 950-2102, JAPAN.

別刷請求先: 〒950-2102 新潟市五十嵐2の町
新潟大学法学部 西野 喜一