哺乳動物胚の培養

尾 川 昭 三

(日本大学農獣医学部)

In vitro culture of mammalian embryos

Shyoso OGAWA

(Department of Animal Reproduction, College of Agriculture and
Veterinary Medicine, Nihon University, Setagaya-ku, Tokyo)

哺乳動物胚の培養は従来の胚の代謝、受精、奇形発生等についての基礎的知見と、卵管、子宮液の化学的、物理的性状の追究によってえられた知見をもとにして出発した。しかし、実際の培養に際し、現状では卵の発育の成否は、経験と直観的な着想に依存する面が多く後になってそれらの理論付けがなされる場合があることは否定できない。

動物の種類によって卵の培養に難易があるといわれている。たとえば、ラット卵の体外受精および受精卵の培養やマウス胎胚の培養については、他の実験動物胚にくらべ成功例はきわめて少ない。しかし、これは動物種により難易があるとするよりは、むしろ適切な培養液が見出されていないことに由来すると考えるべきであろう。

いずれにしても、胚に関する *in vitro* の種々の実験において、確実に、しかも長時期間、胚の生存発育を可能ならしめる培養法を確立することが大切でその成否の鍵をにぎるものとして、まず培養液があげられる。

哺乳動物胚の培養液

血清のみを用いた実験が現在もなされている。卵管および子宮液の組成を分析し、それにもとづいて培養液を作製する試みは一見合理的なようであるが、これらの生殖器官の液は動物の内分泌状態によって量質共に変動があるのみならず、合成と分泌に関する物理化学的条件が加わることから、分析によってえられた一時期の液の化学的組成をもとにして、一般的な培養液を設計することは不合理である。しかし、生体からの分泌物中に含まれる特異的な有効な因子(発育のため等)をみいだす目的に

対し必要でしかも有効な手段となりうる。

発育に必要なエネルギー源についてはマウス胚で比較的良好に知られている(総説)^{4,112}。すなわち、1~2細胞期卵の発育はオキザロ醋酸あるいはビルビン酸のみで発達を維持することが可能で^{5,11}、2~8細胞期ではさらに乳酸、ホスホエノルビルビン酸等が必要となる⁹。8細胞期以降から胎胚期にはグルコース、マレイン酸¹⁰⁷、およびフラクトース、 α -ケトグルタル酸、クエン酸、醋酸が利用されること¹³が明らかとなった。従って現在ではマウスの初期分割卵のみならず他の動物卵の培養には必ずと言っていいくらいにビルビン酸塩を含む液が用いられる¹¹²。

一般に蛋白を含まない液は哺乳動物の卵細胞に有害であると考えられている。この理由について不明の点が多く、単なるアミノ酸の補給源のみと考え難い点がある。胚に対する金属イオンの作用は液にアミノ酸、ペプチドあるいはアルブミンを加えることによって除きうるとの事実がある¹⁰⁸。恐らく蛋白質はイオンの結合に関するその物理化学的特性によって卵に対する一種の保護作用をあらわすものと推定される。そこで、胚の培養液として、無機塩類の溶液、タイロードとかハンクス液等を用いる場合に、少量の血清アルブミン(牛血清アルブミンの場合が多い)の添加が望ましいとされている¹⁰。マウス胚の実験では、アミノ酸は受精卵および未受精卵にもとり込まれるが^{55,57,102}、初期にとり込まれたアミノ酸は、8細胞期までの胚の発達を支えるには不必要である^{5,10}、また8細胞期以降ではグルタミン、アルブミン、グリシンのみで、他に窒素を含まない液によって胎胚期

まで発達が可能なこと¹⁸⁾が知られ、蛋白合成は8細胞期以前では少なく、その後急激に増加する^{55,57)}ことが認められている。なお、 CO_2 ^{41,57,60)} およびビルビン酸⁵⁷⁾が初期分割卵の蛋白合成のためにとり込まれるとみなされる(気相条件の項参照)ので、ビルビン酸は単にエネルギー源としてばかりでなく、初期分割卵から胞胚期においては蛋白合成の素材としての働きをもつと考えられている^{60,105)}。

以上の知見から、初期胚(1~胞胚期)の培養にはリンガー液あるいはタイロード液のごとき無機塩類溶液にエネルギー源として、グルコース、ビルビン酸塩あるいは乳酸塩を添加し、それに牛血清アルブミンを加えたものが用いられる様になった。代表的なものとして Brinster 液¹¹⁾、Whitten & Biggers 液¹⁰⁹⁾、Whittingham 液¹¹²⁾ および Bavister 液⁹⁾がある。前3者は主としてマウス卵の培養用に開発され、後1者は人卵子の体外受精に用いられた点で特記されよう。

胚の発育が進んで、8細胞期、胞胚期になると、エネルギー源の他に蛋白質およびビタミンの必要性が問題となる。これらの時期には胚へのアミノ酸とり込み、核酸-蛋白合成が活発になることが認められており^{3, 6, 28, 45, 50, 51, 62, 55, 57, 80, 88, 89, 116)}、またビタミンについては DANIEL²⁶⁾ は家兎胞胚は *in vitro* で発育するにはヒポキサンチン、ピリドキシン、リボフラビン、サイアミン、ナイアシンアミドおよび葉酸が必要であると報じた。Brooks ら¹⁴⁾ は家兎胞胚の ATP 含量は 5~6 日令にかけて増加し、この ATP は無酸素条件下では急速に消失することを認めている。

これらの知見から胞胚期の培養液として、従来組織培養に用いられる、Eagle, 199, Ham F10, Waymouth 液に血清を補強したもの、さらに必要に応じてエネルギー源、ビタミン等を補強したものが利用される様になった。しかも Ham F10 は家兎胞胚期のみならず、人の初期分割卵の培養に用いられうる^{38,35,86,87)}。また、これらの各液の特性を有効に利用するため、数種を組合せたものが家兎受精卵の培養に有効なことが認められた^{69,73)}。

培養気相条件

通常、胚の培養は開放系条件下で行なわれる。しかし、酸素(O_2)の増加あるいは炭酸ガス(CO_2)の増加の *in vitro* 胚の発達におよぼす影響は器官培養における程よくしられていない。家兎卵の分割には O_2 を必要とし、その O_2 消費が胞胚期に急激に増加する事実⁸⁷⁾があり、またマウス卵では8細胞期より相当増加すること⁶⁴⁾から、初期胚(1細胞期から桑実もしくは胞胚期ま

で)の培養には空気中の O_2 含量以上の補給は必要がない様で、むしろ胞胚期以降時の培養に O_2 補給処理の効果があるとされている^{26,43,62,75)}。 O_2 は恐らく呼吸(代謝)のために要求されるのであろうが、 CO_2 は培養液の pH を維持するのみならず、生理的レベルの CO_2 を保持するのに必要と考えられている。しかし、この CO_2 の生理作用については依然として不明の点が残っている。

1方、先述のごとく CO_2 は卵に固定される事実がある^{41,57,60,90,105)}。この CO_2 固定については CO_2 は胚の種々の生合成のための代謝中間物質を作るのに必要であり⁶⁾、蛋白および核酸の生合成のためにとり込まれる^{41,60,90,105)}と考えられている。NEW と STEIN⁶⁴⁾ はラット胚の培養において、体節形成以前には余分の O_2 はむしろ有害かも知れないが、10体節前後の胚の培養には空気中に O_2 を補強すると一般に発達に良い結果をうると報じた。これによると、体節形成以前では CO_2 4~5% (空気中)の方が空気のみにおけるよりも発育例(20体節形成までの)が倍増し、一方生存率は 60% O_2 (空気中)条件が 20% O_2 (空気中)におけるよりも増加した。DANIEL²⁶⁾ は家兎胞胚(交尾 5~7 日後)は 10% O_2 の気相条件下で最も発育が良好で、95% O_2 にすると発達が止まると報じた。NEW と COPPOLA⁵⁵⁾ はラット胚(妊娠 9 1/2~11 1/2 日)を還流血清中で培養した結果、若い時期の胚では(9 1/2 日) 5% CO_2 条件が最も発育良好で、日令の進んだものでは 95% O_2 +5% CO_2 条件がむしろ発育に効果的であった。さらに時計皿で静置培養した結果では、若令胚は 5% CO_2 +60~95% O_2 、老令胚では高張 O_2 条件下のみで発育が認められた。彼らは気相中の O_2 は培養器具および胚の発達の時期によって必要混合量は異なってくるが、一応、すべての時期においても空気中で平衡された状態の血液で供給される O_2 と同じ分圧のものを必要とすると考えている。

家兎受精卵ではほぼ閉鎖系と考えられる条件下でも胞胚期まで高率に発育せしめうる事が確められている^{69,72)}ので、培養液の性状によっても好適気相条件も異なってくる事が推測される。

培養器具

培養器具は培養液の開発と共に使用方法を含め種々工夫がされている。これらの器具、方法は胚の観察、記録に便利にできていることが望ましい。たとえば、卵細胞を流動パラフィン下で培養する方法^{8,12)}は栓をした試験管等で培養するよりも、満足すべき方法として初期分割卵の培養等に一般に広く利用されている。これは胚の発育を顕微鏡下で観察するのに有利であるのみならず、処

理操作が簡単である。胚の発達の連続的記録、たとえば顕微映画撮影等の手段によると、通常の顕微鏡検査で見逃す恐れのある特異的変化を記録しうるのみならず、結果の分析にも有利である。

培養中の胚の収納器具として時計皿が一般に用いられる。他にホールグラス、アール瓶、必要に応じて更に大型のカレル瓶が用いられる。胞胚期およびそれ以降期胚の培養のため特別に製作されたものとして New の装置⁶¹⁾がある。これは培養液をガス圧によって還流せしめる様、巧妙に作られた器具で、彼はラット胚（体節形成時およびそれ以降期）の培養にこれを用い好成績をえた^{61,65)}。この器具を若干変えたもので家兎胞胚の培養を行ない 20 体節まで发育せしめた報告がある³⁷⁾。培養液の還流を局部的熱源による熱対流誘起で行なう培養器具⁷¹⁾があつて家兎胞胚の培養に有効に用いられている。

培養液の自動的補給（新鮮液との置換）には市販されている器具があるが、操作の繁雑さもあつて、現在のところ理想的な方法はないと言える。簡単な器具でしかも液の流入による胚の移動が起こらず、ガス混合気の調節可能な装置、できればマイクロマニピュレーターの装着できるものが必要であらう。

哺乳動物胚の好適培養条件は胚の発達段階によって異なるものと考えられる。この培養について技術的な面から一応大別してみると、(i) 卵胞より採取した卵の *in vitro* 成熟、(ii) 体外受精、(iii) 受精卵の胞胚期までの培養、(iv) 胞胚期以降の培養、等が挙げられる。これら各々について、培養液、器具、方法の開発を含む培養条件の基礎的研究がなされてきた。人卵における様に不妊問題解決と手段としての考え方もあらう。しかし、家畜繁殖あるいは人の不妊解決手段としただけに適用するまで胚の培養法が進んでいるとは思えない。

これまで卵子の发育に関する *in vitro* の研究でえられた知見のうち、卵培養と比較的強い関連性を有すると思われるものの代表的なものをとり挙げ、培養方法と関連づけて記す。

卵子の *in vitro* 成熟

卵の *in vitro* 成熟に関する研究は比較的最近になつて行なわれる様になった。少なくとも、排卵された卵子は卵胞内ですでに一応受精への準備段階を終えているとみなされている。PINCUS と ENZMANN⁷⁶⁾ の実験以来、哺乳動物の卵胞卵（あるいは未成熟卵）を排卵時の成熟卵と同程度（通常第 1 極体放出および第 2 metaphase）まで成熟させることは可能である（家兎^{17,18,79)}、マウス^{5,29,32)}、人^{32,84,46)}、羊^{22,81,82,78)}、牛^{82,79)}、豚⁸²⁾、および猿⁸²⁾）。

卵胞内細胞（顆粒細胞）は卵胞より外に出た場合は、卵子の成熟に対して、むしろ促進的に作用している^{5,48)}。BIGGERS ら⁵⁾ はマウスで卵胞から遊離された卵胞細胞は *in vitro* で卵子の成熟を助けることを証明した。DONAHUE と STERN⁸⁰⁾ は家兎の卵胞内細胞は *in vitro* でグルコースをピルビン酸に変換させることにより卵子の成熟を助長すると報じた。この様にマウスだけでなく、他の動物においても卵子の *in vitro* 成熟には卵胞内細胞からのピルビン酸が中心的なエネルギー源として必要とみられている^{5,48)}。たとえば、人⁴⁸⁾、家兎⁷⁹⁾ および牛⁷⁹⁾ の卵子は卵胞より採取した場合、*in vitro* の成熟は卵丘細胞除去によって減少する事実が認められている。CROSS と BRINSTER²⁹⁾ は *in vitro* で成熟させたマウス卵子を体外受精させ、その移植によって着床以降期胚まで发育せしめた。彼らは卵丘細胞をくっつけたままの方が（Brinster 液¹¹⁾ + 血清アルブミンで培養）それを取りはずしたものよりも成熟の割合の高いことを認めた。人卵では卵胞液中で培養成熟させ、次いで子宮頸管粘液中に移し体外受精、胞胚期まで发育せしめた例⁸²⁾と卵胞液および Ham F10 の混合液で培養成熟させ、Bavister 液³⁾で体外受精、次いで Ham F10 で培養、胞胚期まで发育せしめた例^{33,35,86,87)}がある。これら卵子の *in vitro* 成熟に関する研究は不妊問題解決の手段としての基礎的研究と考えるよりも、現段階では動物母体に与えられた種々の処置の卵子形成および成熟におよぼす影響、異常卵形成の問題と染色体異常（総説¹⁵⁾）、単為生殖（総説⁹⁵⁾）等の研究に有用と考えられる。

体外受精

小実験動物卵の体外受精は家兎^{7,19,97)}、マウス^{23,100,101)}、およびハムスター¹¹⁸⁻¹¹⁵⁾、でほとんど確立されたかの感がある。しかしながら、ラット卵子について信頼すべき報告はほとんどなく、わずかに TOYODA と CHANG⁹⁹⁾ の実験報告がみられるのみである。彼らはキモトリプシンで卵子の透明帯を除去した条件下で精子の卵子への侵入を確めた。

これまでの報告例では（主としてマウス卵であるが）体外受精用の液の pH は 7.2~7.8 が用いられている。この条件で受精率の高い結果がえられており、従つて体外受精に用いられる液は従来の組織培養液の pH に比しやや高いものが使用される傾向にある。

体外受精用に用いられる精子には、いわゆる “capacitated” 精子（子宮あるいは卵管は、もしくはそれらの液に一定時間存在したもの）が利用される場合が多い。WHITTINHAM¹¹⁰⁾ は交尾後 1~2 時間のマウス子宮内精

子を取り出し体外受精を行なった。この卵の移植で 17 日令胎児の存在を確めた。MUKHERJEE と COHEN⁶⁹⁾ は交尾後 3~4 時間の子宮からの精子によるマウス卵 (253 個) の体外受精を試み (Whitten と Biggers 液¹⁰⁹⁾ を用いた), 約 1/4 に 2 細胞期への分割を認めた。これをさらに培養した結果, その 1/3 が胎胚期まで發育し, この胎胚の移植によりその約半数が胎児に成長したと報じた。CROSS と BRINSTER²⁹⁾ は卵丘細胞をつけたままで Brinster 液¹¹⁾ 中 30 mg/l 牛血清アルブミンを含むもので体外受精を試みたところ, 91.7% のマウス卵が受精した。卵丘を除去しておいた卵では受精率 59.2% と減少した。彼らはマウス卵の体外受精の成否は 2 つの因子によって大きく左右される, そのひとつは培養液中の蛋白質濃度で他のひとつは, 卵丘細胞の存在の有無であると述べた。福田ら⁸⁸⁾ はマウス卵では卵丘細胞存在の有無は体外受精率に総体的に大きな差異は生じないが, 除去した例においては実験の度毎に受精率が一定なくて極端に低い時と高い場合のあるのを認めた。なお, FRASER ら⁸⁶⁾ は家兎の卵の卵丘細胞を除去したのもでも体外受精率 91~97% もえられることから受精に際し精子が前もって卵丘細胞と接触する必要はないと結論している。家兎卵で高率の体外受精率をえた例として BRACKETT と WILLIAMS の実験⁷⁾ がある。彼らは家兎卵を capacitated 精子と共に回収子宮液+血清+グルコースの液で培養した結果, 73% の受精卵をえた。YANAGIMACHI と CHANG¹¹⁴⁾ はタイロッド液あるいは TC 199 と M/8 グリシンを 10:3 に混じた液でハムスター卵子を子宮で capacitate した精子を用い体外受精を行なった。その結果, 約 60% の卵子に受精現象が認められた。

一方, 精巢上体尾部精子を卵胞液で処理した後, 体外受精を行なった例がある⁴⁴⁾。さらに以上のごとき生殖器あるいはそれに近似の液等を用いなくて単に合成培養液のみを用いて体外受精に成功した例として豊田ら^{100, 101)} の報告がある。彼らに合成液 (Krebs' Ringer Bicarbonate + ビルビン酸, グルコース + 牛血清アルブミン: Brinster 液¹¹⁾ 近似) 中にてマウス卵体外受精を精巢上体尾部精子で試みた結果, 高率の受精卵 (93.7%) をえた。彼らはマウス精子の capacitation には必ずしも生殖道液中での存在を必要とせず, 単に精子媒液の物理化学的性状によって起こりうると考えている。OGAWA ら⁷²⁾ は合成培養液のみによる家兎卵の体外受精を試みた。彼らは精巢上体尾部からの精子を用い合成培養液 (血清および血清アルブミンを含まない) 中で卵と共に 5~6 時間培養後, 等 2 極体放出卵を血清を含む合成培養液に移し培養した

結果, 胎胚期およびその hatching 期まで発達するのを認めた。最近彼らはこの方法で, 卵子への精子侵入を確認したのみならず, 特に HCG を前もって授与された雄の精子でのみ高率に受精することをみている⁷⁸⁾。この実験の特徴は精子活力が, 用いた液で長時間 (6~24 時間以上) 持続せしめえた点である。体外受精にはまず良質な精子をうること, および精子の活発な運動性を体温条件下で長時間保持しうる培養液を開発することが必要と考えられる。この実験での処置, たとえば採精用雄への HCG 処置, 用いた合成培養液は家兎卵のみならず他の動物の体外受精に適用しうのではないかと考えられる。この実験でえられた事実は精子の capacitation の概念^{1, 10)} (すでに相当変えられてきている³⁰⁾ にしても) さらに変えることの必要性を示すと言えよう。人卵の体外受精では既述のごとく (*in vitro* 成熟の項参照), 子宮頸管粘液中で体外受精せしめた例⁸⁴⁾ と合成培養液 (Bavister 液²⁾) を用いて成功した例⁸⁵⁾ がある。

受精卵の培養

2~4 細胞期から胎胚期までの *in vitro* 発達の成功例は家兎およびマウス卵で比較的に数多く報告されてきたが, 現在では, この両者卵は 1 細胞期から胎胚期までの發育が合成培養液を用いることで可能となり, しかもその成功率が高い (マウス^{69, 104)}, 家兎⁶⁹⁾)。マウスの初期分割卵は従来の組織培養液に比し簡単な液で発達が可能である¹¹²⁾。

BRINSTER^{9, 10, 11)} はマウス 2 細胞期卵が胎胚期まで發育するに乳酸, ビルビン酸 および ホスホエノールビルビン酸がエネルギー源として利用されることを証明した。BIGGERS ら⁵⁾ はマウス卵の分割時には外部からの特殊なエネルギー源が必要で, それは卵管から供給されると考えた。そしてその代表的なものとしてビルビン酸を挙げている。

既述のごとく, マウス受精卵の培養には無機塩類にビルビン酸, 乳酸, グルコース等のエネルギー源を添加した液が用いられ, これに牛血清アルブミンを補強したもので良好な発達がえられるので広く用いられる様になった (総説^{4, 112)})。

家兎卵では合成培養液の組合せたもの (Ham F12, RPMI 1640, Eagle) に Na-casein および牛血清を補強し閉鎖系で培養した結果, 74% もの 1 細胞期卵が胎胚まで發育すると報ぜられている⁶⁹⁾。OGAWA ら⁷²⁾ はこの液にビルビン酸-Na およびサイアミンプロビルダイサルファイドを補強して体外受精卵の培養を行なった結果, 胎胚期のみならず, さらに hatching 期まで発達せ

しめえた。KANE と FOOTE⁴⁷⁾ は家兎受精卵を (Ham F10 + ビルビン酸 + 牛血清アルブミン) 液で培養し胞胚期および *hatching* 期まで发育するのを認め、この发育には牛血清アルブミン添加が効果的であると考えている。

なお、マウス卵では系統によって同じ培養条件でも发育に極端な差が生ずることも認められている¹⁰⁹⁾。

卵子の成熟のみならず、胚の发育にホルモンが関与していることは推測されるところである。マウスおよびラットの着床前期卵ではエストロゲンで蛋白および核酸の生合成が促進されると言われている^{45,77,84,102,106)}。このホルモンが *in vitro* で直接卵子にとり込まれることも認められた⁹¹⁾。ステロイドホルモンが *in vitro* で哺乳動物卵に直接的に作用する事実があり、ステロイドホルモンが胚の酵素活性に直接作用をおよぼしていると考えられる。しかし、これまでの胚培養の結果からして *in vitro* での実験に限って言えば、これらホルモン(もしくはその作用)が、マウス家兎受精卵 1 細胞期より胞胚期までの正常发育に絶対不可欠なものであるとは考えがたい。

紫外線は勿論可視光線の照射でも胚の发育、特に初期卵割に不都合に作用するとの報告がある。たとえば、DANIEL²⁴⁾ によれば家兎受精卵の分割は可視光線照射で抑制されることから、効果的な培養には光を当てない様にするか、やむをえない場合に赤色光を用いる方が良いと述べた。しかし、家兎受精卵の培養において長時間、可視光線照射下でも、ほぼ *in vitro* におけると等しい发育がえられた事実^{69,71)}よりすれば、通常の可視光線が胚の发育を極端に抑制するとは認められない。

人卵子では SCHETTLES⁸²⁾ は子宮頸管粘液中で、EDWARD^{33,35,86,87)} は Ham F10 液中で培養し、各々胞胚期まで发育せしめた。家畜卵子では牛^{85,96)}、山羊⁹²⁾、羊^{98,78)}等で培養が行なわれているが、えられた胚の发育は上述してきた実験動物卵の例に比し劣る様である。最も良好な結果をえたものとして山羊受精卵を胞胚期まで发育せしめた例⁹²⁾と牛受精卵(2~4 細胞期)を 24~64 細胞期まで发育せしめた例⁹⁶⁾がある。

胞胚期および体節形成時胚の培養

哺乳動物胚は *in vitro* では初期胞胚期までにすでに发育を停止し、それ以上の发育はほとんどまれであるとされてきた。しかし最近では、*hatching* 期までの发育も可能となった^{47,72)}。家兎胞胚(交尾後 6 日)の培養によって、これを数日間发育せしめうるが、その发育は *in vitro* におけるよりおくれるのみならず奇形胚を生ずるようになる^{21,27,67,88,70)}。子宮の環境条件が胞胚の正常な

发育を統御していると考えられる、KRISHNAN と DANIEL⁴⁹⁾ は家兎胞胚の发育を促進する特殊な蛋白フラクションを子宮から分離した。彼らはこの物質をブラストキンと命名し、胞胚の正常な发育をこの物質が統御していると推定した。

一般に胞胚の培養では、胚の採取時期が後期になるにつれて *in vitro* 发育の進行が、より大になる傾向がある。LUTWAK-MANN⁵²⁾ は家兎胞胚(6 日令)を *in vitro* で原条形成時まで发育せしめた。OGAWA と NOZAWA⁶⁷⁾ は同令胚を TC 199+Bactrotryptose-phosphate 液に血清を添加したもので培養し 6~20 体節期まで发育せしめた。DANIEL²⁷⁾ は 6 日 18 時間の家兎胞胚を Ham F10 液 + 血清で NEW の再還流装置⁶¹⁾を利用して培養した結果、20 体節期(眼房、心持動形成)まで发育せしめた。OGAWA⁷⁰⁾ はこの方法を用いて 6 日令胞胚の培養を行なったが必ずしも良好な結果をうることができず、むしろ胞胚の胚盤面が浮力によって培養器上壁に圧迫され发育が結局抑止されると推定した。彼らはこの推定にもとづき多量の培養液を保持し、しかも液上面に広い気相を持つ静置培養法を用いた結果、DANIEL のえた成績²⁷⁾とほぼ同様な发育例を認めた。最近彼ら⁷¹⁾はビルビン酸を補強添加した合成培養液を用い、熱対流によって培養液の還流を起こす培養装置を考案して実験した結果、6 日 15~18 時間の家兎胞胚の 70% に 18~20 体節形成(もしくはそれ以上の发育、心搏動、肺、肝臓、眼房、脳の形成)を認めた。この成績には培養装置の他にビルビン酸補強の効果も関与していると考えられる。以上のごとく、家兎胞胚の *in vitro* 发育は現在までの実験では 20 体節前後までであって、この場合においても以後の培養で奇形の生ずることが認められている^{27,70,71)}。

Hsu⁴²⁾ はマウスの尾から抽出したコラーゲンを一種の支持装置として利用し、マウス胞胚を Eagle + 10% 牛血清液で培養した。その結果、胚に心搏動および血島の形成を認めた。原条、体節の形成があったか否かについての記載がないし、記載図から判断すると正常な发育胚とは認められない。

着床以降期胚の培養で代表的なものは NEW⁶¹⁾ の実験である。彼らは 95% O₂/5% CO₂ 混合気の流入圧によって培養液(主としてラット血清を用いた)を押し上げ、液の循環を起こす装置を用いラット胚を培養した。その結果、7~15 体節胚の培養では約半数例が 30~35 体節形成胚まで发育(この間 0.3~0.5 mg の蛋白が合成される)を認め、22~28 体節胚の培養では同じく半数例に 40~46 体節胚までの发育(1~1.5 mg 蛋白合成)を認めた。着床期以降期胚の培養では上記の実験成績が示すご

とく、気相の O_2 含量を多くする必要があり、さらに胚の支持手段についての工夫が必要となる。New らは初め胚の支持に血漿塊を用いた^{63,64)}が後になつて、カバーガラス上に固定されたレーヨン繊維片に胚のライヘルト膜を反転したものを接着せしめる胚の支持方法を採用した⁶¹⁾。尾川ら(未発表)⁷⁴⁾は家兎胞胚を *in vitro* で 20 体節時まで发育せしめたものを、さらにステンレス網上に固定した濾紙上に接着せしめて(鶏胚抽出液に家兎血漿を混じた液で胚の一部を埋浸せしめる)、前述の還流装置で培養した結果、2 日後に胎児-胎盤組織に相当する組織塊が急激に発達するのを認めた。またこの時期の胚への O_2 補給を効果的に行なう目的でフロロカーボンの培養液への添加実験を試みている⁷⁵⁾。ハムスター胚では GILVER と PIPAOLLO⁸⁹⁾ は交尾後 8~9 日胚(体節形成前期から 5~7 体節時)をミリポアフィルターに接着せしめ、Eagle+20~60% ハムスター血清還流方式により培養した結果、60% O_2 、5% CO_2 、35% N_2 の気相条件下で、*in vivo* 9.5 日胚の胎長相当までに发育する例を認めた。

JOLLY と LIEURE⁴⁶⁾ はラットおよびモルモット胚(原条から数体節形成時)を血清中で培養し发育せしめた。彼らはラットで実験例の 37% に心搏動形成を、9% に機能的血流の存在を認めた。ほぼ同様な成績がラット胚⁶⁶⁾および家兎胚¹⁰⁴⁾について報告されている。マウス胚(4~8 体節形成時)の培養により 15 体節前後の時期まで发育せしめたとの報告がある⁸³⁾。

哺乳動物胚の培養法が家畜繁殖等の生産的な面に、または人の不妊問題、人口問題等の解決手段に応用されるか否かは、今後の研究の進展いかんにかかっている。現段階では動物生殖の基礎的諸問題の解明に限られていると言えよう。小実験動物胚の培養によってえられた知見および方法はそのまま家畜胚の培養に適用されうるとは限らないにしても、人卵子の培養の例^{98,95,86,87)}等からみて、かなり有効に家畜胚培養に適用しうると推定される。そこでこれまでの培養でえられた知見が今後どのような研究に適用されうのか、またそのために解決されねばならない点等を幾つか挙げてみると;

(イ) *in vitro* 发育の限界: 理論上いわゆる試験管ベビーは可能とみる研究者があるかも知れない。しかし、これまで比較的多数の実験がなされている小実験動物胚の培養においてすらも、初期胞胚期から原条形成時までの培養が成功しているとは考えられず、ここに実験の空白部がある。もちろん胚を卵割時から連続的に体節形成時まで发育させることは成功していない。また培養に

よって胞胚期まで発達したものを移植する実験が行なわれてきたが、移植胚の全部が以後正常に発達するとの確実な証明もない。着床期および、それ以降期胚の培養についても、胚の支持方法、およびガス栄養補給交換 system の研究が一部にはある^{61,74)}にしても、本格的な実験はなされていない。ガス栄養交換のため、一つには人工血液の開発も必要であろう。この点で、ヘモグロビンの代用としてフロロカーボンの応用が考えられる。栄養補給は New⁶¹⁾ あるいは OGAWA ら⁷¹⁾の培養装置では不十分で、さらに積極的な栄養補給法が必要である。いづれにしても胚の発達の各時期における代謝に関する研究、免疫問題、人工胎盤、等について基礎的研究の積み重ねが必要であろう。現段階では、二、三の小実験動物では、初期胞胚の原線形成期までの培養の難点が解決されれば、1 細胞期より一応胎児とみなされる時期(20 体節以上)まで試験管内发育が可能である。さらに近い将来において小実験動物卵は培養により妊娠中期近くまで連続发育せしめうると推定される。

(ロ) クローン動物およびモザイク動物の生産: 哺乳動物の卵子は幾つかに分離されても各々は培養によってかなりの reorganization する能力を持つことから、1 個の胚から多数の成体をうることは原理的に可能である^{81,99)}。また数個の卵子を培養によって癒合させ、いわゆるキメラ動物をうることも可能となった^{53,56,94,95)}。これらの研究は遺伝、発生学上の研究手段として有用であるのみならず、理論的には家畜育種的手段として応用の可能性を示唆している。一方、奇形発生の解明手段として、また遺伝情報伝達の機構解明の手段として、将来胚の培養法は大規模に利用されるであろう。勿論、*in vitro* と言う制約された条件であるにしても、家兎胞胚の培養により体節形成後、高率に奇形を生ずる事実、あるいは培養ラット胚に対するトリパンプルーの催奇形作用の実験¹⁰⁸⁾等は培養法が初期胚の奇形発生機序を知るための手段として応用の可能性を示していると言える。

(ハ) 性の調節: 家兎胞胚の sex chromatin をしらべた後、胞胚を生体子宮内に移植しする実験が行なわれている⁹⁸⁾。これは現在最も信頼すべき性調節方法といえる。最近マウスの Y 精子に対する抗体を作製し、これが Y 精子の lysis を起こすことが報ぜられた⁴⁰⁾。このような抗体処理精子による受精時における卵の性支配の研究において胚の培養法が有効な手段となりうるであろう。なお、卵の Zona pellucida とか jelly coat 等に対する抗体をうることによって人口調節をくわだてることもできよう。

(ニ) 胚の保存: WHITTINGHAM¹¹¹⁾ はマウス胚の凍結保

存に成功した。彼は8細胞期胚よりも胞胚期の保存の成功率の高いことを認めた。大型細胞(1細胞期卵等)が凍結処理により障害を受けやすく凍結生存に不利と想定すれば、培養によって卵をある程度分割発育せしめ、胚の個々の細胞を小型化すれば凍結保存の可能性のあるのかも知れない。WHITTINGHAMの実験⁽¹¹⁾は上述の意味で、凍結保存に際しても胚の培養法が不可欠な中間段階であることを示唆すると言えよう。

文 献

- 1) AUSTINE, C. R. (1951) Aust. J. Sci. Res., Ser. B., 4: 581-596.
- 2) BAVISTER, B. D. (1969) J. Reprod. Fert., 18: 544-545.
- 3) BENNET, J. P., J. C. BOURSNEILL and C. LUTWAK-MANN (1958) Nature, 181: 1715-1717.
- 4) BIGGERS, J. D. (1971) J. Reprod. Fert., Suppl. 14: 41-50.
- 5) BIGGERS, J. D., D. G. WHITTINGHAM, and R. P. DONAHUE (1967) Proc. Natn. Acad. Sci., 58: 560-567.
- 6) BÖVING, B. G. (1954) Cold Spr. Harb. Symp. on Quant. Biol., 19: 9-28.
- 7) BRACKETT, B. G. and W. L. WILLIAMS (1965) J. Exp. Zool., 160: 271-282.
- 8) BRINSTER, R. L. (1963) Exp. Cell Res., 32: 205-208.
- 9) BRINSTER, R. L. (1965) J. Exp. Zool., 158: 59-68.
- 10) BRINSTER, R. L. (1965) J. Exp. Zool., 158: 69-78.
- 11) BRINSTER, R. L. (1965) J. Reprod. Fert., 10: 227-240.
- 12) BRINSTER, R. L. (1965) J. Exp. Zool., 158: 49-58.
- 13) BRINSTER, R. L. and J. L. THOMPSON (1966) Exp. Cell Res., 42: 308-315.
- 14) BROOKS, D. E. and C. LUTWAK-MANN (1971) Nature, 229: 202-203.
- 15) CHANDLEY, A. C. (1971) J. Reprod. Fert., Suppl. 14: 1-6.
- 16) CHANG, M. C. (1951) Nature, 168: 697-698.
- 17) CHANG, M. C. (1955) J. Exp. Zool. 128: 379-405.
- 18) CHANG, M. C. (1955) Science, 121: 867-869.
- 19) CHANG, M. C. (1959) Nature, 184: 466-467.
- 20) CHANG, M. C. (1971) Biol. Reprod., 4: 3-15.
- 21) COLE, R. J. and J. PAUL (1965) Ciba Found. Symp. Preimplant. Pregnancy, pp. 82-112.
- 22) CROSBY, T. F. and I. GORDON (1965) J. Agric. Sci., 76: 373-374.
- 23) CROSS, P. C. and R. L. BRINSTER (1970) Biol. Reprod., 3: 298-317.
- 24) DANIEL, J. C. (1964) Nature, 201: 316-317.
- 25) DANIEL, J. C. (1967) Growth, 31: 71-77.
- 26) DANIEL, J. C. (1968) J. Reprod. Fert., 17: 189-190.
- 27) DANIEL, J. C. (1970) Nature, 225: 193-194.
- 28) DANIEL, J. C. and R. S. KRISHNAN (1967) J. Cell Physiol., 70: 155-160.
- 29) DONAHUE, R. P. (1968) J. Exp. Zool., 169: 237-250.
- 30) DONAHUE, R. P. and S. STERN (1968) J. Reprod. Fert., 17: 395-398.
- 31) DZUIK, P. J. (1965) Anat. Rec., 153: 211-223.
- 32) EDWARDS, R. G. (1965) Nature, 208: 349-351.
- 33) EDWARDS, R. G. (1971) VII World Congr. Fert. Steril., Suppl. No. 2346, 106.
- 34) EDWARDS, R. G., B. D. BAVISTER, and P. C. STEPTOE (1969) Nature, 221: 632-635.
- 35) EDWARDS, R. G., P. C. STEPTOE and J. M. PURDY (1970) Nature, 227: 1307-1309.
- 36) FRASER, L. R., P. V. DANDEKER and R. A. VAIDY (1971) Biol. Reprod., 4: 229-233.
- 37) FRIDHANDLER, L., E. S. E. HAFEZ and G. PINCUS (1957) Exp. Cell Res., 13: 132-139.
- 38) 福田芳詔・岡田 修・豊田 裕 (1972) 第60回日畜大会要旨, 52頁,
- 39) GIVELBER, H. M. and J. A. DiPAOLO (1969) Nature, 220: 1131-1132.
- 40) GOLDBERG, E. H., E. A. BOYSE, D. BENNET, M. SCHEID and E. A. CARSWELL (1971) Nature, 232: 478-480.
- 41) GRAVES, C. N. and J. D. BIGGERS (1970) Science, 167: 1506-1508.
- 42) HSU, Y. C. (1971) Nature, 231: 100-103.
- 43) HUFF, R. L. and K. B. EIK-NES (1966) J. Reprod. Fert., 11: 57-63.
- 44) IWAMATSU, T. and M. C. CHANG (1969) Nature, 224: 919-920.
- 45) JACOBSON, M. S., M. K. SAYNAL and R. K. MEYER (1970) Endocrinology., 86: 982-987.
- 46) JOLLY, J. and C. LIEURE (1938) Arch. Anat. Micro., 34: 307-374.
- 47) KANE, M. T. and R. H. FOOTE (1971) Biol. Reprod., 4: 41-47.
- 48) KENNEDY, J. F. and R. P. DONAHUE (1969) Science, 164: 1292-1293.
- 49) KRISHNAN, S. and J. C. DANIEL (1967) Science, 158: 490-492.
- 50) LUTWAK-MANN, C. (1960) J. Reprod. Fert., 1: 316-317.
- 51) LUTWAK-MANN, C., J. C. BOURSNEILL and J. P. BONNET (1960) J. Reprod. Fert., 1: 169-185.
- 52) LUTWAK-MANN, C., M. F. HAY and C. E. ADAMS (1962) J. Endocrinol., 24: 185-197.
- 53) McLAREN, A. and P. BOWMAN (1969) Nature, 224: 238-240.
- 54) MILLS, R. M. and R. L. BRINSTER (1967) Exp. Cell Res., 47: 337-344.

- 55) MINTZ, B. (1964) J. Exp. Zool., 157: 85-100.
- 56) MINTZ, B. (1964) J. Exp. Zool., 157: 273-292.
- 57) MONESI, V. and V. SALFI (1967) Exp. Cell Res., 46: 632-635.
- 58) MOORE, N. W., and G. A. SPRAY (1972) J. Reprod. Fert., 28: 139.
- 59) MUKHERJEE, A. B. and M. M. COHEN (1970) Nature, 228: 472-473.
- 60) MURDOCH, R. N. and R. G. WALES (1971) J. Reprod. Fert., 24: 287-290.
- 61) NEW, D. A. T. (1967) J. Embryol. exp. Morph., 17: 513-525.
- 62) NEW, D. A. T. and K. F. STEIN (1963) Nature, 199: 297-299.
- 63) NEW, D. A. T. (1966) J. Reprod. Fert., 12: 509-524.
- 64) NEW, D. A. T. and K. F. STEIN (1964) J. Embryol. exp. Morph., 12: 101-111.
- 65) NEW, D. A. T. and P. T. COPPOLA (1970) J. Reprod. Fert., 21: 109-118.
- 66) NICHOLAS, J. S. and D. RUDNICK (1934) Proc. Natn. Acad. Sci., 20: 656-658.
- 67) OGAWA, S. and A. NOZAWA (1970) Jap. J. Fert. Steril., 15: 22-26.
- 68) OGAWA, S. and D. T. IMAGAWA (1969) Nature, 223: 407-408.
- 69) OGAWA, S., K. SATOH and H. HASHIMOTO (1971) Nature, 233: 422-424.
- 70) OGAWA, S., K. SATOH, M. HAMADA and H. HASHIMOTO (1972) Jap. J. Zooth. Sci., 43: 400-406.
- 71) OGAWA, S., K. SATOH, H. HASHIMOTO and M. HAMADA (1972) Nature (in press).
- 72) OGAWA, S., K. SATOH, M. HAMADA and H. HASHIMOTO (1972) Nature (in press).
- 73) OGAWA, S., K. SATOH and N. NEGISHI (1971) Nature 投稿中.
- 74) 尾川昭三・佐藤嘉兵・橋本 肇・浜田光磨: 第38回日本不妊学会関東部会講演, 昭和46年5月.
- 75) PAVLOK, A. (1967) Science, 157: 1457-1458.
- 76) PINCUS, G. and E. V. ENZMANN (1935) J. Exp. Med., 62: 665-675.
- 77) PRASAD, M. R. N., C. M. S. DASS and S. MOHLA (1968) J. Reprod. Fert., 16: 97-104.
- 78) QUIRKE, J. F. and I. GORDON (1971) J. Agric. Sci., 76: 369-372.
- 79) ROBERTSON, J. E. and R. D. BAKER (1969) Abst. Soc. Stud. Reprod. 2nd Ann. Meet. Univ. Calif. Davis.
- 80) SAYNAL, M. K. and R. K. MEYER (1970) Endocrinology., 86: 976-981.
- 81) SEIDEL, F. (1956) Naturwissenschaften, 43: 306-307.
- 82) SHETTLES, L. B. (1971) Nature, 229: 343.
- 83) SMITH, L. J. (1964) J. Embryol. exp. Morph., 12: 787-803.
- 84) SMITH, D. M. and A. E. S. SMITH (1971) Biol. Reprod., 4: 66-73.
- 85) SREENAN, J., P. S. SCANLON and I. GORDON (1968) J. Agric. Sci., 70: 138-185.
- 86) STEPTOE, P. C. (1971) VII World Congr. Fert. Steril., Suppl. No. 234b. 153.
- 87) STEPTOE, P. C., R. G. EDWARDS and J. M. PURDY (1971) Nature, 229: 132-133.
- 88) 菅原七郎・竹内三郎 (1967) 日畜会報, 38: 286-291.
- 89) SUGAWARA, S. and S. TAKEUCHI (1972) Jap. J. Fert. Steril., 17: 46-52.
- 90) 菅原七郎・辻井弘忠・竹内三郎 (1972) 第13回哺乳動物卵子談話会要旨, (於慶大医).
- 91) 菅原七郎・辻井弘忠・長谷川喜久・竹内三郎 (1972) 第60回日畜大会要旨, 55.
- 92) 杉江 信・相馬 正・大槻清彦 (1968) 第55回日畜大会要旨.
- 94) TARKOWSKI, A. K. (1961) Nature, 190: 857-860.
- 95) TARKOWSKI, A. K. (1971) J. Reprod. Fert., Suppl. No. 4, 31-40.
- 96) THIBAUT, C. (1966) Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys., 6: 159-164.
- 97) THIBAUT, C. and L. DAUZIER (1961) Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys., 1: 277-294.
- 98) 戸津川 清・三浦源三郎・菅原七郎・竹内三郎 (1972) 第60回日畜大会要旨, 57-58.
- 99) TOYODA, Y. and M. C. CHANG (1968) Nature, 220: 589-591.
- 100) 豊田 裕・横山峯介・星冬四郎 (1971) 家畜繁殖誌, 16: 147-151.
- 101) 豊田 裕・横山峯介・星冬四郎 (1971) 家畜繁殖誌, 16: 152-157.
- 102) 辻井弘忠・菅原七郎・竹内三郎 (1972) 第60回日畜大会講演要旨, 54.
- 103) TURBOW, M. M. (1966) J. Embryol. exp. Morph., 15: 387-395.
- 104) WADDINGTON, C. H. and A. J. WATERMAN (1933) J. Anat., 67: 355-370.
- 105) WALES, R. G., P. QUINN and R. N. MURDOCH (1969) J. Reprod. Fert., 20: 541-543.
- 106) WEITLAUF, H. M. and G. S. GREENWALD (1968) J. Exp. Zool., 169: 463-469.
- 107) WHITTEN, W. K. (1957) Nature, 179: 1081.
- 108) WHITTEN, W. K. (1971) (12) より引用.
- 109) WHITTEN, W. K. and J. D. BIGGERS (1968) J. Reprod. Fert., 17: 399-401.
- 110) WHITTINGHAM, D. G. (1968) Nature, 220: 592.
- 111) WHITTINGHAM, D. G. (1971) Nature, 233: 125-126.
- 112) WHITTINGHAM, D. G. (1971) J. Reprod. Fert., Suppl. 14: 7-22.
- 113) YANAGIMACHI, R. and M. C. CHANG (1963) Nature, 200: 281-282.
- 114) YANAGIMACHI, R. and M. C. CHANG (1964) J. Exp. Zool., 156: 361-376.
- 115) YANAGIMACHI, R. and M. C. CHANG (1966) J. Exp. Zool., 158: 275-286.
- 116) ZIMMERMANN, W., G. H. M. GOTTSCHWISKI, H. FARM and CH. KUNZ (1963) Dev. Biol., 6: 233-249.