In Vitro Fertilization and the Development of Eggs Following Transfer in Genetically Diabetic Obese (db/db) Mouse

Hiroshi SUZUKI, Saburo SHINGAI, Mamoru TOGASHI,
Tatsuya MIYAI and Michio OKAMOTO

*Drug Development Laboratories, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.
Toshimaku Tokyo 171*

(Accepted for publication May 8, 1987)

Summary. In vitro fertilization was performed by using gametes of diabetic obese mouse, C57BL/KsJ-db^m that is incapable of reproducing due to homozygous autosomal recessive diabetes (db). Newly ovulated eggs from db/db mice treated with 5 i.u. PMSG and 5 i.u. hCG were inseminated in vitro with spermatozoa recovered from the cauda epididymidis. At 6 hr after insemination, the oocytes were examined for the extrusion of 2nd polar body and the male and female pronucleus. The percentages of fertilized oocytes were 24%, 41%, 24% and 99% when oocytes were inseminated with db/db, adrenalectomized db/db (Adrex), db/+ and (C57BL/6J × C3H/HeN)F1 spermatozoa, respectively. The adrenalectomy could not make db/db males regain fertility but significantly increase in vitro fertilization rate. Number of abnormal spermatozoa in Adrex was significantly fewer than that of intact db/db. Only 28% of intact db/db and 39% of Adrex db/db cultured in the Whitten's medium containing 100 μ M EDTA developed into the blastocyst stage 120 hr after insemination. As a result of the transfer of 2-cell embryos which were fertilized with Adrex spermatozoa, eleven newborn (F:M=3:8) were obtained. These results indicated that in vitro fertilization technique can be applied for amelioration of defected reproductive ability in diabetic obese (db/db) mouse.

KEY WORDS: IN VITRO FERTILIZATION, C57BL/KSJ-DBM, CULTURE, ADRENALECTOMY, TRANSFER.

Jpn J Anim Reprod 33, 96-100, 1987

肥満性糖尿病 (db/db) マウスの体外受精と産仔への発生能

鈴木 宏志・新谷 参郎・富樫 守・宮井 達也・岡本 道生

中外製薬株式会社開発研究所, 171 東京都豊島区高田 3 丁目

マウスの体外受精に関しては, Whittingham (1968) の報告以来多くの研究が積み上げられ, 現在では高い受精率 (豊田ら, 1971a, 1971b) と正常な産仔への発生 (Mukherjee and Cohen, 1970; Mukherjee, 1972; Hoppe and Pitts, 1973; Kasai *et al.*, 1979; Massip *et al.* 1984; Suzuki and Toyoda, 1986) が報告されている。その結果, 受精から胚盤胞までの着床前の発生過程すべてを体外で進行させる技術が確立されている

(Mukherjee and Cohen, 1970; Mukherjee, 1972; Hoppe and Pitts, 1973; Kasai *et al.*, 1978; Kasai *et al.*, 1979; Massip *et al.*, 1984; 星と豊田, 1985; Suzuki and Toyoda, 1986)。しかしながら研究材料として汎用されている卵子および精子は, 特定の近交系およびそれらの雑種第1代 (F1) 由来の配偶子で, 各種病態モデルマウスを材料とした研究はまだ少ない (横山と小島, 1985)。今回, 著者らは体外受精技術の実験動物学分野

への応用として、ホモ個体 (db/db) は肥満性の糖尿病を発症し、雌雄ともに妊孕能を持たないため、ヘテロ (db/+) 同士の交配によって繁殖・維持されている C57BL/KsJ-dbm マウスに対し、雌雄ともにホモ個体を用いて、体外受精・胚の培養および産仔への発生能について検討した。

材料と方法

動物 実験には当研究所自家繁殖の C57BL/KsJ-dbm, MRL/MpJ および (C57BL/6J×C3H/HeN) F1 マウスを用いた。卵子提供動物には、肥満性の糖尿病を呈するホモ個体 (db/db; 5~13 週齢, 体重 17~47 g) を用い、精子提供動物には、無処置ホモ個体 (db/db; 10~14 週齢, 体重 42~53 g), 生後 4 週齢で副腎摘出を施したホモ個体 (db/db; 10~17 週齢, 体重 31~47 g, 以下 Adrex と記す), ヘテロ個体 (db/+; 10~21 週齢, 体重 26~31 g) および F1 (19~20 週齢, 体重 34~38 g) を用いた。なお、副腎摘出は、エーテル麻酔下で腰背部を切開して行った。動物の飼育条件は 14L:10D (5:00 点灯, 19:00 点灯) 温度 24±2°C, 湿度 50~60% に設定した。飼料 (CA-1; 日本クレア) および水は不断給与とし、ポリカーボネイト製平底ケージにカンナクズを入れて飼育した。なお、Adrex 雄については術後より給水に生理食塩水を与えて飼育した。

性周期の観察および排卵誘起の検討 (実験 I) 性周期の観察は、db/db および db/+ 雌マウスについて 9 週齢より 12 日間, 15:00 に陰スメア法により行った。また、PMSG (PMS センヤク; 日本全薬工業) 2.5, 5.0 および 100 i.u. を 18:00~19:00 に皮下投与し、48 時間後に hCG (プベローゲン; 三共ゾーキ) 5 i.u. を皮下投与して過排卵誘起処置の有効性を検討した。hCG 投与後 15~16 時間に、摘出した卵管を 2 枚のスライドガラスではさみ、顕微鏡下で卵管膨大部内の排卵卵子数を観察した。なお、一部については、体外受精後に観察を行った。

体外受精および培養 (実験 II) 体外受精は豊田ら (1971a) の方法に準じて行った。db/db 雌マウスに PMSG および hCG 各 5 i.u. の投与後、卵管膨大部より採取した卵子を、流動パラフィンに覆われたプラスチックシャーレ (35×10 mm; Falcon) 内の 0.2 ml の TYH (豊田ら, 1971a) に導入した。精子については、雄マウスの精巣上体尾部より採取し、0.1 ml の TYH 内で 2 時間のブレインキュベートを行った。次いで、10

μl の精子懸濁液を、卵子を含む培地に添加することにより体外受精を行った。体外受精時の最終精子濃度は、500~1500 精子/μl であった。授精後 6 時間に第 2 極体の放出および雌雄両前核の認められた卵子を受精卵と判定し、100 μM EDTA 添加 Whitten's (Whitten, 1971) 培地に移しかえ、37°C, 5% CO₂, 95% 空気の気相下で授精後 120 時間まで培養した。胚の発生段階の観察は、倒立顕微鏡下で 24 時間間隔で行った。また、少量の精子懸濁液をスライドガラスに塗抹・風乾し、ローズベンガル液で染色後、鏡検して奇形精子数を算出した。

移植 (実験 III) 授精後約 30 時間に発生した Adrex 区の 2 細胞期胚を陰腔確認日の MRL/MpJ 偽妊娠雌マウスの卵管に、以下の方法で移植した。ペントバルビタールナトリウム (ネンブタール; アボットラボラトリーズ) の腹腔内注射により麻酔を施した受容雌の左右の腰背部を切開し、卵巣・卵管および子宮を引き出した。次いで、卵巣のうを電気メス (サンテック, SLS-40 w; サンスター技研) を用いて切開し、マウスピースに接続したガラス毛细管ピペットを用い、少量の培地とともに卵管一側あたり 3~4 個の胚を注入した。術後は、受容雌を個別飼育して分娩について観察した。なお一部については帝王切開を施し産仔を得た。

統計処理 体外受精率および培養成績については、 χ^2 -検定を、精子の奇形率については、単一要因分散分析を行った。

結 果

実験 I db/+ は不規則な性周期を呈してはいたが、全例 (n=5) に発情期の出現が認められ、2 例は規則的な性周期を 2 回繰り返した。一方、db/db では全例 (n=5) 観察期間中発情休止像のみが観察され、自然排卵が起こっていないことが示唆された。PMSG および hCG による過排卵誘起処置の結果 (Table 1), PMSG 2.5~

Table 1. Number of ovulated oocytes after injection of PMSG and hCG

Dose (i.u.)		Numbers of ova (mean±S.D.)	
PMSG ¹⁾	hCG ¹⁾	db/db	db/+
2.5	5.0	9.0±5.7 (8) ²⁾	8.2±7.6 (10)
5.0	5.0	14.2±7.5 (62)	14.3±7.6 (26)
10.0	5.0	16.3±7.6 (20)	22.6±6.4 (10)

1) The interval between PMSG and hCG injections was 48hr.

2) Number of females.

Table 2. In vitro fertilization of C57BL/KsJ-dbm mouse eggs by epididymal sperm

Female	Male	No. of fertilized eggs/no. of eggs examined (%)
db/db	db/db	115/482 (24) ^a
	Adrex ¹⁾	423/999 (41) ^b
	db/+	93/392 (24) ^a
	F1 ²⁾	124/125 (99) ^c

1) Adrenalectomized db/db.

2) C57BL/6J X C3H/HeN.

Values with different superscripts are significantly different at $P < 0.05$.

Table 3. Abnormality of spermatozoa

Strain	Genotype	No. of animals	% of abnormal spermatozoa
C57BL/KsJ-dbm	db/db	12	54.2 ^a
	db/db (Adrex) ¹⁾	11	42.4 ^b
	db/+	12	44.3 ^b
(C57BL/6J X C3H/HeN)F1	—	8	8.3 ^c

1) Adrenalectomized db/db.

Values with different superscripts are significantly different at $P < 0.05$.

Table 4. Preimplantation development of C57BL/KsJ-dbm mouse embryos fertilized in vitro

Genotype of male	No. of embryos cultured	No. (%) of embryos developed to:				
		2-cell	4-cell	Morula	Blastocyst	
		(24hr) ³⁾	(48hr) ³⁾	(72hr) ³⁾	(96hr) ³⁾	(120hr) ³⁾
db/db	61	41 (67) ^a	19 (31) ^a	11 (18) ^a	10 (16) ^a	17 (28) ^a
Adrex ¹⁾	74	74 (100) ^b	32 (43) ^{a,b}	22 (30) ^a	17 (23) ^a	29 (39) ^{a,b}
db/+	28	28 (100) ^b	15 (54) ^{b,c}	4 (14) ^a	8 (29) ^a	14 (50) ^{b,c}
F1 ²⁾	77	69 (90) ^b	53 (69) ^c	36 (47) ^b	40 (52) ^b	47 (61) ^c

1) Adrenalectomized db/db.

2) C57BL/6J X C3H/HeN.

3) Hours after insemination.

Values with different superscripts are significantly different in the same column at $P < 0.05$.

Table 5. Offspring developed from C57BL/KsJ-dbm (db/db) mouse embryos fertilized in vitro and transferred to recipient mice

No. of embryos transferred	No. of pregnant/no. of recipient (%)	No. of implantations (%)	Newborn		
			No. (%)	F	M
77	8/12 (67)	26 (34)	11 (14)	3	8

Two-cell stage embryos were transferred into the oviducts of MRL/MpJ females on day 0 of pseudo-pregnancy.

10.0 i.u. 投与区すべてにおいて、db/db および db/+ 全例に排卵が観察され、db/db においても PMSG-hCG 法による排卵誘起が可能であった。特に PMSG 5.0 i.u. 区では db/+ の 14.3 ± 7.6 個に対し、db/db でも 14.2 ± 7.5 個で、ほぼ同数の排卵が観察された。

実験 II 授精後6時間における体外受精成績は、Table 2 に示す通りであった。db/db 区および db/+ 区の受精率は、それぞれ 24% と低率であった。一方、Adrex 区では、41% の卵子が受精し、db/db 区および db/+ 区に比べ有意に高い値であった ($p < 0.05$)。また、F1 区では 99% と高率であった。精子の奇形率 (Table 3) は、F1 (8.3%) に比較して db/db (54.2%)、Adrex (42.4%) および db/+ (44.3%) は、有意に高かった。しかし、副腎摘出により db/db の奇形率は有意に減少した ($p < 0.01$)。授精後 120 時間までの培養成績を (Table 4) に示した。授精後 24 時間における 2 細胞期への発生率は、db/db 区の 67% を除き他の区では 90~100% と高率であった。授精後 48 時間に 4 細胞期に発生した胚の割合は、db/db 区で 31%、Adrex 区で 43% と F1 区 (69%) に比較して有意に低かった ($p < 0.05$)。しかし、db/+ 区 (54%) では、F1 区と比べ差がなかった ($p > 0.05$)。授精後 72 時間の桑実胚 および 授精後 96 時間の胚盤胞への発生率については、db/db 区、Adrex 区および

db/+ 区の3区間に差は認められなかったが、授精後120時間における胚盤胞への発生率は、4細胞期への発生率と同様の傾向が認められた。

実験 III 合計77個の2細胞期胚を12例の受容雌に移植した結果 (Table 5), 8例が妊娠に至り、このうち7例の受容雌から、移植胚の14%に相当する11例 (雌:雄=3:8) の生存産仔が得られた。なお、分娩例7例のうち4例は、帝王切開によるものであった。

考 察

C57BL/KsJ-dbm マウスの雌雄ともに妊娠能を持たないホモ個体同士の繁殖が、体外受精技術を用いることにより可能となることが判明した。Johnson and Sidman (1979) は、db/db 雌マウスでは、GnRH の放出異常が不妊の原因であり、卵巣は性腺刺激ホルモンに対する感受性を有していると考えしている。本実験におけるPMSG-hCG 法による排卵誘起処置の結果は、彼らの主張を裏付けるものであった (Table 1)。嶋川ら (1985) は、遺伝性の肥満動物である Zucker fatty ラットについて、雄ラットに副腎摘出を施すことにより生殖能力が改善されることを報告した。さらに、副腎摘出は肥満マウスである ob/ob および db/db にも適用し得ると推察しているが、本実験における予備試験の結果では、db/db マウスに対する副腎摘出は、体重増加および尿糖の出現を抑制することはできなかったものの、妊娠能の回復には至らなかった。しかし、体外受精成績においては (Table 2)、副腎摘出の顕著な改善効果が認められ、db/db 区の24%に対し、Adrex 区では41%と有意に高まった ($p<0.05$)。体外受精率におよぼす副腎摘出の効果の要因については、本実験では明らかにされなかったが、精子の奇形率の改善がその一因かも知れない (Table 3)。なおブレインキューベート後の精子の活力は、F1 精子と比較すると劣るものの、いずれの遺伝子型においても比較的良好であった。授精後120時間までの培養成績 (Table 4) では、F1 区と比較して db/db 区および Adrex 区で、4細胞期以降の発生率が有意に低かった。授精後6時間における観察において、第2極体放出途上の卵子や第2極体は有してはいるが、雌雄の両前核が明瞭でない卵子が認められたことから、着床前の発生率が低いことは、精子の侵入時期の遅れに起因する発生の遅れを示していると推察される。また、F1 区の比較的低率な4細胞期以降の発生率は、卵子側の要因はもとより、過度の多精子受精によることも考えられ、至適精子濃度の検討が必要である。Adrex 区の2細胞期胚の移植に

よって生存産仔が得られたことにより (Table 5)、体外受精技術の実験動物、特に貴重な病態モデル動物の繁殖維持への応用の可能性が示唆された。今後、左右の卵管 (子宮) に遺伝的に異なる胚を移植し分けて、胎仔治療あるいは薬効評価の検討を図るなど、体外受精-培養-胚移植系を活用した新しい実験系の開発も期待される。特に遺伝性疾患モデル動物において、明らかなホモ個体 (発症個体) 作出が可能となると、胎生期および新生仔期等の発症前の動物による実験が計画できる。

References

- Hoppe PC, Pitts S (1973) Fertilization in vitro and development of mouse ova. *Biol Reprod* 8: 420-426.
- Hoshi M, Toyoda Y (1985) Effect of EDTA on the preimplantation development of mouse embryos fertilized in vitro. *Jpn J Zootech Sci* 56: 931-937 (in Japanese).
- Johnson LM, Sidman RL (1979) A reproductive endocrine profile in the diabetes (db) mutant mouse. *Biol Reprod* 20: 552-559.
- Kasai K, Minato Y, Toyoda Y (1978) Fertilization and development in vitro of mouse eggs from inbred strains and F1 hybrids. *Jpn J Anim Reprod* 24: 19-22.
- Kasai K, Sugimoto M, Toyoda Y (1979) Normal progeny produced by the parent derived from mouse eggs fertilized in vitro. *Jpn J Zootech Sci* 50: 885-890.
- Massip A, Van der Zwalm P, Puissant F, Camus M, Leroy F (1984) Effects of in-vitro fertilization, culture, freezing and transfer on the ability of mouse embryos to implant and survive. *J Reprod Fert* 71: 199-204.
- Mukherjee AB (1972) Normal progeny from fertilization in vitro of mouse oocytes matured in culture and spermatozoa capacitated in vitro. *Nature* 237: 397-398.
- Mukherjee AB, Cohen MM (1970) Development of normal mice by in vitro fertilization. *Nature* 228: 472-473.
- Shimakawa Y, Oomari Y, Masaki T, Odaka Y, Sano Y, Matsuo T (1985) unpublished.
- Suzuki H, Toyoda Y (1986) Normal young from in vitro fertilized mouse embryos developed in a medium supplemented with EDTA and transferred to pseudopregnant recipients. *J Mamm Ova Res* 3: 78-85.
- Toyoda Y, Yokoyama M, Hosi T (1971a) Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro. I. In vitro fertilization of eggs by fresh epididymal sperm. *Jpn J Anim Reprod* 16: 147-151 (In Japanese).

- Toyoda Y, Yokoyama M, Hosi T (1971b) Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro. II. Effects of in vitro pre-incubation of spermatozoa on time of sperm penetration of mouse eggs in vitro. *Jpn J Anim Reprod* 16: 152-157 (In Japanese).
- Whitten WK (1971) Nutrient requirements for the culture of preimplantation embryos in vitro. *Advan Biosci* 6: 129-141.
- Whittingham DG (1968) Fertilization of mouse eggs in vitro. *Nature* 220: 592-593.
- Yokoyama M, Kojima H (1985) unpublished.

要 約

遺伝性の肥満性糖尿病を呈する C57BL/KsJ-dbm マウスを用い、雌雄共に妊孕能のない発症個体 (db/db) 間の体外受精・培養および産仔への発生能について検討した。db/db に PMSG-hCG 法により排卵誘起を施し、db/db、副腎摘出 db/db (Adrex)、db/+ および (C57BL/6J×C3HeN) F1 の精巢上体精子を用いて体外受精を行った。F1 区の受精率に比べ、Adrex 区 db/db 区および db/+ 区では低率であったが、体外受精率に及ぼす副腎摘出の有意な効果が認められた。また、Adrex 区の 2 細胞期胚の移植により、移植胚の 14% に相当する 11 例の産仔が得られた。