

C57BL/6 系未成熟卵子を用いた成熟後における レーザー穿孔処理・体外受精方法の検討

西村 愛美¹、大本 夏未¹、西山 有依²、柳 美穂³、
三谷 匡⁴、細井 美彦¹、入谷 明⁴、安齋 政幸⁴、

要 約

本実験では成熟齢 C57BL/6J マウスから得られた体外成熟卵子を作出し、レーザー穿孔処理法を用いて各出力条件下 (200, 150, 120 μ sec.) で透明帯穿孔処理を行ない、その後の体外受精および発生能を検討した。C57BL/6J 卵巣より回収した未成熟卵子の体外成熟成績は、91% (1, 517/1, 674) であった。レーザー穿孔処理時間による受精成績は、それぞれ、60% (191/316), 54% (103/192), 45% (196/439) であり、対照区 (28% : 129/463) と比較し有意な差が認められた ($P < 0.05$)。また一部を培養した結果、胚盤胞期への発生率は 31% (32/102), 51% (74/144), 53% (40/75) であった。2細胞期胚を移植した結果、レーザー出力を低出力にした場合、産子の発生向上が確認された [6% (5/81), 13% (10/83), 21% (12/56)]。さらにレーザー照射による熱変性を避けるため、卵細胞質を収縮させた透明帯穿孔卵子における受精成績も同様に対照区と比較し有意に向上した ($p < 0.05$)。以上の結果より、C57BL/6J 未成熟卵子の体外成熟およびレーザー穿孔処理の条件を調整することにより、産子への発生を改善することが示唆された。

諸 言

近年、様々な遺伝子改変動物¹⁾が作製されヒトの疾患モデルとして研究が進んでいる。実験動物で多用されているマウスやラットにおいて、多くの系統が育成されており、遺伝子改変動物^{2), 3)}も多く作成されている。それらの数は増える傾向にあり、飼育スペース、コストなどの問題点から、胚および配偶子のバイオリソース化⁴⁾が普及している。しかし、系統によっては受精能力や産子への発生能が低率であるため系統維持が困難であるものや、成熟齢に達しても繁殖能力を持たない個体も存在する。そのような系統の維持や供給に体外受精技術⁵⁾や胚・配偶子の凍結保存技術⁶⁾が用いられており、PZD (Partial zona dissection)⁷⁾, ZD (Zona drilling)^{8), 9)}, ICSI (Intracytoplasmic sperm injection)¹⁰⁾, SUZI (Subzonal sperm injection)¹¹⁾など様々な生殖補助技術や冷蔵保存技術¹²⁾などを組み合わせた生殖工学技術¹³⁾が使用されている。さらに未成熟な卵子細胞¹⁴⁾または精子細胞¹⁵⁾を用いることでも産子が得られており、遺伝子資源を保存し、有効に使用することはゲノム解析や発生のメカニズムを解明する上で重要であると思われる。

私たちは、遺伝子改変マウスの作製に広く用いられている近交系 C57BL/6J マウス卵巣より回収した未成熟な卵子細胞からの体外成熟操作およびその後の発生能を検討したところ、生殖補助技術を使用することで、今までに多く報告されている交雑種¹⁶⁾またはクローズドコロニー¹⁷⁾と同様に、低率ではあるが産

1. 近畿大学生物理工学部 遺伝子工学科 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

2. 近畿大学大学院生物理工学研究科 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

3. アーク・リソース株式会社 〒861-5271 熊本県熊本市中原町 383-2

4. 近畿大学先端技術総合研究所 〒642-0017 和歌山県海南市南赤坂 14-1

子へ発生することを明らかにした¹⁸⁾。

そこで本実験では、体外成熟卵子を用いたレーザー穿孔処理における照射時間の変更がその後の体外受精および発生能に与える影響を検討した。

材料および方法

(1) 採卵操作および体外成熟操作

採卵および体外での成熟操作は佐東らに準じて行った¹⁸⁾。供試動物には成熟齢に達した C57BL/6J マウス（日本クレア（株））を用いた。この雌マウスに妊馬血清性腺刺激ホルモン（以下、PMSG）（セロトロピン：あすか製薬（株））を 7.5 単位腹腔内投与した。PMSG 投与後、46 ~ 48 時間後に卵巣を摘出した。続いて、0.1% ヒアルロニダーゼを含む CZB-HEPES 培地中にて 26G の注射針を用いて卵巣下における発達した胞状卵胞を細切することにより、卵巣から卵核胞期の未成熟卵子（以下、GV 期卵子）を回収した。形態学的に正常な卵子卵丘細胞複合体を回収し、続いて回収した GV 期卵子は同培地にて、ピペッティングによって卵丘細胞を除去した。成熟培地には Miki らの報告した TaM 培地に 5% ウシ胎仔血清を添加した修正 TaM 培地（以下、mTaM 培地）を用いた。卵丘細胞を除去した卵子は 1 ドロップ 50 μ L に約 30 ~ 40 個の GV 期卵子を炭酸ガスインキュベーター内（37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ in air）にて 16 時間培養し体外成熟を行った。培養後の体外成熟の確認は、実体顕微鏡下（Stemi2000：ZEISS）にて卵核胞崩壊が認められた形態学的に正常な卵子を回収した（Fig.1）。

(2) 体外成熟卵子の穿孔処理操作

第二減数分裂中期（以下、M II 期卵子）に成熟した体外成熟卵子（Fig.2）は、続いてレーザーによる透明帯穿孔処理（以下、レーザー穿孔処理）を行った。すなわち、回収した M II 期卵子はレーザー穿孔装置（XYClone：ニッコー・ハンセン（株））を取り付けた倒立顕微鏡（IX70：オリンパス）のステージ上に移動させ、そのレーザー穿孔装置を使用し、卵細胞質と囲卵腔とのスペースが最も広い 1 ケ所に照準を合わせ、レーザー光を照射した。照射時間は、200 μ sec., 150 μ sec., 120 μ sec. とし、透明帯にそれぞれ直径約 12 μ m, 9 μ m, 6 μ m の穿孔処理を施した（Fig.3）。レーザーの波長および出力は波長 1,480nm, 出力 300mW とした。穿孔処理後の生存卵子は、mTaM 培地中で媒精直前まで炭酸ガスインキュベーター内で静置した。

(3) 体外受精操作および胚発生能の検討

体外受精は豊田らの方法にほぼ準じて行った⁵⁾。すなわち、同系統の成熟雄マウスの精巣上体尾部より採取した新鮮精子を、2mM ハイポタウリン添加した修正 HTF 培地¹⁹⁾（アーク・リソース（株）, 以下、mHTF 培地）にて 1.5 時間培養し、受精能を獲得させた。続いてレーザー穿孔処理を施した卵子を mHTF 培地へ移し、受精能獲得させた精子と媒精を行った。媒精後 6 時間目に雌雄前核形成を確認した後、KSOM 培地²⁰⁾（アーク・リソース（株））でそれら卵子の洗浄を行い、その後 18 時間、炭酸ガスインキュベーター内にて培養し 2 細胞期胚への発生を確認後、引き続き、胚盤胞期胚まで発生させた。さらに、一部の 2 細胞期胚は、偽妊娠第 1 日目の MCH（ICR）マウス（日本クレア（株））へ卵管移植²¹⁾を行い、産子への発生能を検討した。また対照区として穿孔処理を行わない未処理区成熟卵子を同様に体外受精し、その後の発生能を検討した。

(4) 統計学的解析

全ての実験操作における統計処理は、分散分析値を求めた後、Fisher の PLSD により解析し、 $p < 0.05$ を有意差とした。

なお本実験に際して、実験の立案やおよび動物の飼養については、近畿大学動物実験規定に準じて行った。

結 果

成熟 C57BL/6J マウス卵巣から未成熟卵子（以下、GV 期卵子）を回収し、修正 TaM 培地にて成熟培養を検討した結果、91% (1,517/1,674) で卵核胞の崩壊を認めた。

体外成熟させた卵子を各透明帯穿孔照射条件 (200, 150, 120 μ sec.) においてレーザー穿孔処理を施し、体外受精した成績を表 1 に示した。それぞれのレーザー穿孔処理区における受精成績は、60% (191/316), 54% (103/192), 45% (196/439) であった。またレーザーの熱変性を防ぐために 0.25M Sucrose を用いて卵細胞質を収縮させて穿孔を施した区では、48% (166/344) であり、いずれもレーザー穿孔を施していない対照区と比較し、有意な差が認められた ($P < 0.05$)。

体外受精で得られた一部の胚を用いた初期胚の発生成績を表 2 に示す。それぞれの胚盤胞期への発生成績は、31% (32/102), 51% (74/144), 53% (40/75) であり、細胞質を収縮し、穿孔処理を行った区では 59% (51/86) であり、レーザー照射時間の変更が胚盤胞期への発生を向上させることが認められた。

2 細胞期胚の一部を偽妊娠第 1 日目の MCH (ICR) 系統の雌マウスに卵管移植後、19.5 日目に帝王切開を行い、産子への発生を確認した (表 3)。各レーザー照射時間による産子成績はそれぞれ 6% (5/81), 13% (10/83), 21% (12/56) であった。卵細胞質を収縮させてレーザー穿孔を施した区では 30% (18/61) であり、レーザー照射時間を短縮するほど発生率が向上しており、細胞質を収縮させ、照射時間 120 μ sec. で穿孔したものは 200 μ sec. で穿孔したものと比較して有意に高い成績を示した ($p < 0.05$)。また、得られた産子は、妊孕性の確認のため成熟齢に達した後、無作為に選抜した雌雄を自然交配したところ、正常産子が得られた。

考 察

卵巣内の第一減数分裂前期の卵母細胞は卵黄蓄積を終えて完全に成長したものでも、受精および発生能を持たず、卵成熟は複数の因子の相互作用によって誘起されることが知られている。マウスにおいて、卵丘細胞を除去した未成熟卵子は自然と成熟が起こることが示され²²⁾、これは卵丘細胞で生産された cAMP が卵丘細胞と卵母細胞のギャップ結合を通過して卵母細胞で移行することで成熟の抑制を行い、このギャップ結合を消失させてしまうことで、cAMP の移行が不可能となり卵母細胞は cAMP の阻害作用から解放され、卵成熟が誘起される。本実験においても、予め未成熟卵子の培養は卵丘細胞を除去しており、このため cAMP の阻害作用が低下し、体外成熟が引き起こされたと考えられる。さらに未成熟卵子の体外培養には様々な培地が用いられているが、その後の発生能は低い²³⁾。Miki らの報告によると、ミトコンドリアや微小管の分布から成熟、胚発生に問題があるマウス卵子の体外成熟を、細胞質内における浸透圧力の抑制効果を示す TYH 培地とアミノ酸含有 α -MEM 培地の 2 つの培養培地を混合することで改善することが示された¹⁶⁾。今回、Miki らの報告した TaM 培地をさらに細胞質内変性を抑制するため、5%FBS を加えた mTaM 培地を用いて体外成熟を試みたところ、90% 以上の高い成熟成績を示し効率的に卵子の回収を可能とした。

湊らは、体外成熟させた未成熟卵子を体外受精させると、精子侵入率や雄性前核形成率が過排卵で得られた体内成熟由来よりも低下すると述べている²⁴⁾。また、Eppigらは、体外成熟卵子は核相から判断すると、受精や発生を引き起こすのに十分な状態であるのにも関わらず、実際にはそれらの現象を行うだけの能力が体内で成熟した卵子よりも細胞質成熟が不十分であることが考えられている²⁵⁾。今回、レーザー穿孔処理法の適用により、透明帯に穿孔処理を施した体外成熟由来卵子の体外受精率は、45～60%であり、対照区(28%)と比較し良好な受精成績を示した。Kanekoらは、受精能力の低い、C57BL/6凍結精子を透明帯穿孔処理法にて受精率の向上を確認し²⁶⁾、Anzaiらも同様に低受精能を呈する遺伝子改変マウス精子を用いた透明帯穿孔処理卵子の産子獲得に成功しており²⁷⁾、この生殖補助技術を用いることで、これら未成熟卵子の成熟後における受精卵の獲得技術として有用であると思われる。さらに、卵丘細胞除去卵子での体外受精は、受精率に変動があり²⁸⁾、媒精に必要な精子数を多くする必要があることから、卵丘細胞は精子が卵母細胞の存在を認識し、受精能力を向上する働きがあるとされる²⁹⁾。今回、供試した体外成熟由来卵子も同様に卵丘細胞除去しており、その受精率は透明帯穿孔卵子と比較し、9%～60%と受精成績の再現性に乏しく、レーザー穿孔処理操作を用いることによって安定して受精卵を得られることが示された。一方、レーザー穿孔時の熱量が卵細胞質に触れることでタンパク質変性が起こり、その後の発生能が低下することが示されている³⁰⁾。佐東らはレーザー穿孔処理時間を200 μ sec.にして得られた透明帯穿孔卵子を用いて、体外受精および産子の発生能をピエゾ穿孔処理卵子と比較した結果、レーザー穿孔処理胚での産子発生能に差が認められた¹⁸⁾。本実験においても、胚盤胞期への発生率はレーザー照射時間を調整することで改善されるが、31～59%と体内成熟卵子由来(82%:263/321)と比較して低率であり、その発生は桑実期胚から胚盤胞期胚にかけて発生が低下傾向にあった。8細胞期から桑実期におこるコンパクションはCa²⁺イオンに依存した現象であり、細胞接着因子の1つであるE-カドヘリンが関与していることが明らかとなっている。E-カドヘリンは卵母細胞時に既に存在しており、胚性ゲノム活性時に新たな合成が開始される。E-カドヘリン遺伝子を欠損させた胚では胚盤胞期へ発生できないが、ヘテロノックアウトマウス同士の交配から得られた胚においてE-カドヘリン遺伝子が欠損していてもコンパクションを起こす³¹⁾。これは母性RNAがタンパク質として残っていたためであると考えられており、胚コンパクションと胚盤胞期胚への発生は母性遺伝子と胚性遺伝子の両方によって依存している。このことから、体外成熟由来胚において母性由来遺伝子または胚性遺伝子の発現量が低下しているため、胚盤胞期への発生低下を誘因していると考えられた。今回、レーザーの照射時間の変更がその後の産子発生能におよぼす効果は、レーザー穿孔処理による透明帯開孔サイズが縮小するため精子侵入率が低下し受精率が低下する傾向が認められたが、産子への発生には、この穿孔処理時間の変更がより多く獲得できることが示され、今後、受精方法のさらなる改良および胚発生に関わる遺伝子発現の特定が、様々なマウス系統における体外成熟由来卵子からの発生能の向上へ期待できると思われる。

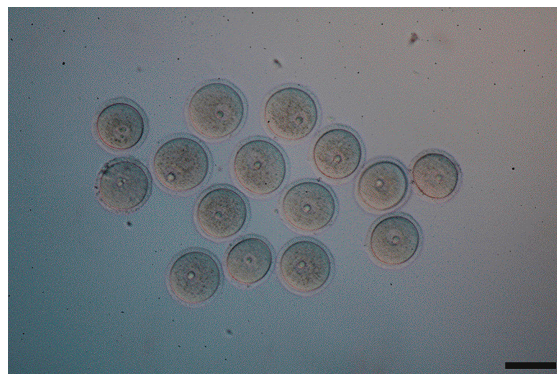


Fig.1 C57BL/6J マウス卵巣から回収した裸化GV期卵子
スケールバーは100 μ mを示す

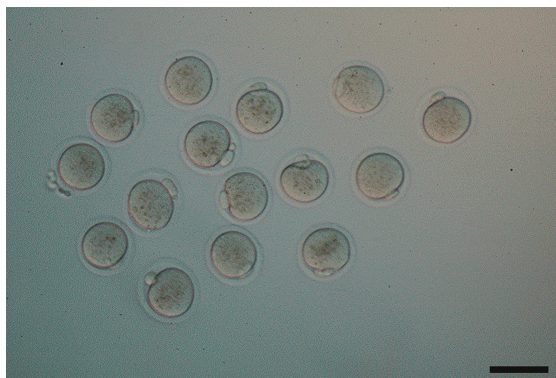


Fig.2 C57BL/6J 由来 GV 期卵子を成熟培養して得られた M II 期卵子
スケールバーは 100 μm を示す

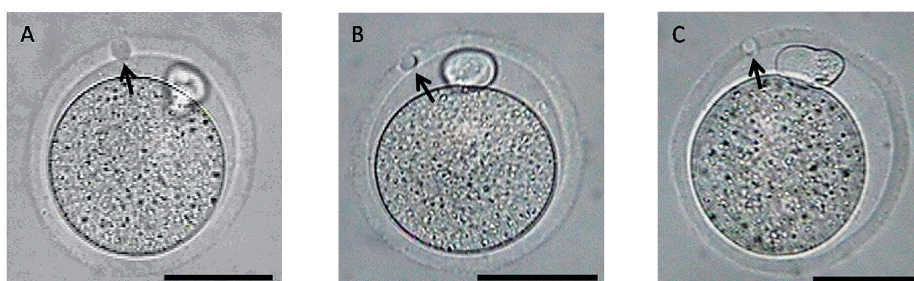


Fig.3 各レーザー照射時間における透明帯穿孔像 (矢印は穿孔位置を示す)
A : 照射時間 200 μsec . (直径, 約 12 μm)
B : 照射時間 150 μsec . (直径, 約 9 μm)
C : 照射時間 120 μsec . (直径, 約 6 μm), スケールバーは 50 μm を示す

表 1 C57BL/6J 体外成熟由来卵子を用いた体外受精成績

処理区	供試卵数	受精卵数 (%)	2 細胞期胚数 (%)
対照区	463	129 (28) ^a	117 (91)
200 μsec .	316	191 (60) ^b	169 (88)
150 μsec .	192	103 (54) ^b	102 (99)
120 μsec .	439	196 (45) ^c	167 (85)
120 μsec . ¹⁾	344	166 (48) ^c	149 (90)

¹⁾ Sucrose を用いて穿孔処理 (120 μsec .) を施した
異文字間に有意差あり P<0.05

表2 C57BL/6Jにおけるレーザー穿孔処理を施した体外成熟由来胚の発生成績

処理区	2細胞期胚数	桑実期胚数 (%)	胚盤胞期胚数 (%)
対照区	31	28 (90)	11 (36) ^a
200 μ sec.	102	78 (76) ^a	32 (31) ^a
150 μ sec.	144	120 (83)	74 (51) ^a
120 μ sec.	75	62 (83)	40 (53) ^a
120 μ sec. ¹⁾	86	75 (87)	51 (59)
体内成熟卵	321	296 (92) ^b	263 (82) ^b

¹⁾ Sucrose を用いて穿孔処理 (120 μ sec.) を施した異文字間に有意差あり P<0.05

表3 C57BL/6Jにおけるレーザー穿孔処理を施した体外成熟由来胚の移植成績

処理区	移植胚数	着床数 (%)	産子数 (%)	産子数	
				♀	♂
対照区	55	33 (60)	14 (26)	5	9
200 μ sec.	81	15 (19)	5 (6) ^a	5	0
150 μ sec.	83	35 (42)	10 (13)	7	3
120 μ sec.	56	25 (45)	12 (21)	4	8
120 μ sec. ¹⁾	61	34 (56)	18 (30) ^b	10	8

¹⁾ Sucrose を用いて穿孔処理 (120 μ sec.) を施した異文字間に有意差あり P<0.05

参考文献

1. Hammer, R. E., Pursel, V.G., Rexroad, G.J., Talansky, B. E., Richard, C. and Laufer, N. (1985) : Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*. 315:680-683.
2. Gordon, W. J., Scangos, G.A., Plotkin, D. J., Barbosa, J.A., Ruddle, F. H. (1980) : Genomic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 77, 7380-7384.
3. Mullins, J. J., Peters, J., Ganten, D. (1990) : Fulminant hypertension in rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature*. 5, 344:541-554.
4. Yamazaki, Y. and Sugawara, H. (2009) : National BioResource Project Information Center. *Exp. Anim.* 58 (2) :75-84.
5. 豊田裕, 横山峯介, 星冬四朗. (1971) : マウス卵子の体外受精に関する研究 I. 精巢上体精子による受精成績. *家畜繁殖誌*. 16:147-151.
6. Nakagata, N. (1989) : High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. *J. Reprod. Fertil.* 87:479-483.
7. Nakagata, N., Okamoto, M., Ueda, O. and Suzuki, H. (1997) : Positive effect of partial zona-pellucida dissection on the in vitro fertilizing capacity of cryopreserved C57BL/6J transgenic mouse spermatozoa of low motility. *Biol. Reprod.* 57:1050-1055.
8. Godon, J. W. and Talansky, B.E. (1986) : Assisted fertilization by zona drilling : a mouse model for correction of oligospermia. *J. Exp. Zool.* 239:347-354.
9. Kawase Y., Iwata T., Ueda O., Kamada M., Tachibe T., Aoki Y., Jisysage K., Suzuki H. (2002) : Effect of partial incision of the zona pellucid by piezo-micromanipulation for in vitro fertilization using frozen-thawed mouse spermatozoa on the developmental rate of embryos transferred at the 2-cell stage. *Biol. Reprod.* 66, 381-385.
10. Kimura, Y. and Yanagimachi, R. (1995) : Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol. Reprod.* 52:709-720.
11. Malter, H.E. and Cohen, J. (1989) : Partial zona dissection of the human oocyte: a nontraumatic method using micromanipulation to assist zona pellucid penetration. *Fertil. Steril.* 51:139-148.
12. Yumi, S. and Yukio, T. (1988) : Storage of culture medium (M16) for the development of mouse zygotes in vitro and in vivo. *J. Fertil. Steril.* 33 (4) :803-806.
13. 安齋政幸, 細井美彦, 松本和也, 佐伯和弘, 入谷明. (2005) : マウス胚・配偶子の凍結保存技術. *日本胚移植学誌*. 27, 123-131.
14. Ogura, A., Suzuki, O., Tanemura, K., Mochida, K., Kobayashi, Y. and Matsuda, J. (1998) : Development of normal mice from metaphase I oocytes fertilized with primary spermatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95:5611-5615.
15. Ogra, A., Matsuda, J., Asao, T., Suzuki, O. and Yanagimachi, R. (1996) : Mouse oocytes injected with cryopreserved round spermatids can develop into normal offspring. *J. Assist. Reprod. Genet.* 13 (5) :431-434.
16. Hiromi, M., Narumi O, Kimiko, I, Tadashi, B and Atsuo, O. (2006) : Improvement of cumulus-free oocyte maturation in vitro and its application to microinsemination with primary spermatocyte in Mice. *J. Reprod. Dev.* 52:239-248.

17. Cross, P. C., and Brinster, R. L. (1970) : In Vitro development of Mouse Oocytes. *Biol. Reprod.* 3, 298-307.
18. 佐東春香, 西村愛美, 森田真裕, 古田祐奈, 柳美穂, 安齋政幸. (2009) : 近交系 C57BL/6 マウスの未成熟卵子を用いた体外成熟および発生能の検討. *実験動物技術*. 44, 2, 43-48.
19. 宮地志織, 安齋政幸, 古田祐奈, 柳美穂, 中島竜之, 川辺敏晃, 金子武人, 中瀧直己. (2008) : 各種系統由来ガラス化保存透明帯穿孔卵子を用いた体外受精の検討. *実験動物技術*. 43-1:25-29.
20. Lawitts, L. A. and Biggers, J. D. (1992) : Joint Effects of Sodium Chloride, Glutamine, and Glicose in Mouse Preimplantation Embryo Culture Media. *Mol. Reprod. Dev.* 31:189-194.
21. Horgan, B., Costantini, F., Lacy, E. (1986) : Manipulating the Mouse Embryo. pp.135-141.
22. Downs, S. M., Hunzicker-Dunn, M. (1995). : Differential Regulation of oocyte Maturation and Cumulus Expansion in the Mouse Oocyte-Cumulus cell complex by Site-Selective Analogs of Cyclic Adenosine Monophosphate. *Dev. Biol.* 172:72-85.
23. Hasegawa A, Mochida N, Ogasawara T and Koyama K. (2006) : Pup birth from mouse oocytes in preantral follicles derived from vitrified and warmed ovaries followed by in vitro growth, in vitro maturation, and in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 86, 1182-1192.
24. 湊芳明, 豊田裕. (1982) : 体外成熟マウス卵子の受精能力について. *家畜繁殖誌*. 28 (3) :134-140.
25. Eppig, J. J. (1996) : Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod Fertil.* 8 (4) :485-9.
26. Kaneko K., Yanagi M., Nakashima T., and Nakagata N. (2006) : The improvement in fertilizing ability of cryopreserved mouse spermatozoa using laser-microdissected oocytes. *Reprod. Med. Biol.* 5, 249-253.
27. Anzai M, Nishiwaki M, Yanagi M, Nakahima T, Kaneko T, Taguchi Y, Tokoro M, Shin S.W, Mitani T, Kato H, Matsumoto K, Nakagata N, and Iritani A. (2006) : Application of laser-assisted zona drilling to in vitro fertilization of cryopreserved mouse oocytes with spermatozoa from a subfertile transgenic mouse. *J. Reprod. Dev.* 52, 601-606.
28. 福田芳詔, 岡田修, 豊田裕. (1972) : マウス卵子の体外受精に関する研究Ⅲ, 裸化卵子の受精成績について. *家畜繁殖誌*. 18 (2) :73-77.
29. Toyoda, Y., Sato, E., Naito, K. (1993) : Role of cumulus oophorus in mammalian fertilization. In: *Biology of the Germ Line in Animals and Man* (Mori, H., Takahashi, M., Tachi, C., eds.). pp. 111-124.
30. Obruca A, Strohmer H, Sakkas D, Menezes Y, Kogosowski A, Barak Y and Feichtinger W. (1994) : Fertilization and early embryology: Use of lasers in assisted fertilization and hatching. *Hum. Reprod.* 9:1723-1726.
31. Larue, L., Ohsugi, M., Hirchenhain, J., and Kemler, R. (1994) : E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 8263-8267.

英文要旨

Investigation of zona drilled by laser and in vitro fertilization of oocytes that matured in vitro with C57BL/6 strain

Manami Nishimura¹, Nami Omoto¹, Yui Nishiyama², Miho Yanagi³,
Tasuku Mitani⁴, Yoshihiko Hosoi¹, Akira Iritani⁴, Masayuki Anzai⁴

Summary

The study purpose to pups used in vitro maturation (IVM) oocyte obtains from C57BL/6J inbred strain mouse examined in vitro fertilization and development ability used IVM oocytes that zona drilled under conditions of each irradiation time of laser (200, 150, 120 μ sec. and 0.25M sucrose 120 μ sec.). In vitro maturation rate of immature oocytes retrieved from C57BL/6J ovary was 91% (1,517/1,674). In vitro fertilized rate of each zona drilled oocytes were 60% (191/316), 54% (103/192), 45% (196/439). In comparison to control [28% (129/463)] recognized significant difference ($P < 0.05$). Developed to blastocysts stage were each 31% (32/102), 51% (74/144), 53% (40/75). The result of 2-cell embryos transferred to preudergrnant ICR mice, in the case of sherning irradiation time of laser, is verifrcated to rise developed to live pups [4% (5/96), 13% (10/83), 21% (12/56)] . Moreover irradiation of laser to prevent thermal denatureation by irradiation of laser, the fertilization rate of zona drilled oocyte were contracted ooplasm by 0.25M sucrose recognized significant difference, too ($P < 0.05$). It was suggested to improve development to pups the result of changing the condition of zona drilling by laser.

1. Department of Genetic Engineering, Kinki University, Wakayama 649-6493, Japan

2. Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University, Wakayama 649-6493, Japan

3. ARK Resource Co., Ltd. Kumamoto 861-5274, Japan

4. Institute of Advanced Technology, Kinki University, Wakayama 642-0017, Japan