



Collected Works of Academician Bou Shorgan, Ph.D.
Thesis Compilation of Research Center for Laboratory
Animal Science, Inner Mongolia University(1984—2004)

旭日干院士研究文集

内蒙古大学实验动物研究中心学术论文汇编

(1984—2004)

内蒙古大学出版社

呼和浩特·2004



Q 95-3
18

Collected Works of Academician Bou Shorgan, Ph.D.
Thesis Compilation of Research Center for Laboratory
Animal Science, Inner Mongolia University(1984—2004)

旭日干院士研究文集

内蒙古大学实验动物研究中心学术论文汇编

(1984—2004)

江苏工业学院图书馆
藏书章

内蒙古大学出版社

呼和浩特·2004

图书在版编目(CIP)数据

旭日干院士研究文集: 内蒙古大学实验动物研究中心学术论文汇编/

旭日干等编. —呼和浩特: 内蒙古大学出版社, 2004. 9

ISBN 7-81074-715-0

I. 旭... II. 旭... III. ①动物学—文集—英、汉②实验动物学—文集—英、汉③胚胎学—文集—英、汉

IV. ①Q95-53②Q132-53

中国版本图书馆CIP数据核字(2004)第094118号

书 名	旭日干院士研究文集 内蒙古大学实验动物研究中心学术论文汇编
编 者	旭日干 等
责任编辑	和 平
封面设计	张燕红
出 版	内蒙古大学出版社 呼和浩特市大学西路235号 (010021)
发 行	内蒙古新华书店
排 版	内蒙古百分笔艺术设计有限公司
印 刷	内蒙古地矿印刷厂
开 本	880×1230/16
印 张	34.625
插 页	6
字 数	984千
版 次	2004年9月第1版
印 次	2004年9月第1次印刷
标准书号	ISBN 7-81074-715-0/Q·15
定 价	90.00元

本书如有印装质量问题, 请直接与出版社联系

自序

今年是世界首例试管山羊出生二十周年，也是我国首胎试管绵羊和试管牛出生的十五周年。这二十年，特别是后十五年，家畜体外受精作为一项生物高技术发展异常迅速，在一些国家已成为一项成熟的应用技术进入了产业化应用阶段。不仅如此，由于这一技术在生物学领域的广泛应用，使得一些相关学科也有了长足的发展。尤其是性别鉴定与控制技术、克隆动物和转基因动物等前沿领域的研究均在体外受精研究成果的基础上一个接一个取得了重大突破。

非常荣幸的是我和我的研究团队二十年来在国家“863”计划和国家自然科学基金项目的支持下，还有地方政府和国内外同行的关心和帮助下，紧紧抓住家畜体外受精这一主攻方向进行了深入系统的基础研究、应用研究和中试开发研究，取得了多项成果，为该领域研究的发展做出了不懈的努力。

这份文集共搜集了一百多篇论文，虽然水平并不很高，但它记录了我们这个团队多年的奋斗历程和所取得的成果，并且也能够从一个侧面反映出这些年来生物技术在我国发展的足迹，所以才下决心把它们整理一下，作为生命科学研究文集出版，以供我们的同行特别是年轻的同行们参考，也许能使他们在某些方面少走一些弯路。这些论文大部分是探索性研究成果，有不少地方需要进一步深入研究，有些结果和结论很可能不成熟甚至不正确，出版后非常希望得到各方面的批评指正。

此文集的形成，首先归功于我们研究团队的所有成员，包括目前在我身边一同共事的和那些活跃在国内外学术界的成员，他们均为此文集的编辑做出了不懈的努力和各自的贡献。我谨向他们表示我衷心的感谢和良好的祝愿。

本书的出版得到了我们内蒙古大学方方面面，特别是科技处和出版社的大力支持。在此，我们也向他们表示诚挚的谢意。

旭日千

2004年8月24日

目 录

Fertilization of Goat and Ovine Ova in vitro by Ejaculated Spermatozoa after Treatment with Ionophore A 23187	Bou SHORGAN (1)
イオノホアA23187で処理したヤギ射出精子の体外における透明帯除去ハムスター 卵子への侵入	包旭日干 花田章 (4)
哺乳类动物的体外受精	旭日干 (11)
屠宰绵羊卵巢卵母细胞的体外培养	旭日干 薛晓先 廖洪武 (16)
屠宰母牛卵巢卵母细胞体外受精与发育的研究	旭日干 张锁链 薛晓先 海青兰 廖洪武 (20)
绵羊卵母细胞的体外培养、受精与发育的观察	旭日干 张锁链 薛晓先 廖洪武 李喜和 刘东军 斯琴 (25)
屠宰母牛卵巢卵母细胞的体外受精与发育的研究	旭日干 张锁链 薛晓先 廖洪武 庞也非 斯琴 (26)
大鼠早期胚的快速冷冻保存	旭日干 薛晓先 廖洪武 (27)
屠宰母牛卵巢卵母细胞的体外受精与早期发生	旭日干 张锁链 薛晓先 廖洪武 庞也非 斯琴 (32)
绵羊体外成熟、体外受精卵的体外发育及移植后的产羔	旭日干 张锁链 薛晓先 廖洪武 海青兰 李喜和 刘东军 斯琴 (40)
小鼠嵌合体制作技术的研究	张锁链 旭日干 斯琴 (46)
“试管家畜”生产技术及其应用前景	旭日干 廖洪武 (49)
牛体外受精卵的移植及妊娠产犊	旭日干 张锁链 薛晓先 廖洪武 庞也非 斯琴 (52)
试管绵羊技术的研究及其意义	旭日干 (54)
In Vitro Development of Ovine Oocytes Matured and Fertilized In Vitro and Lambing after Embryo Transfer	Bou SHORGAN
Zhang SUOLIAN, Xue XIAOXIAN, Pang YIEFEI, Chan HONGWU, Li XIHE, Hai QINGLAN, and Si QIN	(57)

昆明小鼠卵子的体外受精及发育的研究	庞也非 旭日干 (63)
Wistar-Imamichi大鼠的引种、保种与扩大繁殖的研究 I	旭日干 张锁链 薛晓先 (69)
Wistar-Imamichi大鼠的引种、保种与扩大繁殖的研究 II	旭日干 张锁链 薛晓先 (72)
Transplantation of Bovine Embryos Fertilized <i>in vitro</i> and Subsequent Calving	
BAU SHORGAN, ZHANG SUO-LIAN, XUE XIAO-XIAN, CHAN HONG-WU, PANG YE-FEI, AND BAU SIQIN (75)	
日本大耳白兔跛行的诊断与防治	王建国 张锁链 旭日干 (77)
Wistar-Imamichi大鼠气喘病的研究	王建国 张锁链 付宝阳 赵立君 (78)
Development and freezing of bovine embryos derived from IVF	
B Shorgan, YF Pang, SL Zhang, HW Chan, XX Xue, DJ Liu, QL Hai, B Siqin, JG Wang (79)	
小鼠分离胚的培养和移植	张锁链 斯琴 樊秀娥 朱悦来 旭日干 (86)
大小鼠异种间嵌合胚的培养和移植	张锁链 斯琴 窦玉洁 旭日干 (90)
清洁级Wistar-Imamichi大鼠的保种与繁育管理	张锁链 王建国 旭日干 (94)
牛体外受精卵发育培养条件的研究	
..... 庞也非 薛晓先 斯琴 海青兰 刘东军 廖洪武 张锁链 旭日干 (97)	
牛体外受精卵的冷冻保存研究	廖洪武 庞也非 薛晓先 刘东军 旭日干 (100)
昆明小鼠体外受精卵体外发育的研究	刘东军 旭日干 (104)
生物高新技术在畜牧业生产中的应用	旭日干 (109)
家养双峰驼卵巢卵母细胞的体外受精与早期发生的初步研究	
..... 旭日干 庞也非 张锁链 薛晓先 (113)	
白绒山羊胚胎移植技术的应用研究	
..... 张锁链 刘东军 王建国 廖洪武 海青兰 斯琴 旭日干 (116)	
切割采卵法及牛卵巢深层卵泡卵母细胞的体外受精	
..... 薛晓先 刘东军 李荣凤 廖洪武 旭日干 (121)	
绵羊体外受精卵冷冻解冻后的移植	
..... 张锁链 旭日干 庞也非 薛晓先 刘东军 廖洪武 海青兰 斯琴 王建国 (125)	
牛体外受精卵发育培养的研究	廖洪武 庞也非 薛晓先 黄刚 旭日干 (129)
牛体外受精卵的冷冻保存及解冻后的胚胎移植 廖洪武 庞也非 张锁链 刘东军 旭日干 (133)	
绵羊体外受精卵的体外发育及冷冻保存研究	
..... 刘东军 张锁链 庞也非 薛晓先 廖洪武 海青兰 斯琴 旭日干 (136)	
羔山羊的超数排卵及体外受精	张锁链 刘东军 廖洪武 王建国 海青兰 旭日干 (139)
生长因子对牛体外受精卵体外发育的影响 ... 刘东军 张锁链 李荣凤 何牧仁 旭日干 (143)	

非极性表面活性剂对小鼠早期胚胎冷冻保护作用的初步研究.....	薛晓先 劳文艳 韩文彬 包艳原 旭日干 (147)
中国内蒙古自治区の畜产业 (1)	李喜和 張鎖鏈 候燕軍 周玉生 簡仁 包旭日干 (153)
中国内蒙古自治区の畜产业 (2)	李喜和 張鎖鏈 候燕軍 周玉生 簡仁 包旭日干 (160)
中国内蒙古自治区の畜产业 (3)	李喜和 張鎖鏈 候燕軍 周玉生 簡仁 包旭日干 (168)
中国内蒙古自治区の畜产业 (4)	李喜和 張鎖鏈 候燕軍 周玉生 簡仁 包旭日干 (173)
平衡方法及平衡和解冻温度对牛体外受精胚胎玻璃化冷冻保存效果的研究.....	廖洪武 李荣凤 旭日干 (177)
牛体外受精胚胎与输卵管上皮细胞和卵丘细胞的共同培养	刘东军 张锁链 何牧仁 斯琴 旭日干 (182)
山羊胚胎的体外发育及冷冻保存研究	张锁链 刘东军 王建国 阎文龙 张润梧 旭日干 (186)
灭活与未灭活发情母牛血清对牛体外受精卵发育的影响	李荣凤 薛晓先 旭日干 (190)
提高牛体外受精核移植胚胎发育率的研究	廖洪武 李荣凤 旭日干 (194)
昆明小鼠卵子的体外受精及其新培养系统的建立	庞也非 李 冬 旭日干 (199)
Freezing viabilities of bovine blastocysts derived from different culture conditions	R. F. Li, M. Hosoe, M. Shimizu, Shorgan Bou, Y. Shioya (203)
实验小鼠寄生虫感染监测	王建国 杨晓野 刘珍莲 郭媛华 旭日干 图布丹扎布 (205)
羔山羊卵巢卵母细胞超微结构及核质成熟分析	牧人 张锁链 旭日干 (209)
羔山羊卵泡的发育及卵母细胞体外成熟的研究	张锁链 刘东军 王建国 牧人 廖洪武 闫文龙 张润梧 王文清 王明海 旭日干 (215)
牛 α -s1酪蛋白基因3'端DNA的PCR扩增、克隆及鉴定	森布尔 黄刚 旭日干 (221)
绒山羊胚胎的体外培养、冷冻保存和移植的研究	张锁链 廖洪武 徐振军 闫文龙 牧人 王建国 刘东军 劳文燕 于海泉 仓明 旭日干 (227)
静电场对小鼠胚胎发育能力的影响	何牧仁 张锁链 高飞 旭日干 (233)
中国内蒙古若齡カシミヤ山羊の体外受精に関する研究	包旭日干 張鎖鏈 劉東軍 王建国 何牧仁 廖洪武 閻文龍 李喜和 (239)

羔山羊卵巢卵母细胞体外成熟培养条件的研究	张锁链 王建国 何牧仁 刘东军 旭日干 (245)
不同超数排卵方法所获羔山羊卵母细胞体外成熟率及体外受精率的比较	刘东军 张锁链 王建国 何牧仁 闫文龙 张润武 旭日干 (249)
中国内蒙古カシミヤ山羊の過剰排卵と胚移植に関する研究	張鎖鏈 王建国 劉東軍 廔洪武 何牧仁 閻文龍 包斯琴 森布尔 徐振軍 李榮鳳 郭旭東 勞分艷 龐也非 李喜和 旭日干 (254)
克服昆明小鼠体外受精卵发育阻滞方法的研究	龐也非 李东 旭日干 (258)
羊卵子における体外受精法の検討	細江実佐 薛曉先 于海泉 勞文燕 包旭日干 塩谷康生 (262)
人胰岛素原乳腺表达载体的构建	森布尔 郭旭东 旭日干 (266)
卵母细胞的不同对牛体外受精效果的影响	廔洪武 李荣凤 刘哲 旭日干 (273)
山羊手术法胚胎移植对供受体母羊重复使用的影响	王建国 张锁链 何牧人 閻文龍 旭日干 (278)
The Effects of Different Culture Systems on the Quality of Bovine In Vitro Fertilized Embryos	Liu Dongjun Chan Hongwu Mal Brandon Bou Shorgan (283)
不同体外培养条件对牛体外受精胚胎质量影响的研究	刘东军 廔洪武 Mal Brandon 旭日干 (288)
蔗糖、牛血清白蛋白和锌离子对白绒山羊精液冷冻效果的影响	牧人 张锁链 王建国 閻文龍 徐振軍 旭日干 (289)
Development of the competence of bovine oocytes to release cortical granules and block polyspermy after meiotic maturation	Weihua Wang, Misa Hosoe, Rongfeng Li, Yasuo Shioya (294)
通过体外受精技术缩短绒山羊育种周期的研究	张锁链 刘东军 王建国 廔洪武 何牧人 闫文龙 旭日干 (307)
大鼠原始生殖细胞的分离培养	张锁链 布赫 邵华 徐营 旭日干 (311)
中国内蒙古における家畜の体外受精,胚移植技術の開発と応用	旭日干 (316)
Positive effect of high voltage electrostatic field on the development of in vitro fertilized mouse embryos	Muren Herrid Gao Fei B. Shorgan (325)
不同体外培养系统对牛体外受精胚胎冷冻解冻后孵化能力的影响	刘东军 于海泉 Mal Brandon 旭日干 (330)
核移植克隆哺乳动物的研究进展	邵华 鲍国强 王凤武 (335)
体外培养绵羊卵母细胞核质成熟的研究	刘喆 李荣凤 旭日干 (339)

体外培养绵羊卵母细胞超微结构的变化	刘喆 李荣凤 旭日干 (345)
不同种公牛精液对牛卵母细胞体外受精效果影响的研究	刘东军 廖洪武 Mal Brandon 旭日干 (351)
精子载体法转基因动物研究进展	邵华 郭旭东 旭日干 (356)
牛体外受精胚胎移植的应用研究	张锁链 仓明 旭日干 (361)
牛卵母细胞皮层颗粒荧光染色法质成熟鉴定	李荣凤 薛晓先 刘哲 旭日干 (366)
动物克隆技术研究的新热点——转基因克隆动物	杨东山 王世冬 (374)
性别控制与在畜牧业中的应用	温利华 王凤武 (379)
自动分析仪测定蛋白质含量消化过程中的误差因素	孟和宝力高 关胜利 (382)
DNA芯片——21世纪的新技术	温利华 赵晓春 (384)
以精子载体法制备转基因小鼠的初步研究	郭旭东 森布尔 布赫 杨东山 旭日干 (386)
牛体外受精胚胎在成份确定培养液内的发育	刘东军 杨东山 旭日干 (391)
高压电脉冲处理对小鼠精子超微结构及体外受精的影响	徐营 郭旭东 李霞 其木格 旭日干 (395)
利用不同冷冻方法建立大鼠胚胎保种库的研究	梁成光 崔建英 薛晓先 旭日干 (402)
Neurobasal™-A和DMEM/F12培养液对大鼠胎儿神经干细胞生长的影响	李雪玲 John R. Morrison 扎拉嘎胡 扈廷茂 (407)
K ⁺ 和Ca ²⁺ 对牛体外受精胚胎体外发育的作用	刘东军 旭日干 (411)
哺乳类动物精子的获能和顶体反应	阎文龙 李扬 (415)
“两步法”体外培养山羊卵母细胞的初步研究	邵 华 孟和宝力高 张锁链 旭日干 (418)
牛体外受精胚胎成份明确培养系统的建立	李荣凤 于彦珠 温利华 旭日干 (425)
绵羊小腔卵泡卵母细胞的分离及相关实验	孟和宝力高 邵华 扎拉嘎胡 张锁链 旭日干 (429)
胚胎的培养液平均拥有量和单独或群体培养对牛体外受精胚胎发育的影响	李荣凤 薛晓先 旭日干 (432)
牛胎儿成纤维细胞的冷冻保存	李扬 郭继彤 旭日干 (436)
体外受精牛桑椹胚及囊胚超微结构观察	杨东山 刘东军 旭日干 (439)
大鼠胎儿神经干细胞的克隆实验研究	扎拉嘎胡 李雪玲 于海泉 张锁链 (443)
牛体外受精冷冻胚胎的质量鉴定和移植结果分析	仓明 张锁链 旭日干 (446)
葡萄糖和NFS对昆明小鼠体外受精胚发育的影响	梁成光 李红义 周平 薛晓先 (450)
不同培养基对牛体外受精胚发育率及抗冻性的影响	李荣凤 旭日干 (454)

牛胎儿成纤维细胞的分离与体外培养	李扬 郭继彤 吴凯峰 旭日干 (458)
牛体外受精胚抗冻性原因初探	李荣凤 细江实佐 盐谷康生 旭日干 (463)
牛冷冻试管胚胎性别鉴定的应用	张锁链 布赫 仓明 旭日干 (469)
MAPK和p90 ^{rk} 在大鼠卵泡发育中的表达与活性	于海泉 孙青原 陈大元 旭日干 (472)
绵羊卵泡液和次黄嘌呤对卵母细胞体外减数分裂的影响	布赫 王建国 旭日干 (476)
Phosphorylation of MAP kinase and p90 ^{rk} and its regulation during <i>in vitro</i> maturation of cumulus-enclosed rabbit oocytes	Hai-Quan Yu, Shorgan Bou Da-Yuen Chen and Qing-Yuan Sun (480)
脂质体介导外源基因体外转染牛胎儿成纤维细胞条件的优化	李扬 吴凯峰 郭旭东 郭继彤 旭日干 (487)
脂类对大鼠胎儿神经干细胞生长和增殖的影响	李雪玲 扈廷茂 扎拉嘎胡 于海泉 John R. Morrison (491)
神经干细胞研究现状与展望	扎拉嘎胡 于海泉 (496)
雌牛生殖道内游离氨基酸种类及含量分析	李荣凤 温利华 王树英 旭日干 (499)
体外生产的牛胚胎超微结构研究	杨东山 刘东军 其木格 旭日干 (506)
牛胚胎移植信息管理系统(ETMIS)的建立	王建国 莫日根巴特尔 旭日干 (512)
碳水化合物对牛体外受精胚胎体外发育的影响	刘东军 旭日干 (516)
血清及BSA对牛体外受精胚胎发育过程超微结构影响的研究	刘东军 杨东山 其木格 旭日干 (521)
绵羊卵泡成分对卵母细胞体外减数分裂调控的研究	布赫 旭日干 (527)
利用激光共聚焦成像系统对牛体外受精胚胎的观察	刘东军 旭日干 (532)
培养条件对牛体外受精胚胎核仁及线粒体发育的影响	刘东军 杨东山 其木格 旭日干 (536)
无血清培养的牛体外受精胚胎超快速玻璃化冷冻	布赫 乌兰 廖洪武 旭日干 (541)

Fertilization of Goat and Ovine Ova in vitro by Ejaculated Spermatozoa after Treatment with Ionophore A 23187

Bou SHORGAN

(Received February 24, 1984 Z. No. 70)

Department of Animal Reproduction

Nippon Veterinary and Zootechnical College

The progress in the studies on in vitro fertilization in domestic animals has been delayed far behind those studies in rabbit, rodents and human being. Effective induction of sperm capacitation and the acrosome reaction of spermatozoa, which are essential for sperm penetration into mammalian ova, has not been methodologically developed yet with spermatozoa of domestic animals, especially with ejaculated spermatozoa. The importance of calcium in the acrosome reaction of mammalian spermatozoa and chemical induction of the reaction in vitro by treating spermatozoa with ionophore A 23187 (I-A) in the medium containing calcium are well documented. In spite of this favorable action, I-A has been limitedly used in the studies of in vitro fertilization owing to the quick loss of sperm motility after treatment with I-A.

An idea is to treat spermatozoa with I-A under the conditions which satisfy both the induction of the acrosome reaction and the maintenance of sperm motility at least up to the time of sperm penetration into the ovum in vitro. To furnish a firm basis for this idea a series of experiments were firstly conducted for the following up of the adequate conditions to treat goat and ram spermatozoa with I-A. In vitro penetration of zona-free hamster ova by spermatozoa of both species was used as the parameter to know the effects of I-A on spermatozoa. After the fixation of treating conditions which presumed to be adequate, in vitro fertilization of goat and ovine ova were studied

secondary to confirm the justification of the idea.

I. Penetration of zona-free hamster ova by goat and ram spermatozoa in vitro

Ejaculated spermatozoa from he-goats of Japanese native breed and from rams of various breeds were washed and resuspended in a modified Tyrode solution (BD medium) without BSA but containing caffeine and added with I-A. Zona-free hamster ova in the medium with BSA were then seminated by spermatozoa pretreated with I-A and incubated until morphological examination of the ova. The effects of following factors were investigated in these studies; caffeine concentration in the medium, I-A concentration, treating time with I-A, sperm concentration at the time of I-A treatment, incubation hrs after semination, spermatozoa from different male individuals. Sperm motility during incubation and the morphological changes of sperm heads after penetration into the ova were during incubation and the morphological changes of sperm heads after penetration into the ova were also investigated.

The facts demonstrated in these studies are as follows.

(1) Practically none of the ova was penetrated by spermatozoa without I-A treatment. After treatment with I-A the penetration of goat and ram spermatozoa was easily confirmed. The presence of caffeine in the medium does not act on spermatozoa principally in itself but augmented the effect of I-A on spermatozoa. Adequate concen-

tration of caffeine for goat and ram spermatozoa was found to be 2mM and 0.5 to 10mM, respectively. High proportions of ova, 73.8~93.3% by goat spermatozoa and 60.7~100% by ram spermatozoa, were constantly penetrated, when goat spermatozoa were resuspended at 25×10^6 cells/ml and pretreated with 0.5 μ M I-A for 2.0 min and when ram spermatozoa were resuspended at 10 to 70×10^6 cells/ml and pretreated with 0.2 to 0.5 μ M I-A for 0.5 to 2.5 min. These differences in the conditions for I-A treatment indicate that the allowable ranges of the factors involved in the effect of I-A are narrow for goat spermatozoa but comparatively broad for ram spermatozoa.

2) The maintenance hrs of sperm motility during incubation were shortened according to the increase of caffeine concentration, to the increase of I-A concentration and to the prolongation of treating time with I-A. Sperm motility was also different by the donors of spermatozoa and this individual difference was closely related to the difference of the proportions of penetrated ova by spermatozoa from different males. From this finding the selection of males with good sperm motility is recommended for the study of in vitro fertilization. When spermatozoa were pretreated under the conditions presumed to be adequate, goat sperm maintained good motility for at least 3 hrs and most of the ova were penetrated within 3 hrs. On the contrary, temporal depression of sperm motility was occasionally observed after semination of ram spermatozoa. It took usually 30 min to 2 hrs for the recovery from this characteristic depression of ram sperm motility. Motile spermatozoa of both species after I-A treatment exhibited whiplash-like activated movement which has been known as a characteristic feature of capacitated spermatozoa. Most of the ova were penetrated by ram spermatozoa within 2 hrs in the tests without temporal depression of sperm motility.

3) The sperm heads in the ova initiated their enlargement from the posterior region and the en-

largement spread toward the anterior portion. Male pronuclei were formed in the ova incubated for longer hrs such as 3 or 4 hrs.

These results were considered as indirect evidences of effective induction of sperm capacitation and the acrosome reaction of goat and ram spermatozoa by treatment with I-A, and practical treatment conditions with I-A for in vitro fertilization of goat and ovine ova were presented.

II. Fertilization of goat and ovine ova in vitro

i. Goat ova

Ejaculated spermatozoa were washed and resuspended in the medium containing 2mM caffeine at sperm concentration of 25 to 50×10^6 cells/ml and pretreated with 0.5 μ M I-A for 2 min. Goat ova were recovered surgically from follicles and Fallopian tubes of 23 female kids (2.5 to 7 months old) of Japanese native breed after injection of FSH, 8A.U. in total, over a 3 day period and 500 i.u. hCG on the 4th day. The ova recovered at 19.5 to 24.0 hrs after hCG injection were seminated by spermatozoa pretreated with I-A and incubated. When the ova were incubated longer than 6 hrs, the culture medium of the ova was changed to Ham's F12 or M199 containing detoxified goat serum or fetal calf serum. Transfer of fertilized ova at two-cell stage to female goats was also conducted to know the possibility of pregnancy. The facts demonstrated in this study are as follows.

1) Number of matured ova recovered from a kid was 8.5 to 13.8 in average, and this number tended to decrease according to the ageing of kids. The ovulation appeared to be initiated after about 22 hrs from hCG injection.

2) The fertilization rates of ova recovered at 19.5 to 24.0 hrs and 22.0 to 22.5 hrs after hCG injection were 27.3% and 49.4%, respectively. This difference suggests the importance of the timing of ovum recovery at around the time of ovulation. Among the ova undergoing fertilization 33.3% to 50.0% were of polyspermic.

3) The enlarged sperm heads in the ova be-

came clear 6 hrs after semination. Cleaved ova to two-cell stage emerged from 26 hrs of incubation. Surgical transfer of these cleaved ova, 12 in total, to five recipients produced a case of pregnancy which delivered a male kid after normal length of gestation.

ii. Ovine ova

Ejaculated spermatozoa from rams of Finnish Landrace breed were washed and resuspended in the medium containing 0.5mM caffeine at sperm concentration of 25×10^6 cells/ml and pretreated with 0.2 μ M I-A for 0.5 min. Ovine ova were recovered surgically from follicles and Fallopian tubes of 14 growing lambs (4.5 to 8 months old) of various breeds after injecting various combinations of hormones. The facts demonstrated in this study are as follows.

1) Owing to small numbers of lambs available for this study the effective way of hormonal treatment and the timing of ovum recovery was not conclusively determined. However, the injection of FSH, 20A.U. in total, over a 4-day period and of 500 i.u. hCG on the 5th day to the lambs appeared to provide rather many ova for the study. Progesterone injection before these hormonal

treatments was found to be useless.

2) After 7 to 10 hrs of incubation 44.1% (15/34) of matured ova and 27.3% (15/55) of immature oocytes were penetrated by spermatozoa. In the former, 14 ova were undergoing fertilization including 5 polyspermic ova. In the latter, the sperm heads remained at condensed stage in the ova at germinal vesicle stage but enlarged after the stage of metaphase of first meiosis.

3) For hastening the recovery from the temporal depression of sperm motility after semination caffeine concentration should be increased from 0.5mM to 10mM which shortened the recovery time for about one hour. To avoid the risk of ovum ageing it was suggested to treat spermatozoa at first before the recovery of ova for fertilization of ovine ova in vitro.

These results indicate that fertilization of goat and ovine ova is possible by using ejaculated spermatozoa after treatment with I-A under adequate conditions and ova from immature kids and growing lambs. Normal development to newborn was also proven to be possible after transfer of goat ova fertilized in vitro.

イオノホア A23187 で処理したヤギ射出精子の体外における 透明帯除去ハムスター卵子への侵入

包 旭日干・花田 章*

(中国内蒙古大学生物系 *農林水産省畜産試験場)

哺乳動物卵子への精子侵入に精子の先体反応が必要とされ、同反応には Ca^{2+} の存在が重要な鍵となること¹⁾、および Ca 塩を含む培地に各種動物の精子を浮遊させカルシウムイオノホア A23187 (以下、I-A) を加えて処理すると化学的に精子の先体反応が誘起されること²⁻⁸⁾は、周知の事実である。しかし、この好都合と思われる I-A の作用を実際に卵子の体外受精研究に使用した報告は少なく、家畜ではブタ卵子⁹⁾ およびヒツジの透明帯除去卵子⁷⁾ に精子侵入を認めた報告があるに過ぎない。

著者らは、ブタ精子⁹⁾ に準じて反すう家畜精子を I-A 処理し、その先体反応誘起効果を利用して家畜卵子の体外受精法を開発する目的で一連の実験を進めている。これまで、ウシ射出精子について I-A 処理効果を透明帯除去ハムスター卵子 (以下、H 卵子) への精子侵入能で調査した結果から、I-A 処理時の培地内におけるウシ血清アルブミン (以下、BSA) やカフェインの存否、I-A 濃度とその処理時間が処理効果の発現に影響することが判明している¹⁰⁾。同様に、ヤギ¹¹⁾ やブタ¹²⁾ の射出精子に対する I-A 処理はその後の体外における透明帯除去ハムスター卵子への精子侵入に有効であることが報告されている。しかし、I-A 処理精子を同種卵子の体外受精に使用するためには、I-A 処理前後の諸条件について詳細な吟味が必要であり、とくにブタで認められている多精受精⁹⁾ の防止とともに、ヒツジで認められている精子活力の短時間内喪失⁷⁾ を防ぐための適切な処理条件について各家畜精子ごとに追究する必要がある。

本研究においては、ヤギ卵子の体外受精に適する射出

精子の I-A 処理法を検索するため、体外での H 卵子への精子侵入を指標として以下の実験を行なった。実験 1 では精子の浮遊培地内カフェイン濃度が I-A 処理に及ぼす効果、実験 2 では I-A 濃度とその処理時間の影響、実験 3 では I-A 処理時の精子濃度の影響、実験 4 では異なる雄からの精子に対する I-A 処理効果の相違、実験 5 では I-A 処理後の効果発現時間と卵子に侵入した精子頭部の形態的变化をそれぞれ検討した。

材料と方法

培地および I-A: 基礎培地として BRACKETT と OLIPHANT の合成培地¹³⁾ (2.25 mm 塩化カルシウム含有等張液; 以下、BO 液) に 0~10 mm 濃度のカフェイン (Sigma 製安息香酸ナトリウムカフェイン中のカフェイン含量を 50% として計算) を加えて使用した。射出精子の洗浄から I-A 処理終了までは BSA 無添加液、H 卵子との媒精以降には 3 mg/ml の BSA 添加液をそれぞれ使用した。I-A (Ionophore A23187; Calbiochem 製) は前報¹⁰⁾ のように 10 mm 保存液を作成し、実験直前に蒸留水で希釈して使用した。

供試卵子: 過剰排卵処理した成熟雌ゴールデンハムスターからの採卵と卵子の透明帯除去処理は既報¹⁴⁾ の手順で行なった。H 卵子は事前に準備したプラスチックシャーレ (35×11 mm) 内の BO 液 350 μl (パラフィン油下) 中に 10~20 個ずつ配分して媒精まで 1~2 時間、37.5°C、5% CO_2 、95% 空気の培養器内に保温した。

供試精液と精子の洗浄および I-A 処理: 日本在来種成熟雄ヤギ (1.5~6 歳齢) 7 頭から 1~3 日間隔で人工腔法により精液を採取し、混合精液 (実験 1~3) または個体別精液 (実験 4, 5) として供試した。採取後 30 分以内に精液約 1 ml を入れた丸底試験管 (1.5×10 cm) に洗浄液 10 ml を加えてゆるく攪拌し、470×g、5 分間遠心分離した。上清除去後の精子はさらに 2 回洗浄液を加えて遠心分離した後、25×10⁶ 精子/ml、実験 3 では 10.70×10⁶ 精子/ml、の濃度に再浮遊させた。この精子

Penetration of zona-free hamster eggs *in vitro* by ejaculated goat spermatozoa after treatment with ionophore A23187.

Bou, Shorgan & Akira HANADA* (Department of Biology, Inner Mongolia University, People's Republic of China, *National Institute of Animal Industry, Tsukuba Norindanchi P.O. Box 5, Ibaraki 305)

Japan. J. Anim. Reprod., 31 (3), 1985.

Table 1. Effects of ionophore-pretreatments of ejaculated goat spermatozoa in the presence or absence of caffeine on the maintenance of sperm motility and their penetration into zona-free hamster eggs *in vitro*

Concentration Caffeine (mM)	Ionophore (μM)	Motility score: time after insemination				No. of eggs		Average No. of sperm in vitellus
		0.5 h	1.0 h	2.0 h	3.0 h	Examined	Penetrated (%)	
0	0.1	3.7	3.7	3.3	2.3	60	4 (6.7)	0.08
	0.5	3.7	3.0	2.3	1.3	60	13 (21.7)	0.28
	1.0	2.3	2.0	1.3	0.7	57	2 (3.5)	0.05
2	0.1	3.7	3.0	1.0	0.3	58	3 (5.2)	0.09
	0.5	3.7	3.0	1.0	0	60	56 (93.3)*	3.07
	1.0	2.7	1.3	0	0	63	25 (39.7)	1.51
5	0.1	3.7	2.7	0.7	0.3	61	4 (6.6)	0.07
	0.5	3.3	2.7	0.3	0	61	17 (27.9)	0.95
	1.0	2.7	1.3	0	0	60	21 (35.0)	0.47
10	0.1	2.3	1.7	1.3	0	45	10 (22.2)	0.36
	0.5	1.3	0.3	0	0	58	1 (1.7)	0.02
	1.0	0.3	0	0	0	55	1 (1.8)	0.02

Mixed sperm suspension from male-goats A, C, D, F, 25×10^6 cells/ml in BSA-free BO medium, was pretreated with ionophore A 23187 for 2 min. Eggs were inseminated with the treated spermatozoa (final sperm concentration at $32-280 \times 10^4$ cells/ml) in the medium containing the same concentration of caffeine and with 3 mg BSA/ml, and examined 6-7 h from the insemination. Three tests in each group. Motility score: 0, 1, 2, 3, and 4; none, less than 25%, 25-50%, 50-75% and more than 75% of motile spermatozoa, respectively.

* Significantly higher than the other values within the same column ($P < 0.01$; χ^2 test).

浮遊液を 1 ml ずつ丸底小試験管 (1×7.5 cm) に配分し、これらに各種濃度に希釈した I-A 液を 5 μl ずつ添加した。添加後の I-A 濃度と媒精までの処理時間は、実験 1 では 0.1~1.0 μM に 2.0 分間、実験 2 では 0.1~0.5 μM に 0.5~3.0 分間、実験 3, 4, 5, では 0.5 μM に 2.0 分間として、その間手掌中でよく攪拌しながら保温した。

媒精: 各 I-A 処理後の精子浮遊液は 50 μl ずつ分取し、直ちに H 卵子を配分してある受精用培地に移して媒精した。媒精後の最終精子濃度は $32 \sim 1,440 \times 10^4$ 精子/ml の範囲であった。

媒精後の卵子と精子運動性の検査: 媒精後 6~7 時間 (実験 5 では 0.5~5 時間) 炭酸ガス培養器内でインキュベートした H 卵子は、BO 液で洗浄後にホールマウント標本とし、中性ホルマリン液で 1 夜固定後ラクモイド染色を行なった。卵子への精子侵入は位相差顕微鏡下での膨化精子頭部あるいは雄性前核とそれらに符合する精子尾部の検出により判定した。なお、実験 5 では精子頭部の膨化ステージをその膨化程度により 3 期に区分した。すなわち、頭部後方からの膨化が 1/3 未満のものを初期、1/3~2/3 のものを中期、2/3~3/3 のものを後期とし

た。インキュベーション中の精子の運動性は、一定時間ごとに培養皿のまま実体顕微鏡下で観察した。その評価点数としては、運動精子が全体の 3/4 以上のものを 4, 3/4~2/4 のものを 3, 2/4~1/4 のものを 2, 1/4 未満のものを 1, 全く運動性を失ったものを 0 で表した。

結 果

1. カフェイン濃度と I-A 濃度の影響 (実験 1)

カフェインを無添加または 2~10 mM 添加した培地内の各精子浮遊液に、I-A を 0.1, 0.5 または 1.0 μM となるように加えてそれぞれ 2 分間ずつ前処理した精子による H 卵子への侵入成績を表 1 に示した。計 12 組の I-A 処理区の中で、2 mM カフェイン、0.5 μM I-A の処理区における精子侵入卵率 (93.3%) が他の処理区におけるよりも高く ($P < 0.01$), 検査卵子あたりの侵入精子数の平均も他区よりも多いことを認めた。また、カフェイン無添加培地に比べて、2 mM カフェイン添加培地では精子に対する 0.5 μM I-A の処理効果が顕著に増進されるが、5 mM 以上のカフェイン添加培地ではこのような I-A 処理効果の著しい増進は認められなかった。

I-A 処理後の精子の運動性の観察結果 (表 1) から、

Table 2. Effects of pretreating time of goat spermatozoa at various concentrations of ionophore A23187 in the presence of caffeine (2 mM) on their penetration into zona-free hamster eggs *in vitro*

Ionophore		No. of eggs		Average No. of sperm in vitellus
Conc. (μ M)	Time (min)	Examined	Penetrated (%)	
0.1	0.5	42	0 (0)	0
	1.0	40	0 (0)	0
	1.5	47	0 (0)	0
	2.0	82	6 (7.3)	0.10
	2.5	41	6 (14.6)	0.17
	3.0	41	8 (19.5)	0.22
0.2	0.5	41	0 (0)	0
	1.0	37	0 (0)	0
	1.5	49	7 (14.3)	0.16
	2.0	94	15 (16.0)	0.22
	2.5	35	17 (48.6)	0.63
	3.0	37	11 (29.7)	0.35
0.3	0.5	45	4 (8.9)	0.13
	1.0	42	15 (35.7)	0.62
	1.5	47	5 (10.6)	0.15
	2.0	75	22 (29.3)	0.45
	2.5	40	11 (27.5)	0.45
	3.0	42	10 (23.8)	0.50
0.4	0.5	48	8 (16.7)	0.19
	1.0	39	13 (33.9)	0.56
	1.5	46	11 (23.9)	0.33
	2.0	87	23 (26.4)	0.30
	2.5	44	23 (52.3)	0.73
	3.0	37	14 (37.8)	0.65
0.5	0.5	40	10 (25.0)	0.30
	1.0	48	14 (29.2)	0.48
	1.5	44	23 (52.3)	0.75
	2.0	84	62 (73.8)*	1.18
	2.5	39	16 (41.0)	0.51
	3.0	38	12 (31.6)	0.42

Eggs were inseminated with the mixed spermatozoa from male goats A, C, D, F (pretreated at 25×10^6 cells/ml; final sperm concentration at $182-580 \times 10^4$ cells/ml) in the same manner as indicated in Table 1, and examined after 6-7 h from the insemination. Total of three tests except for the experiments with spermatozoa pretreated for 2 min where the figures are total of 6 tests, respectively.

* Significantly higher than the other values within the same column ($P < 0.05$; χ^2 test).

一般に、培地内カフェイン濃度の上昇とI-A処理濃度の上昇につれて精子の運動性維持時間の短縮化傾向が認められた。H卵子への精子侵入成績が良好であった2 mMカフェイン、0.5 μ M I-A処理区では、処理後1時間まで精子の運動性は良好であったが、2時間では急速に不良となり、3時間では全く運動精子を認めなかった。なお、I-A処理精子は処理時約30分の観察で鞭打つような活性化運動を示すようになり、そのような運動

精子は2 mM以上のカフェイン添加培地で0.5 μ M以上のI-Aにより処理した場合に多数出現することを認めた。

2. I-A濃度とその処理時間の影響 (実験2)

2 mMカフェイン添加培地内の精子浮遊液に、0.1~0.5 μ MとなるようにI-Aを加えて、それぞれ0.5~3.0分間前処理した精子のH卵子への侵入成績を表2に示した。計30組の処理区のうち、精子侵入卵率の最高値は

Table 3. Effects of sperm concentration at the time of ionophore treatment on the penetration of zona-free hamster eggs by goat spermatozoa *in vitro*

Sperm Conc. ($\times 10^4$ cells/ml)	At the time of ionophore treatment	In the medium with the eggs	No. of eggs		Average No. of sperm in vitellus
			Examined	Penetrated (%)	
1,000		112- 168	29	10 (34.5)	0.62
2,500		456- 506	29	24 (82.8)**	1.17
5,000		824- 936	30	14 (46.7)	0.70
7,000		1,380-1,440	28	5 (17.9)	0.29

Eggs were inseminated with the mixed spermatozoa from male goat A and C (pretreated with $0.5 \mu\text{M}$ ionophore A23187 for 2 min in the presence of 2 mM caffeine) by the same manners indicated in Table 1, and examined after 6-7 h from the insemination. Three tests in each group.

* Significantly higher than the other values within the same column ($P < 0.01$; χ^2 test).

Table 4. Individual variation among male goats in the maintenance of sperm motility and their penetrating ability into zona-free hamster eggs *in vitro* after treatment of spermatozoa with ionophore A23187

Sperm from he-goat	Age (months)	Motility score: time after insem.				No. of eggs		Average No. of sperm in the vitellus
		0.5 h	1.0 h	2.0 h	3.0 h	Examined	Penetrated (%)	
A	17	4.0	4.0	3.0	3.0	36	34 (94.4)a	2.53
B	58	3.3	3.3	3.0	2.0	52	36 (69.2)b	1.86
C	33	3.0	2.8	2.5	1.8	54	37 (68.5)b	1.33
D	31	2.0	1.8	0.8	0	53	21 (39.6)c	0.60
E	58	1.5	1.5	0.8	0.8	52	19 (36.5)c	0.56
F	67	1.8	1.5	0.8	0	58	21 (36.2)c	0.43
G	58	1.8	0.8	0.3	0	47	13 (27.7)c	0.30

Sperm suspension, 25×10^6 cells/ml in the medium containing 2 mM caffeine, were treated with $0.5 \mu\text{M}$ ionophore for 2 min. Eggs were inseminated with the treated spermatozoa by the same manner as indicated in Table 1, and examined 6-7 h after the insemination. Motility score, as indicated in Table 2, was the average of three tests in each group. The difference between the percentages with different superscripts is significant ($P < 0.01$; χ^2 test).

実験 1 と同じ $0.5 \mu\text{M}$ I-A, 2.0 分間処理区で得られた (73.8%)。 $0.5 \mu\text{M}$ の I-A 濃度で 1.5 分間以下または 2.5 分間以上の処理時間では有意に精子侵入卵率が低下した。 I-A 濃度 $0.4 \mu\text{M}$ 以下の場合も処理時間により侵入卵率の変動が認められたが、いずれも 52.3% 以下の低率の精子侵入卵しか得られなかった。媒精後の精子運動性の維持時間は全処理区とも同様で、3 時間後も運動精子が観察された点で実験 1 の場合よりも良好であった。

3. I-A 処理時の精子濃度の影響 (実験 3)

2 mM カフェイン添加培地に浮遊させる精子の濃度を $10 \sim 70 \times 10^6$ 精子/ml の範囲で 4 段階に調整し、それぞれ $0.5 \mu\text{M}$ I-A を加えて 2 分間前処理した精子による H 卵子への侵入成績を表 3 に示した。精子侵入卵率は I-A

処理時の精子濃度により異なり、 25×10^6 精子/ml 区の 82.8% が他の 3 区よりも有意に高く ($P < 0.01$)、また 50×10^6 精子/ml 区と比べて 70×10^6 精子/ml 区の精子侵入卵率は有意に低下した ($P < 0.05$)。しかし、媒精後の精子運動性の経時的変化は 4 区とも実験 2 と同様で、精子濃度の影響は認められなかった。

4. 精子侵入成績に及ぼす雄個体差の影響 (実験 4)

7 頭の雄から個体別に採取した精子を 2 mM カフェイン添加培地内にそれぞれ 25×10^6 精子/ml の濃度に浮遊させ、 $0.5 \mu\text{M}$ I-A で 2 分間ずつ前処理した場合のその後の H 卵子への精子侵入成績と媒精後の精子運動性の観察結果は表 4 に示した。精子侵入卵率はヤギ A の精子の場合が 94.4% で最高の値を示し、次にヤギ B, C の