

ウサギ発育途上卵母細胞の体外発育培養後の 発生能力に関する検討

宮本有希¹、是兼真子²、杉本浩伸³、竹原俊幸¹、
伊藤俊介¹、岸上哲士⁴、松本和也⁴、佐伯和弘⁴、
入谷明⁴、細井美彦⁴

要 旨

哺乳動物の卵巣内には排卵に至らない卵胞が数多く存在する。これらを体外で培養し、発生能力を有する卵子が得られれば、ヒト不妊治療等へ応用できると考えられる。体外発育培養 (In vitro growth ; IVG) は、卵形成、卵胞形成、卵巣の研究、稀少動物の保護、ヒト不妊治療等を目的として研究されてきた。受精能力を有する卵子を得るためには小さく未熟な卵母細胞を発育させ、その後成熟させる必要がある。しかし、発育中の卵母細胞は種特異的なあるサイズに達するまで成熟できず、また種によってその発育期間が異なるためにマウス以外の動物種での研究は不十分であるのが現状である。IVG において、卵子と周囲の細胞との相互作用を維持するために、卵子-顆粒膜細胞複合体 (Oocyte-Granulosa cell Complexes ; OGCs) の立体構造の維持が重要となる。2004 年、Hirao らによってウシの体外発育培養培地に Polyvinylpyrrolidone (PVP) を添加することで立体構造が維持され、その後の発生率も向上することが報告された。

そこで本実験では、ウサギ未成熟卵胞の IVG における培養条件の検討をおこない、ウサギ発育途上卵母細胞の IVG 後の発生能力に関する検討をおこなった。その結果、ウサギ IVG では 8 日間の培養が好ましく、培地への PVP 添加が OGCs の立体構造を維持し、2% PVP 添加が適している事が示唆された。またその後、体外成熟培養 (In vitro maturation ; IVM)、体外受精 (In vitro fertilization ; IVF) をおこなった。IVG により得られた卵子で前核形成が認められたことから、体外で発育させたウサギ卵母細胞が受精能力を有していることが示された。

緒 論

現在、様々な動物種において体外受精の技術が確立され、従来の自然交配による産仔作出に比べ、効率よく個体を生産することが可能となった。通常、体外受精に用いられる卵子は、排卵直前または排卵後間もない第二減数分裂中期の卵子であるが、哺乳動物の卵巣内には、排卵に至らない又は発育中の未成熟な卵母細胞が数多く存在している。これらの卵形成は、それらを包み、卵巣によって制御されている卵胞形成に伴って生じる。多くの卵胞は初期の最も小さな原始卵胞と呼ばれる段階で存在し性周期に伴って一部ずつ発育するため、生涯を通じて排卵されないままのものがほとんどである。また、発育が始まっても、そのほとんどは周囲の細胞や卵母細胞の過剰なアポトーシスによって閉鎖に向かい、最終的には同時期に発育した卵胞のうちただ一つの卵胞だけが排卵へと向かうため (主席卵胞)、生涯に排卵される卵子数は限られる。

1996 年、Eppig らはマウスの原始卵胞を体外で培養し、体外成熟、体外受精をおこなうことで産仔の

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

2. 山下レディースクリニック

3. 医療法人定生会 谷口病院

4. 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

作出が可能であることを報告した¹⁾。この報告を受けて、他の動物種でも検討がおこなわれているが²⁻⁸⁾、マウスと比較すると効率が悪いことが知られている。これらの原因は、発育中の卵母細胞は種特異的なあるサイズに達するまで成熟できず、また種によってその発育期間が異なることにある⁹⁾。生体内で、マウスの卵母細胞は2-3週間で発育するが、大型家畜動物では5-10週間必要となる。また、卵母細胞は周りの細胞との相互作用によって発育する。そのため、体外で卵胞の発育培養をおこなう際、長期間、卵胞の構造を維持したまま培養する必要があり、マウス以外の種では効率よく体外培養することが困難である。

近年、基底膜を切開し、OGCsのみを培養する開放型培養系が注目されており、これによって卵胞直径の大きな家畜などの卵母細胞も、効率よく培養することが可能となった。さらに2004年、Hiraoらによってウシの体外発育培養培地にPolyvinylpyrrolidone (PVP)を添加することで立体構造が維持され、その後の発生率も向上することが報告された¹⁰⁾。

本実験で用いるウサギは、マウスなどの小動物よりも生理学的にヒトに近く、安全性試験、疾患モデル動物として利用されている。また、多排卵動物であり、過剰排卵誘起、体外受精、胚培養、移植等の研究に広く用いられてきた。しかし、ウサギにおける卵母細胞の体外発育に関する研究の報告はマウスなどに比べて少なく、ヒトの不妊治療の観点からも体外培養条件の確立が求められている。

そこで本実験では、ウサギ前胞状卵胞から得られたOGCsを効率よく培養するために、発育途上卵母細胞のIVGに適した培養日数、PVP濃度の検討をおこなった。また、得られたMII期卵子は射出精子を用いてHosoiらの報告¹¹⁾と同様の方法でIVFをおこない、胚発生能力の検討をおこなった。

材料と方法

1) 培養液の調整

- OGCsの培養には3mg/ml BSA (Bovine Serum Albumin, SIGMA, A-7638)、50 μ g/ml Ascorbic acid (SIGMA, A-8960)、Antibiotic Antimycotic Solution (SIGMA, A-5955)、Insulin-Transferrin Selenium-A (GIBCO, 51300-044)、1 A.U./ml FSH 製剤 (アントリン、デンカ製薬株式会社、903081)、0、2、4、8% Polyvinyl pyrrolidone (SIGMA, P-5288)を添加したMinimum Essential Medium Alpha Medium (GIBCO, 11900-024)を用いた。
- 卵母細胞のIVMには5% FBS (Fetal Bovine Serum, GIBCO, 26140-079)、10ng/ml EGF (Epidermal Growth Factor, SIGMA, E-9644)を添加したTCM199 (Tissue Culture Medium 199、日水製薬株式会社、680557)を用いた。
- 媒精には3mg/ml BSAを含む修正タイロッド液 (BO液)を用いた。
- 胚の培養には3mg/ml BSAを含むTCM199を用いた。

2) 卵子-顆粒膜細胞複合体の培養

性成熟したNew Zealand White rabbitに80IUの妊馬血清性腺刺激ホルモン(PMSG、三共ライフテック株式会社)を筋肉注射し、その72時間後に60IUのヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG、三共ライフテック株式会社)を静脈注射して過剰排卵処理をおこなった。hCG処理14時間後に4.5mlのネンブタール(大日本住友製薬)を静脈に注射し、屠殺した。屠殺後、卵巣を回収し、ピンセットとメスを用いてM2培養液中で200-299 μ mの卵胞を単離した。単離した卵胞の基底膜を26Gの針を用いて破り、OGCsを回収した。この時、卵母細胞の周囲に一層以上の顆粒膜細胞が結合しているもののみを選別した。回収したOGCsは5% CO₂、飽和湿度の条件下で平衡した培養液中に移動させ、培養をおこなった。

3) 卵母細胞の体外成熟培養

体外培養後、26Gの針を用いて卵子-卵丘-顆粒膜細胞複合体 (Oocyte-Cumulus-Granulosa cell Complexes ; OCGCs) から卵子-卵丘細胞複合体 (Oocyte-Cumulus cell Complexes ; OCCs) を単離した。得られた卵核胞期 (GV 期) の卵母細胞を IVM 培養液中で 12 時間培養をおこなった。培養は 5% CO₂、飽和湿度の条件下でおこない、12 時間後にアセトオルセイン染色を用いて核の状態を観察した。

4) アセトオルセイン染色

スライドガラスに卵子を移動させ、カバーガラスをかぶせた後、グルタルアルデヒドリン酸バッファーを流して卵子が流れないことを確認した。アセトアルコールで固定をおこなった後、1% アセトオルセインで染色をおこなった。アセトグリセロールでアセトオルセインを洗浄し、封入した後、位相差顕微鏡で観察をおこなった。

5) 未受精卵子の回収

同様の方法で過剰排卵処理をおこなった New Zealand White 雌ウサギを屠殺した後、4.5ml のネンブタールを静脈に注射し、屠殺した。屠殺後、子宮、卵管、卵巢を摘出し、子宮側から M2 培養液を用いて卵管内の灌流をおこない OGCs を回収した。

6) グラーフ卵胞からの GV 期卵子の回収

New Zealand White 雌ウサギに 60IU の前葉性卵胞刺激ホルモン (FSH、川崎三鷹製薬株式会社) を 6 回皮下注射し、卵胞の発育を促進させた。その後、4.5ml のネンブタールを静脈に注射し、屠殺した。屠殺後、卵巢を摘出し、>1000 μm のグラーフ卵胞から OCGCs を吸引した。得られた OCGCs は 5% CO₂、飽和湿度の条件下で 12 時間 IVM をおこなった。

7) 体外受精 (IVF)

人工臍を用いて回収した射出精子を BO 液で洗浄した後、遠心をおこなった。上清を除去し、BO 液を加え、インキュベーター内で精子皮膜抗原の除去をおこなった。その後、再び遠心をおこない、BO 液を加えた。媒精用のスポット内で精子濃度が 1.5×10^6 /ml になるように調整し、5% CO₂、飽和湿度の条件下で 10 時間培養をおこなった。10 時間後、OCCs をスポット内に移し媒精をおこなった。媒精 6 時間後に TCM199 + 3mg/ml BSA へ卵子を移動させ、前核の確認をおこなった。その後は 5% CO₂、5% O₂、90% N₂ 飽和湿度の条件下で培養をおこない 24 時間ごとに観察をおこなった。

結 果

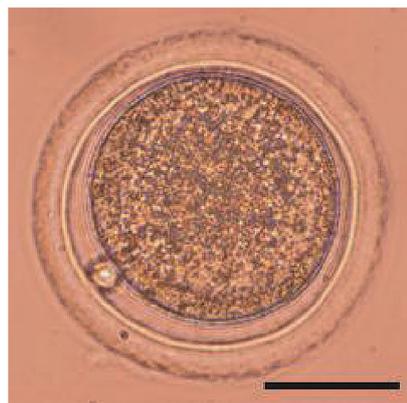
4% PVP 添加培養液中で 6 日、7 日、8 日、9 日間培養をおこなった後、IVM に供試できた卵母細胞はそれぞれ 67%、45%、41%、29% であった。また、6 日、7 日、8 日、9 日間培養後 IVM をおこなった結果、得られた MII 期卵子の割合は 0%、1%、4%、2% であった。

次に、0、2、4、8% の PVP 添加培養液中で 8 日間培養をおこなった結果、IVM に供試できた卵母細胞の割合は 5%、54%、42%、26% であった。また、0、2、4、8% PVP 添加培養液中で培養をおこない、IVM をおこなった結果、得られた MII 期卵子の割合は 1%、12%、4%、3% であった。(表 1、図 1)

表 1. OGCs の培養に適した PVP 濃度の検討

PVP濃度	供試卵胞数	IVM供試数(%)*	IVM後の卵母細胞の成熟段階 (%)*			
			M II	GVBD	GV	dg
0%	62	3(5)	1(1)	0(0)	1(1)	1(1)
2%	73	39(54)	9(12)	2(2)	11(15)	17(23)
4%	70	29(42)	3(4)	1(1)	6(8)	19(27)
8%	62	16(26)	2(3)	0(0)	2(3)	12(19)

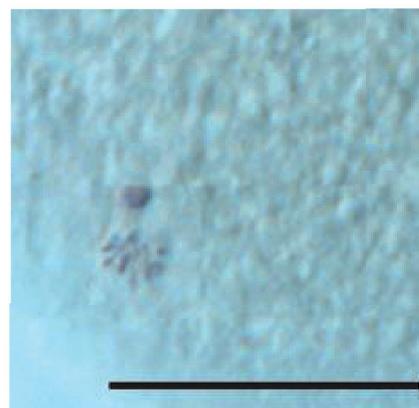
*/ 供試卵胞数



透過光像



アセトオルセイン染色像



拡大図

Scale bar = 50 μ m

図 1. 8 日間培養後に得られた MII 期卵子

0、0.01、0.1、1 AU/ml の FSH 製剤を添加し培養をおこなった結果、それぞれの区において、IVM に供試できた卵母細胞の割合は 90%、87%、53%、53% であった。また、IVM をおこなった結果、得られた MII 期卵子の割合はそれぞれ 49%、25%、8%、12% となり、0 AU/ml FSH 製剤添加区が有意に高かった ($p < 0.05$)。(表 2)

表 2. OGCs の培養に効果的な FSH 製剤の添加濃度の検討

FSH製剤濃度 (AU/ml)	供試数	IVM供試数 (%)*	IVM後の卵母細胞の成熟段階%*		
			MI	GVBD	GV
0	95	86 (90)	47 (49) ^a	10 (10)	16 (16)
0.01	64	56 (87)	16 (25) ^b	1 (1)	23 (35)
0.1	58	31 (53)	5 (8) ^b	0 (0)	12 (20)
1	73	39 (53)	9 (12) ^b	2 (2)	11 (15)

*;/ 供試卵胞数

a-b間に有意差あり ($p < 0.05$)

FSH を投与したウサギのグラーフ卵胞から OCCs を吸引し、TCM199+5% FBS+10ng/ml EGF で IVM をおこなった卵子を IVM 卵子とした。また、200-299 μ m の卵胞から単離した OGCs を 8 日間培養し、TCM199+5% FBS+10ng/ml EGF で IVM をおこなった卵子を培養卵子とした。

排卵卵子、IVM 卵子、培養卵子を用いて IVF をおこなった結果、前核期胚はそれぞれ 91%、59%、12% であった。排卵卵子では 27% が胚盤胞期胚へ発生したのに対して、培養卵子では前核期胚以降の発生は観察されなかった。また、IVM 卵子においても桑実期胚が 6% と低率であり、胚盤胞期胚への発生は観察されなかった。(表 3)

表 3. IVF による培養卵子の胚発生能力の検討

	供試数	発生胚数(%)*				
		前核期*1	4細胞期*2	8-16細胞期*3	桑実期*4	胚盤胞期*5
排卵卵子	36	33 (91)	30 (83)	19 (52)	12 (33)	10 (27)
IVM卵子*6	32	19 (59)	5 (15)	2 (6)	2 (6)	0 (0)
培養卵子*7	75	9 (12)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

*;/ 供試卵子数 *1; 媒精後6h *2; 媒精後24h *3; 媒精後48h *4; 媒精後72h *5; 媒精後96-120h

*6IVM卵子: ウサギにFSHを投与し、グラーフ卵胞から回収したGV期卵子をIVM培養液中で体外成熟させた卵子

*7培養卵子: 8日間培養後、IVM培養液中で体外成熟させた卵子

考 察

OGCs を 4% PVP 添加培養液中で 6、7、8、9 日間培養し、IVM をおこなった。培養日数が 6 日間の場合、ほとんどの卵母細胞が GV 期の状態であり、MII 期卵子が得られなかったのに対して、7、8、9 日間培養をおこなった場合は MII 期卵子を得ることが可能であった。また、培養日数が短いと IVM 後に GV 期である割合が高い傾向にあった。この結果から、卵母細胞の発育には 7 日間以上の体外培養が必要であり、発育期間が不十分であると減数分裂を再開する能力、MII 期に至る能力を獲得できないことが考えられた。

OGCs を 0、2、4、8% PVP 添加培養液中で培養をおこなった結果、0% PVP の条件下で培養をおこなった場合、OGCs は構造を維持できない傾向にあり、顆粒膜細胞の増殖も観察されなかった。また、PVP の添加濃度が高くなるにつれて同様の傾向が見られた。ウシやブタの OGCs の培養には 1-12% の濃度で PVP を添加することが効果的であるとされているのに対して、マウスにおいては高分子物質の添加は必要ないとされている。このことから高分子物質の適切な添加濃度は種によって異なり、ウサギにおいては 2% の濃度で PVP を添加することが、OGCs の構造維持の観点からも有効であることが示された。

OGCs の培養に効果的な FSH 製剤の添加濃度の検討をおこなった結果、FSH 製剤の添加濃度が高くなるにつれて顆粒膜細胞の伸展が観察され、OGCs の構造が維持しにくい傾向にあった。0、0.01 AU/ml で FSH 製剤を添加した区においては、培養中に卵胞腔の形成も観察された。これらの結果は、体外で OGCs の培養をおこなった場合、FSH 製剤添加の有無に関わらず、卵胞腔の形成をおこなうことを示している。また、FSH 製剤無添加区で OGCs を培養し、IVM をおこなうことで 49% が MII 期に達した。この結果は FSH 製剤添加区と比較して有意に高い値となった。Hirao らは FSH 製剤無添加の条件下でウシの OGCs の培養をおこない、産仔の作出を報告している¹⁰⁾。この結果からも、ウサギを含め、体外で卵母細胞の培養をおこなう場合は FSH 製剤が必ずしも必要ではないことが示唆された。

得られた MII 期卵子の胚発生能力の検討をおこなうため、射出精子を用いて IVF をおこなった結果、12% で前核の形成が観察されたが、その後の発生は観察されなかった。排卵卵子と比較して培養卵子の囲卵腔内、細胞質内への精子の侵入が見られず、未受精の卵子が数多く観察された。これは体外培養または体外成熟をおこなった卵子において観察される透明帯の固化が原因であると考えられた。

これらのことから、ウサギ発育途上卵母細胞は 2% PVP 添加の条件下で 8 日間培養し、IVM をおこなうことで効率よく MII 期卵子が得られることが示された。また、体外で培養をおこなった卵子の胚発生能力は排卵卵子、IVM 卵子と比較して有意に低い、前核形成が認められたことから体外で発育させたウサギ卵母細胞が受精能を有していることが示された。

参 考 文 献

1. John J. Eppig and Marilyn J. O'Breйн (1996) Development In Vitro of Mouse Oocytes from Primordial Follicles. *Biology of Reproduction* 54, 197-207
2. Daniel SA, Armstrong DT, Gore-Langton RE. (1989) Growth and development of rat oocytes in vitro. *Gamete Research* 24, 109-121
3. Roy SK, Greenwald GS. (1989) Hormonal Requirements for the growth and differentiation of hamster preantral follicles in long-term culture. *Journal of Reproduction and Fertility* 87, 103-114
4. Hirao Y, Nagai T, Kubo M, Miyano T, Miyake M, Kato S. (1994) In vitro growth and maturation of pig oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility* 100, 333-339

-
- 5 . Cecconi S, Barboni B, Coccia M, Mattioli M. (1999) In vitro development of sheep preantral follicles. *Biology of Reproduction* 60, 594-601
 - 6 . Huanmin Z, Yong Z. (2000) In vitro development of caprine ovarian preantral follicles. *Theriogenology* 54, 641-650
 - 7 . Harada M, Miyano T, Matsumura K, Osaki S, Miyake M, Kato S. (1997) Bovine oocytes from early antral follicles grow to meiotic competence in vitro: effect of FSH and hypoxanthine. *Theriogenology* 48, 743-755
 - 8 . Roy SK, Treacy BJ. (1993) Isolation and long-term culture of human preantral follicles. *Fertility and Sterility* 59, 783-790
 - 9 . Senbon S, Hirao Y, Miyano T. (2003) Interactions between the oocyte and surrounding somatic cells in follicular development: lessons from in vitro culture. *Journal of Reproduction Development* 49, 259-269
 10. Yuji Hirao, Takehiro Itoh, Manabu Shimizu, Kosuke Iga, Kazushige Aoyagi, Masato Kobayashi, Masayuki Kacchi, Hiroyoshi Hoshi, and Naoki Takenouchi (2004) In Vitro Growth and Development of Bovine Oocyte-Granulosa Cell Complexes on Frat Substratum: Effects of High Polyvinylpyrrolidone Concentration in Culture Medium. *Biology of Reproduction* 70, 83-91
 11. Y. Hosoi, K. Niwa, S. Hatanaka and A. Iritani (1981) Fertilization in vitro of Rabbit Eggs by Epididymal Spermatozoa Capacitated in a Chemically Defined Medium. *Biology of Reproduction* 24, 637-642

英文要旨

Research about the developmental ability of in vitro grown Rabbit oocytes

Yuki Miyamoto¹, Mako Korekane², Hironobu Sugimoto³, Toshiyuki Takehara¹,
Syunsuke Ito¹, Satoshi Kishigami⁴, Kazuya Matsumoto⁴, Kazuhiro Saeki⁴,
Akira Iritani⁴ and Yoshihiko Hosoi⁴

Abstract

The mammalian ovary includes many oocytes that are not ovulated. These oocytes are expected to be used for infertility treatment. In vitro growth (IVG) has been researched for the study of ovary, oocyte formation, and follicle formation, infertility treatment and protection of rare animals. Small immature oocytes have to need to growth and then maturation to gain the mature oocytes. However, the studies of the animal species except mice are not enough because of growing oocytes can't mature until the oocyte size measure up to species-specific size and the growth term takes different for animal species. In vitro growth culture, the spherical structure of OGCs is important to maintain their interaction between the oocyte and surrounding cells. If it doesn't maintain the structure, oocytes will degenerate because of a lack of interaction with the surrounding cells. In 2004, Hirao reports the addition of Polyvinylpyrrolidone (PVP) in bovine in vitro growth culture media is an effective method for maintaining the OGCs's spherical structure and improve their developmental rate.

In this study, we studied culture condition of rabbit in vitro growth culture and developmental ability of IVG oocytes. As a result, 8days culture of rabbit IVG is better, Addition of PVP maintains the OGC's spherical structure and 2% PVP addition is the best. IVG oocytes showed pronuclear formation after in vitro maturation - in vitro fertilization. For this reason, we showed that rabbit IVG oocytes have fertilization ability.

1. Graduate School of Biology Oriented Science and Technology, Kinki University

2. Yamashita ladies' clinic

3. Taniguchi Hospital

4. Department of Biology - Oriented Science and Technology, Kinki