

ウサギ未成熟卵母細胞の体外培養における培養液交換の検討

和泉 広樹¹、杉本 浩伸²、宮本 麻梨恵¹、岸上 哲士¹、
松本 和也¹、佐伯 和弘¹、細井 美彦¹

要 約

哺乳動物の卵巣には、未成熟な卵母細胞が数多く存在する。これらを体外で培養し、成熟させる事ができれば、卵子資源として利用する事ができる。

本研究では、ウサギの未成熟卵母細胞を用いて体外発育培養 (in vitro growth; IVG) の培養液交換の条件検討を行った。1996年にマウスのIVGにおいて産仔作出に成功したEppigらの培養液の交換方法、2日に一回半量交換 (half replacement /2 day; HR/2 day) に加え、毎日半量交換 (half replacement /day; HR/day)、毎日全量交換 (Full replacement /day; FR/day) の検討を行った。またIVG後に体外成熟培養 (in vitro maturation; IVM)、顕微授精 (intracytoplasmic sperm injection; ICSI) を行った。その結果、IVG-IVM後のM II期卵子への成熟率は他の区と比較してFR/dayが高かった。前核形成率はHR/2 dayと比較してHR/dayは有意に高かったが、以降の発生率に差は見られなかった。また、IVGに供試した未成熟卵母細胞から胚盤胞期胚まで発生した割合は、FR/dayにおいて高かった。以上のことから、ウサギのIVGにおいて培養液を毎日全量交換することが効果的であることが示された。

緒 言

哺乳動物の卵巣には発育途上の卵母細胞が多数含まれているが、排卵に至る卵母細胞はわずかであり、多くは発育の途中で退行に向かう。これら未成熟な卵母細胞を体外で培養し受精可能な卵子を得ることができれば家畜の繁殖、ヒト不妊治療、さらには野生動物の繁殖といったことへの応用が期待される。現在、IVGにおいて多くの動物種で受精可能な卵子が得られているが^{1)~3)}、産仔までに至った例は僅かである^{4), 5)}。この原因は、動物種により卵母細胞の成熟出来るサイズが異なること、また、そのために必要な発育期間も異なることがあげられる⁶⁾。これらのことからIVGでは培地の組成⁷⁾、培地への成長因子の添加⁸⁾、気相や温度⁹⁾など様々な培養条件が研究されてきた。2010年、Magalhãesらはヤギとヒツジの前胞状卵胞を培養する際に、培養液の交換法が卵胞の発育に影響を与えることを報告した¹⁰⁾。

本研究では、初期胞状卵胞が数多く存在しており、医薬品の安全性試験等にも広く利用されているウサギを用いて、1996年にマウスのIVGにおいて産仔作出に成功したEppigらの培養液の交換方法であるHR/2day¹¹⁾に加え、HR/dayまたはFR/dayでIVGを行い、培養液の交換が未成熟な卵母細胞の発育および成熟、受精後の胚発生へどのように影響するのかを検討した。

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. 医療法人定生会 谷口病院 〒598-0043 大阪府泉佐野市大西 1-5-20

材料と方法

1. ウサギ卵巣の摘出

性成熟した New Zealand White 種のウサギに 80IU の妊馬血清性腺刺激ホルモン (Pregnant mare serum gonadotropin; VETERRINARY PEAMEX: ノバルティスアニマルヘルス株式会社) を筋肉注射し、その 72 時間後に 70IU のヒト絨毛性腺刺激ホルモン (human chorionic gonadotropin; VETERRINARY PUBEROGEN: ノバルティスアニマルヘルス株式会社) を静脈注射し過剰排卵処理を施した。hCG 投与後 14 時間後に 2ml ソムノペンチル (共立製薬株式会社) を静脈注射して屠殺し、その後卵巣を摘出した。

2. 卵子顆粒膜細胞複合体 (Oocyte-Granulosa cell complexes; OGCs) の体外発育培養 (IVG)

摘出した卵巣の表面をメス、ピンセットを用いて薄くスライスし、M 2 培養液中でメスを用いて卵胞を単離した。単離後、倒立顕微鏡下で卵胞直径を計測して 200 ~ 299 μm の卵胞のみを使用した。得られた卵胞の基底膜を実体顕微鏡下で 26G 針により切開し、卵母細胞の周囲に顆粒膜細胞が一層以上結合している OGCs のみを回収した。回収した OGCs は 37°C, 5% CO₂, in air の条件下で、Light Mineral Oil で被覆した 50 μl の培養液スポットに移して 8 日間培養を行った。培養液の交換は HR/2 day、HR/day、FR/day の 3 区画で行った。IVG 培養液は 0.3% Albumin from bovine serum, Further purified, $\geq 99\%$ (SIGMA)、10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ anti-biotic-mycotic solution (SIGMA)、10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ Insulin-Transferrin-Selenium (GIBCO)、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ascorbic acid (SIGMA)、0.05% fetal bovine serum (HyClone) を添加した Minimum Essential Medium Alpha Medium (GIBCO) を使用した。

3. 卵母細胞の体外成熟培養 (IVM)

IVG8 日後、OGCs を 37°C, 5% CO₂, in air の条件下で Light Mineral Oil で被覆した 50 μl の IVM 培養液スポットに移して、14 ~ 16 時間成熟培養を行った。IVM 培養液は 0.2724mg/ml β -ESTRADIOL WATER SOLUBLE (SIGMA)、0.1mg/ml Poly (vinyl alcohol), average mol wt 30, 000-70, 000 (SIGMA)、10ng/ml Epidermal growth factor (SIGMA) を添加した Tissue culture medium 199 (ニッスイ) を使用した。

4. 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 雌ウサギを屠殺後、卵巣、卵管、子宮を摘出し、子宮側から M 2 培養液で卵管灌流を行い卵子-卵丘細胞複合体 (Oocyte-Cumulus cell Complexes; OCCs) を回収した。

5. 顕微授精 (intracytoplasmic sperm injection; ICSI)

回収した OCCs は 0.1% ヒアルロニダーゼ (nacalai tesque) を添加した M2 培養液中で裸化を行った。得られた成熟卵子は 37°C、5%CO₂、in air の条件下で、洗浄した Light Mineral Oil で被覆した 50 μl の胚培養液スポット中で 30 分の回復培養をおこなった。注入用精子には人口腔を用いて回収した New Zealand White 種の雄ウサギの射出精子を用いた。直進運動を行う精子のみを選別し、10%PVP スポットに移してピエゾドライブを用いて精子頭部を切断した。注入用スポットに卵子を導入し、卵子を第一極体が 6 時または 12 時方向になるようにホールディングピペットで固定し、インジェクションピペットで 1 つの精子頭部を注入した。注入後、洗浄した Light Mineral Oil で被覆した 50 μl の胚培養液スポットに移し、37°C、5%CO₂、5%O₂、90%N₂ の条件下で 5 日間培養を行い、6-8 時間後に受精確認、24 時間ごとに発生

確認をおこなった。胚培養液は 0.55mg/ml sodium pyruvate (SIGMA)、0.146mg/ml L-Glutamine, non-animal source (SIGMA)、1.861 μ l/ml DL-lactate, synthetic free of glucose (SIGMA)、0.063mg/ml penicilline G potassium salt (nacalai tesque)、5.0 μ l/ml gentamicin solution (SIGMA) を添加した CMRL-1066 (GIBCO) に 20% fetal bovine serum (HyClone) を添加したものをを用いた。

6. 統計学的処理法

統計学的処理は Fisher の PLSD を用い、統計的有意差は $P < 0.05$ とした。

結 果

IVG 8 日後の OGCs の形態は FR/day の区では構造が維持されおり、卵母細胞が顆粒膜細胞に包まれている。HR/2 day、HR/day の区において OGCs の形態は崩れたものが多く見られ、卵母細胞の周囲の顆粒膜細胞は FR/day の区と比較して薄くなる傾向があった (図 1)。

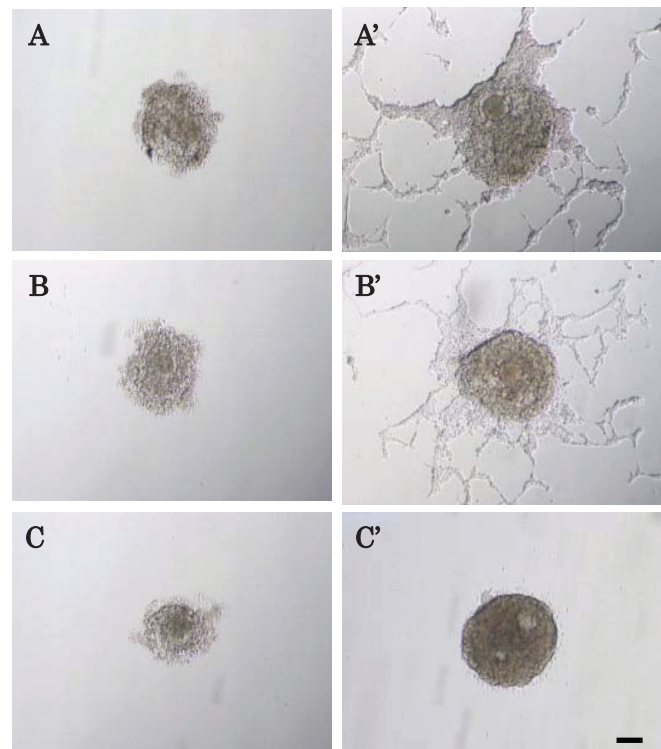


図 1. OGCs の形態

A, B, C : 培養前の OGCs. A' : HR/2 day の培養 8 日目の OGCs. B' : HR/day の培養 8 日目の OGCs. C' : FR/day の培養 8 日目の OGCs.

IVG の培養液交換方法、HR/2 day、HR/day、FR/day の区における影響について調べた結果、培養後の卵母細胞の生存率はそれぞれ 62%、69%、92% となり、FR/day が有意に高かった。IVM 後の第二減数分裂中期 (M II) 卵子への成熟率は 54%、59%、75% でそれぞれの区間に有意な差は無かったものの、FR/day において高い傾向にあった (表 1)。

表 1. IVG における培養液交換法の影響

培養液 交換法	IVG			IVM				
	供試 OGCs 数	生存数 (%)*	退行数 (%)*	供試 卵子数	成熟率 (%)*			変性 (%)*
					M II	M I	GV	
HR/2day	63	39(62) ^a	24(38) ^a	39	21(54)	2(5)	12(31)	4(10)
HR/day	64	44(69) ^a	19(30) ^a	44	26(59)	2(5)	12(27)	5(11)
FR/day	66	61(92) ^b	5(8) ^b	61	46(75)	3(5)	7(12)	5(8)

*分母を供試 OGCs 数とした

a, b 間で優位差有 ($p < 0.05$)

n = 7

**分母を供試卵子数とした

M II : 第一減数分裂中期 (Metaphase II)
M I : 第一減数分裂中期 (Metaphase I)
G V : 卵核胞期 (Germinal Vesicle)

IVG における培養液交換法が受精後の胚発生に及ぼす影響について調べた結果、前核形成率は実験区 HR/2 day、HR/day、FR/day においてそれぞれ 63%、100%、84% であり、HR/2 day と比較して HR/day の区では有意に高かった。しかし、卵割期以降ではそれぞれの実験区で差は見られなかった (表 2)。

表 2. IVG における培養方法が授精後の胚発生に及ぼす影響

培養液 交換法	ICS 供試験 卵母子数	生存卵子数 (%)* 1	発生率		
			前核形成卵子数 (%)* 2	卵割胚数 (%)* 3	胚盤胞期胚数 (%)* 3
HR/2day	21	16(76)	10(63) ^a	7(70)	1(10)
HR/day	26	24(92)	24(100) ^b	22(92)	3(13)
FR/day	46	43(94)	36(84) ^{ab}	31(86)	4(11)
排卵卵子	35	32(91)	29(91)	25(86)	16(55)

* 1 分母を ICSI 供試卵子数とした

a, b 間で優位差有 ($p < 0.05$)n \geq 3

* 2 分母を生存卵子数とした

* 3 分母を前核形成卵子数とした

IVG に供試した未成熟な卵母細胞から胚盤胞期胚に発生する割合を調べた結果 FR/day において高かった (図 2)。

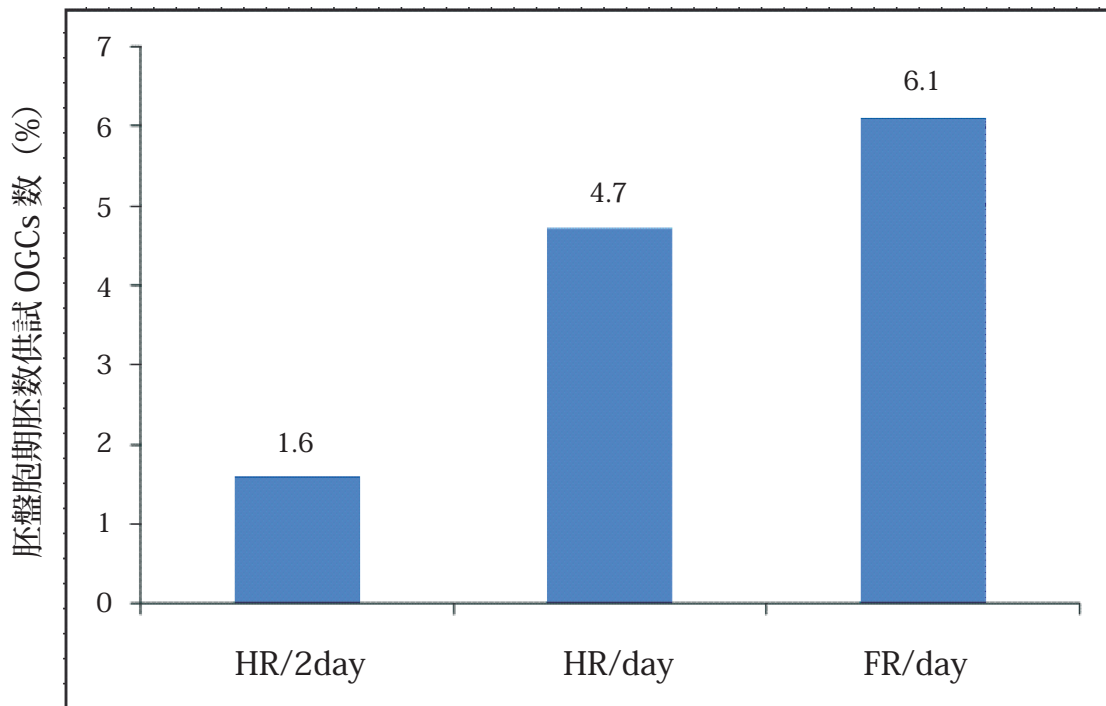


図 2. IVG に供試した卵母細胞から胚盤胞期胚へ発生する割合

考 察

培養液交換の影響について調べた結果、IVG 後の OGCs の生存率は他の区と比較して FR/day の区が 92% と有意に高かった。また、IVM 後に M II 期卵へ成熟した割合も FR/day の区が 75% と高かった。FR/day の区と比較して、HR/2day の区と HR/day の区では OGCs の形態がくずれる傾向にあることが観察された (図 1)。哺乳動物の IVG を行う際に培養期間中の卵胞や OGCs の正常な形態を維持することが必要であるという報告がある¹²⁾。また、その改善のために培養基質として高濃度のポリビニルピロリドン (PVP) やコラーゲン等を含む培養液を用いて IVG が行われ、その効果が確認されている^{12, 13)}。実験の結果から、培養液交換の方法を変えることで培養期間中の OGCs の形態に違い見られ、FR/day の区において OGCs の形態及び M II 期卵への成熟率に効果があることが示された。

IVG-IVM 後に得られた M II 卵に ICSI を行った結果、前核形成率は HR/2day の区と比較して HR/day の区で有意に高かった。IVG を行った卵母細胞は細胞質の成熟が不十分であり、また、細胞質成熟が不十分な卵母細胞では精子核の膨化能が低下することが報告されている¹⁴⁾。本研究において培養液を 2 日毎に交換するよりも毎日交換することが IVG-IVM 後に得られた成熟卵の前核形成率が改善されることが示された。また、それぞれの実験区において、卵割期以降の発生率に差は見られなかったが、IVG に供試した卵母細胞から胚盤胞期へ達した胚の割合を見ると、FR/day の区が高かった。以上のことから、ウサギ IVG での培養液交換は全量を毎日変えることが効果的であることが示された。

参考文献

- 1 . Dr. Susan A. J. Daniel, David T. Armstrong, Robert E. Gore-Langton. (1989) Growth and development of rat oocytes in vitro. *Molecular Reproduction and Development* 24, 109-121.
- 2 . Sandra Cecconi, Barbara Barboni, Mimì Coccia, and Mauro Mattioli. (1999) In Vitro Development of Sheep Preantral Follicles. *Biology of Reproduction* 60, 594-601.
- 3 . Y. Hirao, T. Nagai, M. Kubo, T. Miyano, M. Miyake and S. Kato. (1994) In vitro growth and maturation of pig oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility* 100, 333-339.
- 4 . John J. Eppig and Allen C. Schroeder. (1989) Capacity of Mouse Oocytes from Preantral Follicles to Undergo Embryogenesis and Development to Live Young after Growth, Maturation, and Fertilization in Vitro. *Biology of Reproduction* 41, 268-276.
- 5 . K. Yamamoto, T. Otoi, la N. Koyama, N. Horikita, S. Tachikawa and T. Miyano. (1999) Development to live from bovine small oocytes after growth, maturation and fertilization in vitro. *Theriogenology* 52, 81-89.
- 6 . Shoichiro Senbon, Yuji Hirao and Takashi Miyano. (2003) Interactions between the oocyte and surrounding somatic cells in follicular development: Lessons from in vitro culture. *Journal of Reproduction and Development* 49, 259-269.
- 7 . Matos MHT, Lima-Verde IB, Luque MCA, Maia JE Jr, Silva JRV, Celestino JJH, Martins FS, Ba´o SN, Lucci CM, Figueiredo JR. (2007) Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability in vitro. *Zygote* 15, 173-182.
- 8 . Martins FS, Celestino JJH, Saraiva MVA, Matos MHT, Bruno JB, Rocha CMC Jr, Lima-Verde IB, Lucci CM, Ba´o SN, Figueiredo JR. (2008) Growth and Differentiation factor -9 stimulates goat primordial follicles activation in vitro and the progression to secondary follicles. *Reprod Fertil Dev* 20, 916-92.
- 9 . Silva CMG, Matos MHT, Rodrigues GQ, Faustino LR, Pinto LC, Chaves RN, Araujo VR, Campello CC, Figueiredo JR. (2010) In vitro survival and development of goat preantral follicles in two different oxygen tensions. *Anim Reprod Sci* 117, 83-89.
10. DM Magalhães, DD Fernandes, MBS Mororo´, CMG Silva, GQ Rodrigues, JB Bruno, MHT Matos, CC Campello and JR Figueiredo. (2011) Effect of the Medium Replacement Interval on the Viability, Growth and In Vitro Maturation of Isolated Caprine and Ovine Pre-Antral Follicles. *Reproduction in Domestic Animals* 46, 134-140.
11. John J. Eppig and Marilyn J. O’ Brien. (1996) Development In Vitro of Mouse Oocytes from Primordial Follicles. *Biology of Reproduction* 54, 197-207.
12. 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 the Flat Substratum: Effects of High Polyvinylpyrrolidone Concentration in Culture Medium. *Biology of Reproduction* 70, 83-91.
13. Hironobu Sugimoto, Yuki Miyamoto, Yoko Tsuji, Kouichi Morimoto, Takeshi Taniguchi, Yoshiharu Morimoto and Yoshihiko Hosoi. (2009) Examination of Effective Culture Methods for Rabbit Preantral Follicles. *J. Mamm. Ova Res. Vol.26*, 221-226.
14. Hill, J.L., Hammar, K., Smith, P.J. and Gross, D.J. (1999): Stage-dependent effects of epidermal growth factor on Ca^{2+} efflux in mouse oocyte. *Mol. Reprod. Dev.*, 53, 224-253.

英文要旨

Examination of effective medium Replacement interval
for culture of rabbit immature oocytes

Hiroki Izumi¹, Hironobu Sugimoto², Marie Miyamoto¹, Satoshi Kishigami¹,
Kazuya Matsumoto¹, Kazuhiro Saeki¹ and Yoshihiko Hosoi¹

Abstract

The mammalian ovary contains a large number of immature oocytes. If these oocytes can be cultured and obtain developmental competence, these oocytes are expected to be used as new resources for medicine.

We studied medium replacement interval for in vitro growth (IVG) of rabbit immature oocytes. We employed the method of Eppig in 1996 that succeeded in production of mice and tried the half-volume replacement of medium every 2days (HR/2day). Additionally, We tried the half-volume replacement of medium (HR/day) and full-volume replacement of medium (FR/day) every day. After IVG, oocytes were cultured for in vitro maturation (IVM). Consequently, the percentage of oocytes that reached the metaphase II in FR/day was higher than that of others. After fertilization by intracytoplasmic sperm injection (ICSI), the percentage of oocytes that showed pronuclear formation in HR/day was significantly higher than that in HR/2 day, though there was no difference in developmental competence of reaching the cleavage stage and blastocyst stage for each condition. The developmental rate from the total number of oocytes used for IVG to the blastocyst stage was higher in FR/day. In conclusion, replacing the full volume of culture medium every day was found to be effective in rabbit IVG.

1. Department of Biology – Oriented Science and Technology, Kinki University
2. Taniguchi Hospital