

博 士 論 文

ブタ卵母細胞に付着する卵丘細胞の減数分裂進行に
対する役割とその応用に関する研究

平成8年3月

広島大学大学院生物圏科学研究科
生物生産学専攻

磯部 直樹

目 次

第一章 緒 論	1
第二章 ブタ卵胞の大きさと卵胞卵子の核相との関係 について	
第一節 序論	11
第二節 材料および方法	13
第三節 結果	16
第四節 考察	30
要 約	34
第三章 卵丘細胞を除去したブタ卵子の卵核胞崩壊 (GVBD)および成熟について	
第一節 序論	36
第二節 材料および方法	38
第三節 結果	46
第四節 考察	59
要 約	65
第四章 ブタ卵胞卵子の卵核胞崩壊(GVBD)に対する 卵丘細胞間ギャップ結合の役割	
第一節 序論	68
第二節 材料および方法	71
第三節 結果	77
第四節 考察	84
要 約	89

第五章	ブタ卵丘細胞で生産され培地中に放出される 卵核胞崩壊(GVBD)抑制因子について	
第一節	序論	91
第二節	材料および方法	93
第三節	結果	105
第四節	考察	123
	要約	132
第六章	卵核胞崩壊(GVBD)を抑制して培養したブタ 卵胞卵子の体外受精	
第一節	序論	135
第二節	材料および方法	138
第三節	結果	143
第四節	考察	153
	要約	161
第七章	総合論議	165
	総括	179
	謝辞	190
	引用文献	191

第一章 緒 論

成熟した哺乳動物卵巣の卵子は、アルカリ性ホスファターゼに富む細胞質を持ち、妊娠数週間後に卵黄のう内胚葉および尿のう基部に見出される大型の細胞、すなわち原始生殖細胞(primordial germ cell)が発達したものである。この細胞は、後腸上皮および背側腸間膜の組織内を移動して、発生途上の生殖腺の中に定着し、卵祖細胞に分化する。卵巣における全卵祖細胞の体細胞分裂による増殖は、通常胎生期の間を終了し、第一減数分裂期に入り卵母細胞へと分化する。その卵母細胞の核相は、第一減数分裂前期の前細糸期(preleptotene stage)、細糸期(leptotene stage)、接合糸期(zygotene stage)、太糸期(pachytene stage)を経て複糸期(diplotene stage)に進み、分娩前後には、退行する卵子を除いた全ての卵巣内卵子の減数分裂は休止する(豊田, 1988)。

したがって、食肉処理場で採取した性成熟に達する前のブタ(未成熟ブタ)の卵巣における正常卵胞の卵子は全て核相の進行を複糸期で休止した状態である。複糸期に達した卵子は、一層の扁平な顆粒層細胞に取り囲まれ、原始卵胞を形成する。原始卵胞内の卵子の直径は約30 μm であるが、この未発育卵子(growing oocyte)は卵胞の発達とともに発育を開始し、その体積を徐々に増加させ、最終の大きさである120 μm へと発育する(宮野ら, 1994)。発育を開始した卵子の核は次第に大きくなり、卵核胞(germinal vesicle:GV)と呼ばれるようになる。卵子が発育を開始すると顆粒層細胞が重層化し、透明帯および卵胞膜が形成され、原始卵胞は一次卵胞、さらに二

次卵胞へと進行する。さらに、顆粒層細胞間に間隙が現われ、卵胞腔を形成し、胞状卵胞へと発達する。

胞状卵胞内卵子は、黄体形成ホルモン(LH)のサージを受けると、長い休止期を終え、減数分裂を再開する。すなわち、卵子は卵核胞崩壊(Germinal Vesicle Breakdown, GVBD)を起こし、第一減数分裂前中期(Prometaphase I, ProM I)、中期(Metaphase I, M I)、後期(Anaphase I, A I)、終期(Telophase I, T I)を経て第二減数分裂中期(Metaphase II, M II)に達し、ここで再び減数分裂を停止し、精子の侵入を待つ(Hunter & Polge, 1966)。

このように、哺乳動物の性成熟に達した個体の卵巣には発育完了卵子(fully grown oocyte)が多数存在する。これらの卵子の核相をM IIまで進行する過程(成熟)を体外で再現させようという初めての試みは、Pincus & Enzmann(1935)によって行われた。彼らは、成熟ウサギの卵胞から採取した卵子をホルモン無添加Ringer-Locke液で培養し、卵子の減数分裂が再開され、M IIに進行することを認めた。このことから、哺乳動物の卵巣から採取し、体外で培養した卵子は、ホルモンの刺激なしで自発的に減数分裂を再開し、M IIにまで進行することが明らかにされた。

この報告以来、マウス(Edwards, 1962, 1965; Donahue, 1968)、ハムスター(Edwards, 1962; Gwatkin & Haidri, 1973; Iwamatsu & Yanagimachi, 1975)、ヒツジ(Edwards, 1965)、ウシ(Edwards, 1965; Leibfried & First, 1979; Fukui & Sakuma, 1980)、ヒト(Pincus & Saunders, 1939; Edwards, 1965)においても、卵巣から取り出した卵子を

体外で培養すると、卵子は自発的にGVBDを誘起し、M IIにまで進行することが報告された。

ブタにおいては、1965年に、Edwardsが初めて卵胞卵子を体外で43時間培養し、59.5%(25/42)という成熟卵率を得た。その後、体内ではLHサージによって卵子の減数分裂が再開されることから、体外で成熟させる時に用いる培地に添加するホルモンが卵子の成熟卵率に及ぼす影響がYoshida *et al.* (1989)によって検討された。彼らは培地にホルモンを添加しなかった時、53.1%であった成熟卵率が、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)および妊馬血清性性腺刺激ホルモン(PMSG)を添加すると、81.2%に上昇し、 17β -エストラジオールを添加しても成熟卵率は増加しなかった(80.3%)ことから、 17β -エストラジオールの併用如何に関わらず、hCGおよびPMSGは、卵子の成熟を促進すると結論した。

また、卵巣から採取した卵子の中には卵丘細胞が付着した卵子および付着していない卵子が存在することから、佐藤ら(1978a)は、いずれの卵子が、体外での成熟培養に適しているかを検討した。すなわち、卵胞から採取した直後に卵丘細胞が付着している卵子(COC)と付着していない卵子(DO)とに分類し、それぞれの卵子を培養した時の核相を経時的に観察した。その結果、両卵子ともGVBDは培養開始14時間後から開始され、成熟卵率は30時間後以降でプラトーに達したが、培養したDOにおいては成熟卵率は著しく低く、染色体の異常凝縮や消失など退行的変化を示す卵子が高率に出現したことを認めた。このことから、ブタ卵子の体外成熟を行う際には、

供試卵子としてCOCを用いるのが適当であると結論した。

ブタ卵子成熟用培地の最適pHを調べるために、佐藤・石橋(1977)は、pH6.7および7.2の培地でブタCOCを30時間培養した結果、pH6.7の培地でCOCを培養した時、18.8%であった成熟卵率が、pH7.2の時には56.3%に上昇したことを報告した。また、佐藤ら(1978a)は、pHが6.8~7.0、7.2~7.4および7.8~8.0の培地でCOCを培養した時、卵子の成熟卵率はそれぞれ15、60および30%であり、COCを培養する際の培地のpHは7.2~7.4が適当であることを示唆した。

佐藤ら(1977)は成熟培地の浸透圧が卵子の成熟卵率に及ぼす影響を調べた。その結果、COCを培養する培地の浸透圧が166~355mOsmと上昇するにつれて成熟卵率は0~51.4%と増加し、浸透圧が388mOsmになると再び成熟卵率が低下したことから、最も適当な成熟培地の浸透圧は355mOsmであることを示した。

湊と豊田(1982)は、体内で卵子が成熟する時、卵子は周囲を卵胞液で囲まれていること、および卵胞液は主に血清成分であることから、卵胞液および血清が卵子の成熟を促進すると考え、成熟培地に添加する卵胞液あるいは血清が卵子の成熟卵率に及ぼす影響を検討した。そして、5%のブタ卵胞液あるいはブタ血清を添加した成熟培地でCOCを培養した時、いずれの区も約80%の卵子が成熟していたことを認め、成熟培地に卵胞液あるいは血清を添加する必要性を主張した。

以上のように、ブタ卵胞卵子の体外成熟培養の条件が検討され、現在では、卵丘細胞に囲まれた卵子(COC)を用い、ブ

タ卵子体外受精用として、恒常的に高い成熟卵率が得られるようになって来た。

Naito *et al.*(1988)は、体内の卵子は卵胞液に囲まれた状態で成熟するので、卵胞液中に体外受精後の卵子の雄性前核形成を促進させる物質が存在すると考え、卵胞刺激ホルモン(FSH)添加ブタ卵胞液中で卵子を48時間培養して媒精し、FSH添加TYH培地で培養した卵子(20.0%)に比べて有意に高い雄性前核形成率(81.0%)を示したことを報告した。

Yoshida *et al.*(1992a)は、精子が卵子に侵入した後、雄性前核が形成されないのは、卵子内のグルタチオン(GSH)濃度が低いため、精子のDNA蛋白であるプロタミン内のS-S結合が分解されないためであると考え、GSHの1成分であるシステインを添加した成熟培地で卵子を36時間培養して媒精すると、システイン無添加区(20%)に比べて、有意に高い雄性前核形成率を示した(94%)ことを報告した。

Yoshida *et al.*(1992b)は、卵胞液中の体外受精後の卵子の雄性前核形成を促進させる物質の分子量決定を試み、分子量10,000~200,000の物質が、雄性前核形成を促進させたことを報告した。

また、卵胞液と共に体内の卵子を取り囲んでいるものとして、卵胞壁、卵丘細胞および壁顆粒層細胞に注目し、Mattioli *et al.*(1988)はこれらの細胞が卵子の雄性前核形成率に及ぼす影響を検討した。その結果、COCを44~46時間成熟培養し、媒精しても雄性前核形成率は2%であったが、壁顆粒層細胞を含む卵胞壁と付着した状態でCOCを成熟させる

と雄性前核形成率は62%にまで上昇したことを報告した。

同様に, Zheng & Sirard (1992)は, 成熟培地に卵胞壁を加えることによって雄性前核形成率は有意に上昇したと報告した(26%, 6%)。また, Ocampo *et al.*(1993)は, 卵丘細胞が卵子の雄性前核形成に及ぼす影響を検討し, 3層あるいはそれ以上の卵丘細胞が付着した卵子の雄性前核形成率(78.9%)は, 全く卵丘細胞を有さない卵子および1~2層の卵丘細胞を有する卵子のそれ(37.5, 36.7%)に比較して, 有意に高い値を示したことを報告した。

同様に, Nagai *et al.*(1993)は, 卵子を取り囲む卵丘細胞の数が卵子の精子侵入後の雄性前核形成率に及ぼす影響を調べた。一卵子当たり 15×10^3 の卵丘細胞を有する卵子の場合, 3.5×10^3 の卵丘細胞を有する卵子に比べて, かなり高い雄性前核形成率を示し(83%, 27%), 卵子に付着した卵丘細胞が, 雄性前核形成率に大きな影響を及ぼしていることを明らかにした。

以上の通り, ブタの体外成熟および体外成熟卵子を用いた体外受精において, 高い成熟卵率と雄性前核形成率が得られるようになって来た。

しかし, 高い成熟卵率, 高い雄性前核形成率の得られる培養法で成熟させた卵胞卵子を体外受精させた場合でも著しく高い多精子侵入卵率を示す。そこで, Zheng & Sirard(1992)は, 多精子侵入が起こる原因を卵子の体外での成熟が不十分だからと考え, 成熟培地に添加する蛋白が多精子侵入卵率に及ぼす影響を調べた。その結果, ウシ胎児血清(FCS)を添加

した培地で、卵子を48時間培養した時の多精子侵入卵率は74.5%であったが、FCSを添加した培地で24時間培養した後、ウシ血清アルブミン(BSA)添加培地でさらに24時間培養した時の多精子侵入卵率は50%になり、FCSを添加した成熟培地中で、卵子を48時間培養した時のその値に比べて有意に低くなったことから、FCSを添加した成熟培地で24時間培養した後、BSA添加培地でさらに24時間培養する成熟培養法は、多精子侵入卵率を低下させると結論した。

また、Funahashi *et al.* (1994b) は、NaCl濃度の高い(116.4mM)TCM-199培地で成熟させた卵子に比べて、NaCl濃度の低い(68.5mM)Whitten培地で成熟させた卵子において、体外受精後の雄性前核形成率が増加した(Funahashi *et al.* 1994a)ことから、成熟培地中のNaCl濃度が卵子の成熟と深く関わっていると推論し、成熟培地に添加するNaClが多精子侵入卵率に及ぼす影響を調べた。その結果、培地に添加するNaCl濃度が減少するにしたがって、多精子侵入卵率は減少し、NaCl濃度68.49, 92.40, 116.40および140.35mM区に比べて44.50mM区において、有意に低い多精子侵入卵率を示した。このことから、成熟培地中に低い濃度のNaClを添加することが、多精子侵入卵率を減少させると報告した。

このように、多精子侵入卵率を減少させるための研究がいくつか行われているが、体外成熟ブタ卵胞卵子の体外受精においては多精子侵入卵率が依然として高く、正常受精卵子はほとんど得られない。

一般に、食肉処理場で廃棄されるブタ卵巣から卵胞卵子を

採取し、体外で成熟させた後、受精させる実験では、完全に発育を完了した卵子(発育卵子, fully grown oocyte)が用いられている。発育卵子は1卵巣当たり、わずか10個程度しか採取できない。しかし、ブタ卵巣には発育卵子の他に、多数の発育途上の卵子(未発育卵子, growing oocyte)が存在している。核移植によるクローン動物や形質転換動物の作成のための研究あるいは優良家畜の配偶子保存に関する研究には、非常に多くの卵子が必要であるから、卵巣内に多数存在する未発育卵子を利用することが必要である。

前述した通り、卵子は発育とともにその直径を増加させるので、卵子が発育しているか否かの指標として、卵子の直径が用いられている。卵子の直径とGVBDとの関係を調べた Motlik *et al.* (1984)は、直径0.3~0.7, 0.8~1.6, 1.7~2.2 および3~5mmのブタ卵胞から採取した卵子の直径はそれぞれ約100, 110, 115および120 μ mであり、これらの卵子を体外で24時間培養した時のGVBD卵率はそれぞれ15, 72, 94および100%であったと報告した。

この報告は、直径の小さい未発育卵子はGVBDを誘起する能力を有していないことを示している。したがって、未発育卵子を利用するためには、まず、未発育卵子のGVBDを誘起させる方法が明らかにされなくてはならない。さらに、そのためにはブタ卵子のGVBD誘起機序を解明する必要がある。

哺乳動物卵子のGVBD誘起機序に関連して、Dekel & Beer (1980)はラットのCOCと裸化卵子をLH添加あるいは無添加

培地で培養した。裸化卵子のGVBDに要する時間が、COCをLH添加培地で培養した時のそれとよく一致していたことから、卵丘細胞を除去することが卵丘細胞－卵子間ギャップ結合を切断し、GVBDを起こさせるというLHの影響と同一の作用を及ぼしたのであると推論し、GVBDの引き金は卵丘細胞－卵子間ギャップ結合の切断であると主張した。

また、Dekel *et al.* (1981)は、ラットのCOCをLH無添加培地で20時間培養すると、GVBDも卵丘細胞－卵子間ギャップ結合の切断も起こらないが、LHを添加することによってGVBDおよび卵丘細胞－卵子間ギャップ結合の切断が同時に起きることを示し、GVBDは卵丘細胞－卵子間ギャップ結合の切断によって引き起こされると結論した。

しかし、Eppig (1982)によると、ラットにおいてはhCG投与3時間後ですでにGVBDが誘起されているが、卵丘細胞－卵子間ギャップ結合の切断はhCG投与3あるいは6時間後でも観察されないことを示した。同様にマウスにおいてもCOCを3時間培養した時点で卵丘細胞－卵子間ギャップ結合の切断は認められなかったが、GVBDはすでに開始されていたことが示されている(Sarustri & Siracusa, 1983)。また、過排卵処理を施したラットにおいて、卵子のGVBD開始時間は、卵丘細胞－卵子間ギャップ結合の切断ではなく卵丘細胞間ギャップ結合の切断とよく一致していることも認められている(Larsen *et al.*, 1986, 1987)。

このように、ラットやマウスなどの齧歯類では卵丘細胞－卵子間ギャップ結合あるいは卵丘細胞間ギャップ結合の切断

とGVBDとの関係はかなり検討されているが、哺乳動物卵子におけるGVBDの引き金はなお不明のままである。また、ブタにおいては、GVBDを起こしたCOCにおいても放射冠細胞と卵子間のギャップ結合は存在していたという報告(Motlik *et al.*, 1986)はあるが、GVBDと細胞間ギャップ結合との関係はほとんど検討されていない。

本研究はブタ卵巢の未成熟卵子の有効利用を目的として、ブタ卵子の減数分裂進行に対する卵丘細胞の役割を追及するとともに、卵胞卵子を成熟させるための新しい方法の開発を試みた。まず、第二章では本研究を行うに当たって、最適な卵子を採取する条件を調べるために、様々な大きさの卵胞から採取したブタ卵胞卵子における各核相卵子の割合を求めた。第三章では、卵丘細胞を除去することがブタ卵子のGVBDおよびその後の減数分裂の進行に及ぼす影響を調べ、減数分裂の進行における卵丘細胞の役割を明らかにしようとした。第四章では、GVBDと細胞間ギャップ結合との関係を調べ、ブタ卵胞卵子のGVBDの引き金が何かを追求した。第五章では、10 μ l液滴で20個のCOCを培養した時の培地が卵丘細胞の膨潤およびGVBDに及ぼす影響を調べ、卵丘細胞から培地中へ放出されるGVBD抑制因子の同定を試みた。最後の第六章では、10 μ l液滴で24時間培養し、さらに24時間培養して成熟させた卵子を用いて体外受精を行い、新しい卵胞卵子成熟培養法の有効性を検討した。

第二章 ブタ卵胞の大きさと卵胞卵子の核相との関係について

第一節 序 論

卵胞の大きさと卵胞卵子の成熟能との関係について調べた Tsafiriri & Channing(1975)は、直径1~2mm, 3~5mmおよび6~12mmの卵胞から採取したブタ卵子を成熟培養した時の成熟卵率がそれぞれ15.6, 54.8および80.1%を示したことを、Motlik *et al.* (1984)は、0.3~0.7mm, 0.8~1.6mm, 1.7~2.2mmおよび3~5mmの卵胞から採取し、培養したブタ卵子の成熟卵率はそれぞれ0, 17, 49および76%であったことを報告した。これらの報告から考えると、卵子を採取する卵胞の直径が小さくなるにつれて成熟卵率が急激に低下する、すなわち、卵胞の直径が小さくなるにつれて、未発育卵子の割合が増加すると考えられる。

ところが、ブタ卵胞卵子の体外成熟には、最近でも通常、直径2~6mmと比較的小さな卵胞の卵子が用いられている(Mattioli *et al.*, 1990; Mattioli *et al.*, 1991; Singh *et al.*, 1993; Reed *et al.*, 1993)。したがって、体外成熟用に採取された卵子には未発育卵胞卵子が多数含まれている可能性がある。その未発育卵子が体外で成熟させた時の卵核胞崩壊(GVBD)卵率、成熟卵率およびその後の正常受精卵率を低下させていることが考えられる。したがって、卵巢から採取し、成熟培養を開始する前の卵胞卵子の核相を調べ、卵子の成熟能と採取時の核相との関係を明らかにすることが重要である。

一方、前章の緒論で論述したとおり、優良な大中家畜を効率良く生産するためには、卵巢に多数存在する未発育卵子を利用する手法を確立することが重要である。しかし、未発育卵子を体外で培養しても、減数分裂の再開は誘起されない。したがって、未発育卵子を利用しようとする場合、正常に発育したブタ卵胞卵子(発育卵胞卵子)を用いて、卵子の減数分裂再開機序を明確にすることが必要である。しかし、どのような卵胞から採取すれば正常に発育した卵子が回収されるか明らかでない。したがって、正常に発育した卵子がどのような卵胞から採取できるか検討することは重要である。

本章では、大きさの異なる卵胞から採取したブタ卵子における各核相卵子の割合を明らかにする目的で、種々の大きさの卵胞から採取した卵胞卵子の核をプロピジウムアイオダイドで染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

第二節 材料および方法

実験1 共焦点レーザー顕微鏡によるブタ卵胞卵子の核相の観察

食肉処理場で未経産ブタ卵巢を採取し、表面に付着した血液等をキムワイプで拭き取った後、0.1mg/mlカナマイシン(明治製菓)を添加し、オートクレーブにかけた0.85%生理食塩水(約37℃)中に浸して、2時間以内に研究室に持ち帰った。その卵巢の表面にある卵胞に10mlシリンジ(テルモ)に装着した21G(5/8)の注射針(テルモ)を穿刺して、卵子を含む卵胞液を吸引し、その液を20ml試験管内に移した。その試験管を、卵子を沈澱させるために、37℃に保温したウォーターバス内に5~10分放置した。上澄を捨て、沈殿物に5%ウシ血清(bovine serum, BS)および0.1mg/mlカナマイシンを添加し、濾過滅菌したリン酸緩衝生理食塩水(Phosphate buffered saline, PBS, Nissui)数mlを加え、シャーレに移した。実体顕微鏡下で、卵子のみを選別し、卵丘細胞が付着した卵子の卵丘細胞を、ピペッティングにより除去し、酢酸アルコール(酢酸:エタノール=1:3)で6時間固定した後、20μg/mlプロピジウムアイオダイド(Propidium Iodide, PI, SIGMA)添加PBS中に30分以上浸漬して、共焦点レーザー顕微鏡(Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM, ACAS750, MERIDIAN)で観察した。CLSMの光源にはアルゴンレーザーを用い、波長488nmで励起し、575~605nmの光を測定した。光学的切片の厚さを表すピンホール(Pinhole)は100~

225に設定した。同一のCLSMで観察した卵子をカルノア液(エタノール:クロロホルム:酢酸=6:3:1)で脱脂し, アセトラクモイド(1%ラクモイド添加45%酢酸)で染色して, アセトグリセロール(蒸留水:アルコール:酢酸=3:1:1)に封入した。この卵子をホフマン・モジュレーション・コントラスト顕微鏡(Hoffmann Modulation Contrast Microscopy, HMCM)で観察した。

HMCMで観察した卵核胞(GV)期卵子の核相はMotlik & Fulka(1976)の分類に基づいて, 卵核胞内に核小体を有する卵子(GV I), 核小体およびクロモセーターを有する卵子(GV II), 核小体および繊維状の染色糸を有する卵子(GV III)および核小体は消失し, 繊維状の染色糸を有する卵子(GV IV)に区分した。また, それ以降のM IIまでの卵子の核相については, Hunter & Polge(1966)の分類に基づき第一減数分裂前中期(ProM I), 中期(M I), 後期(A I)および第二減数分裂中期(M II)に区分した。

実験2 大きさの異なる卵胞から採取したブタ卵子における各核相を示す卵子の割合

実験1と同様に採取し, 研究室に持ち返った卵巣の卵胞の大きさを2mm以下, 2~5mmおよび5mm以上に区分し, 各区の卵胞から卵子を吸引した。そして, コンパクトで完全な卵丘細胞を有する卵子とそれ以外の卵子(卵丘細胞が一部欠如した卵子あるいは全く卵丘細胞を有していない卵子)とに分けた。ピペッティングにより卵丘細胞を除去し, 酢酸アルコールで

固定した後，PIで染色，CLSMで観察し，核相の判定を行った．

第三節 結 果

実験1 共焦点レーザー顕微鏡によるブタ卵胞卵子の核相の観察

PIで染色した後、CLSMで観察し、GV Iと思われる卵子を図2-1aに示した。卵核胞内部はその周辺の細胞質よりも弱い蛍光を示した。また、卵核胞内部には、核小体と思われる強い蛍光を示す一つの塊が観察された。同一の卵子をアセトラクモイド染色してHMCMで観察した。その卵子は図2-1bに示す通り、核膜とその内部に明瞭な核小体が観察された。このHMCMで観察した卵核胞および核小体の位置は、CLSMで観察した時のそれらの位置とよく一致した。

GV IIと考えられる卵子のCLSM像を、図2-2aに示した。この卵子の卵核胞内部はGV Iの卵子と同様に周辺の卵細胞質より蛍光が弱く、核小体およびクロモセーターは強い蛍光を示した。HMCMで観察した同一卵子の卵核胞にも核小体およびクロモセーターが認められ(図2-2b)、それらのHMCM像における位置は、CLSM像における位置と一致した。

CLSMで観察した時、GV IIIと考えられた卵子を図2-3aに示した。核小体と繊維状の染色糸がかなり強い蛍光を示し、周囲の卵核胞内部は細胞質よりも弱い蛍光度であった。同一の卵子のHMCM像(図2-3b)においても、核膜、核小体および繊維状の染色糸が認められた。卵核胞および核小体の位置はHMCM像とCLSM像で一致した。

CLSMで観察し、GV IVと考えられた卵子を図2-4aに示した。

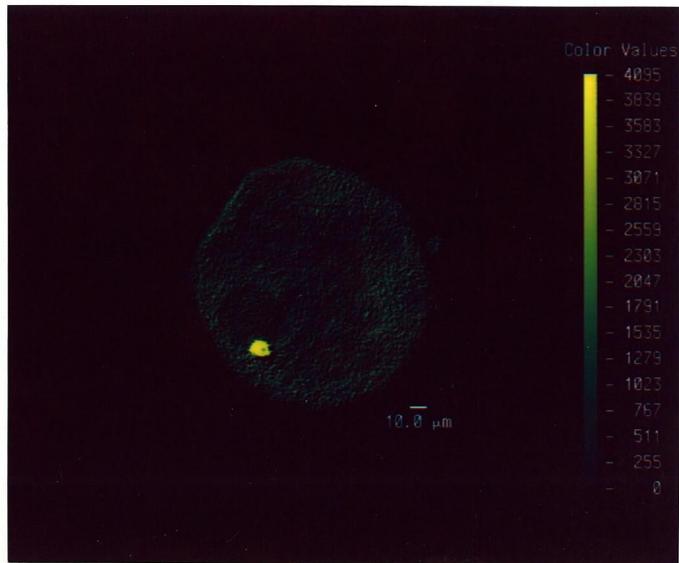


図2-1a GV I を示す卵子のCLSM像
卵核胞内部はその周辺の細胞質よりも弱い蛍光を示し，卵核胞内部には，核小体と思われる強い蛍光を示す一つの塊が観察される．

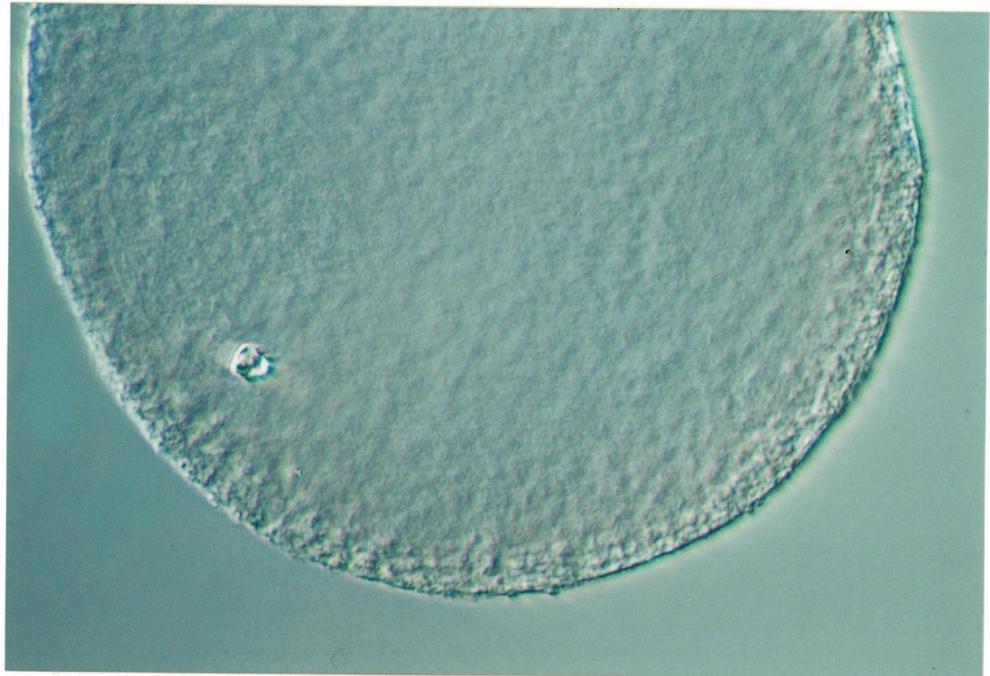


図2-1b GV I を示す卵子のHMCM像
卵核胞およびその内部に明瞭な核小体が観察される．(×450)

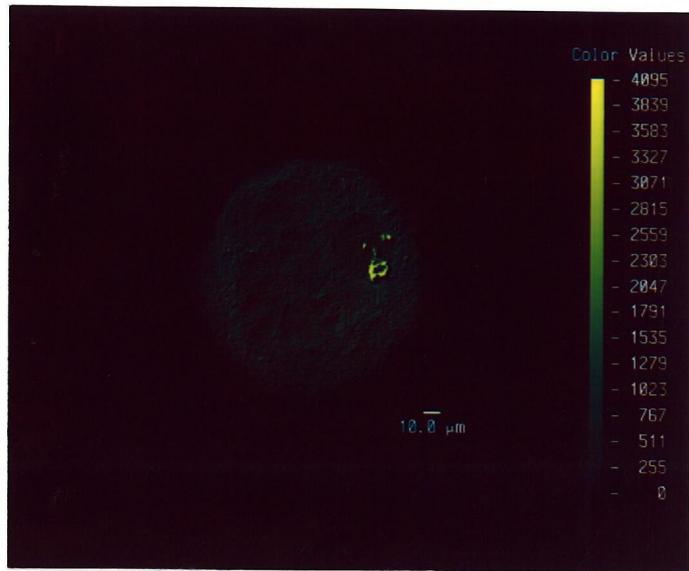


図2-2a GV II を示す卵子のCLSM像
卵核胞内部は周辺の卵細胞質より蛍光が弱く、核小体およびクロモセーターと思われる物体が強い蛍光を示している。

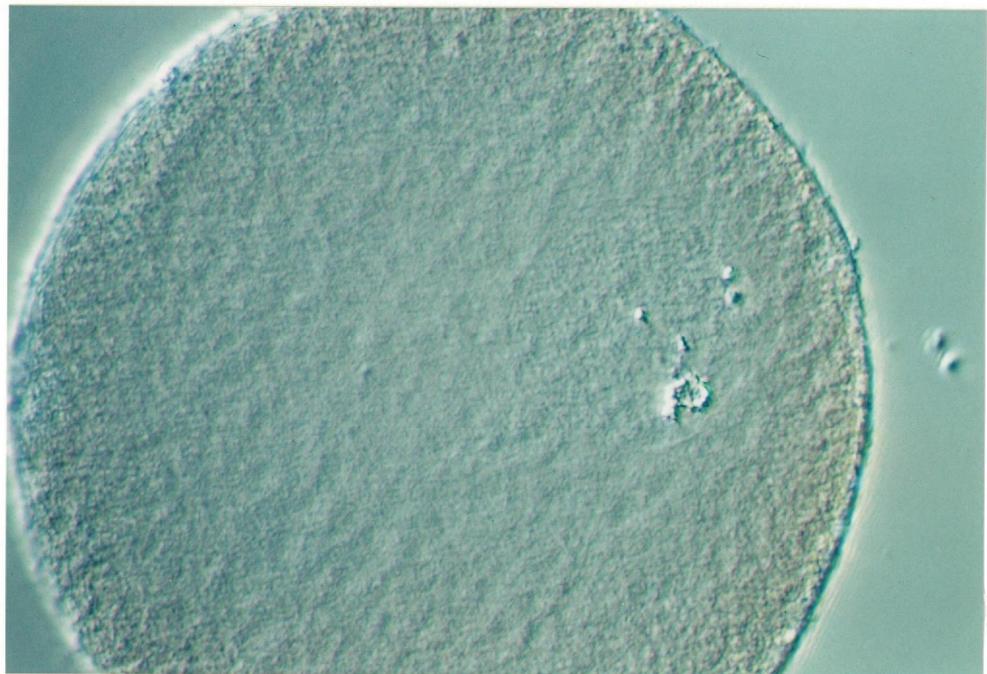


図2-2b GV II を示す卵子のHMCM像
卵核胞および、その内部に核小体およびクロモセーターが認められる。(×450)

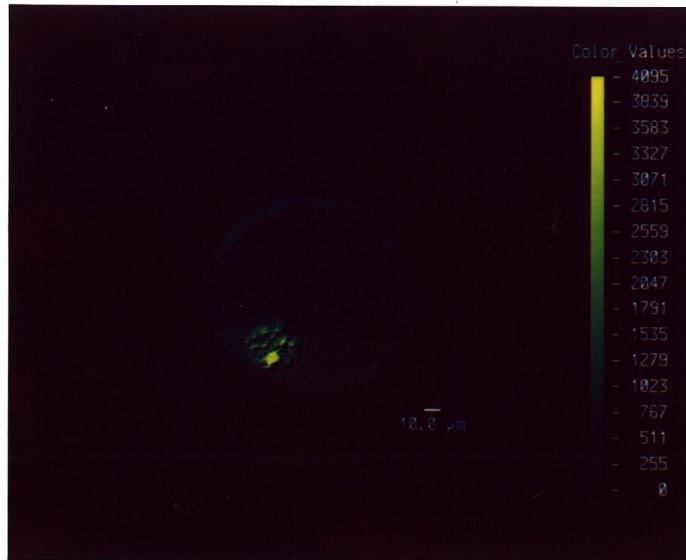


図2-3a GVⅢを示す卵子のCLSM像
核小体と繊維状の染色糸がかなり強い蛍光を
発している。また、その他の卵核胞内部
はその周辺の細胞質よりも弱い蛍光を示し
ている。

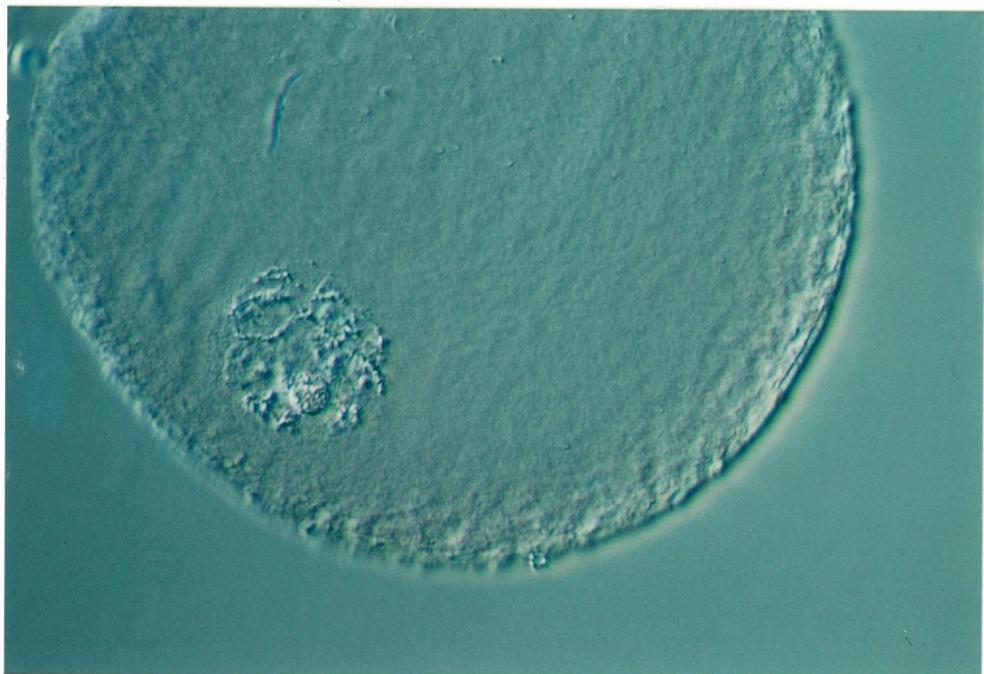


図2-3b GVⅢを示す卵子のHMC像
卵核胞，核小体および繊維状の染色糸が認め
られる。(×450)

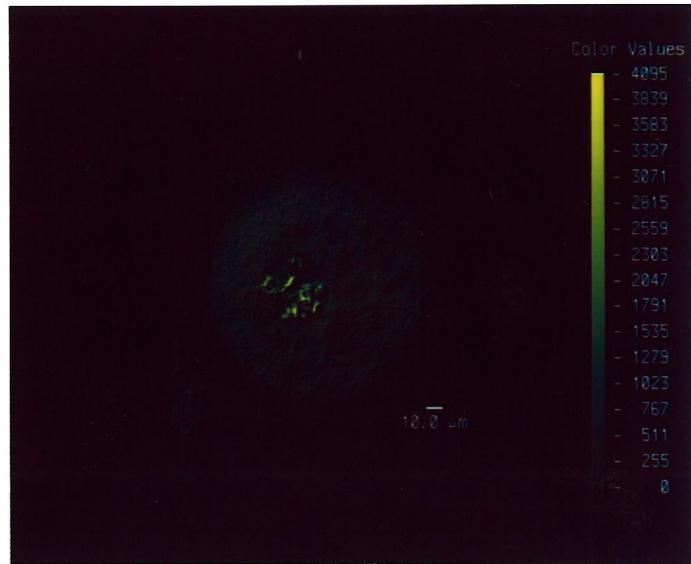


図2-4a GVIVを示す卵子のCLSM像
 繊維状の染色糸が強い蛍光を発しているが、
 核小体状の蛍光を発する物質は観察されない。

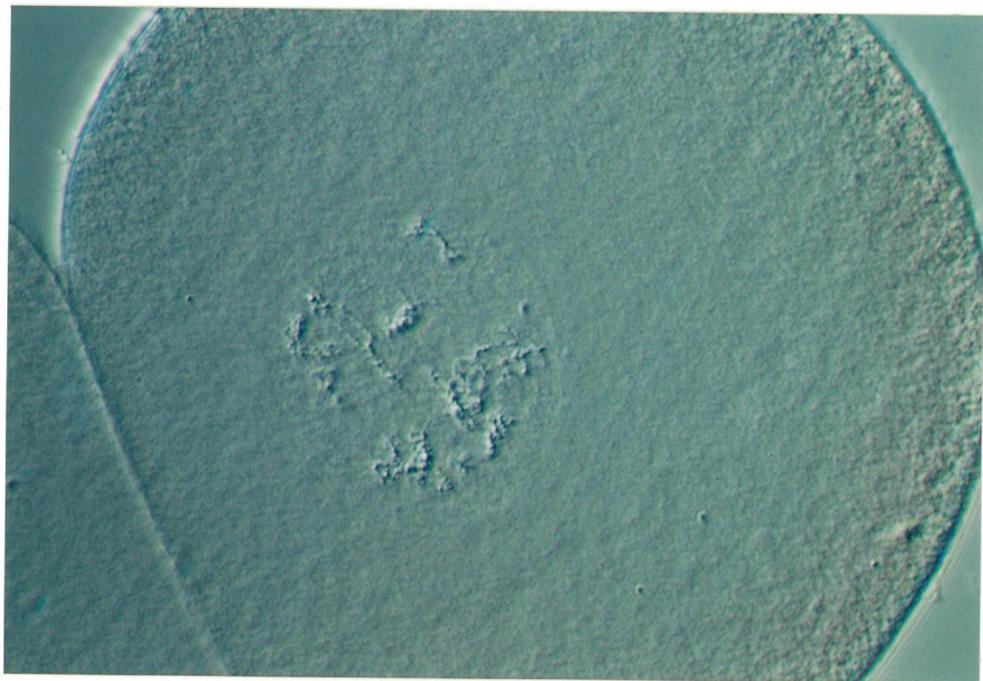


図2-4b GVIVを示す卵子のHMCM像
 卵核胞が観察され、繊維状の染色糸が確認で
 きる。(×450)

繊維状の染色糸が強い蛍光を発していたが、核小体状の蛍光を発する物質は観察されなかった。同一の卵子をHMCMで観察した時の像を図2-4bに示した。CLSMで観察した時と同一の位置に卵核胞は観察され、その中に繊維状の染色糸のみ認められた。

ProMIと考えられた卵子のCLSM像を図2-5aに示した。卵核胞は消失し、染色体は一つの塊として強い蛍光を示した。同一の卵子のHMCM像では、CLSM像におけるほぼ同じ配置に染色体が観察された(図2-5b)。

MIと考えられた卵子のCLSM像を図2-6aに示した。強い蛍光を示す染色体が区別できた。同一の卵子のHMCM像を図2-6bに示した。CLSMで観察した卵子の核とほぼ同じ配置の染色体が観察された。

CLSMで観察した時、AIと考えられた卵子を図2-7aに示した。強い蛍光を示す二つの染色体の塊が観察された。同一の卵子のHMCM像ではCLSMで観察された位置に二個の染色体の塊が観察された(図2-7b)。

MIIと考えられた卵子のCLSM像を図2-8aに示した。卵子の染色体は、各染色体ごとに強い蛍光を示した。また、極体染色体は、強い蛍光の一つの塊として観察された。同一の卵子のHMCM像ではCLSMで観察された染色体とほぼ同じ配置に卵子の染色体と極体の染色体が認められた(図2-8b)。

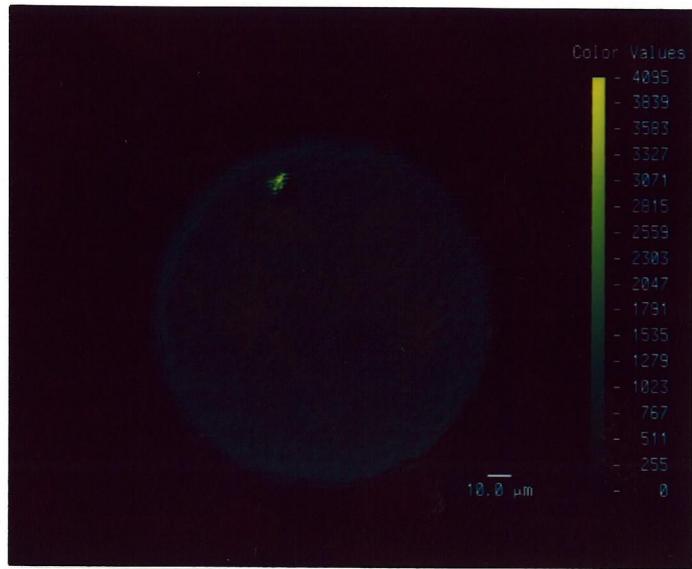


図2-5a ProM I を示す卵子のCLSM像
 卵核胞は消失し、染色体と思われる蛍光の強い物質が一つの塊として観察される。

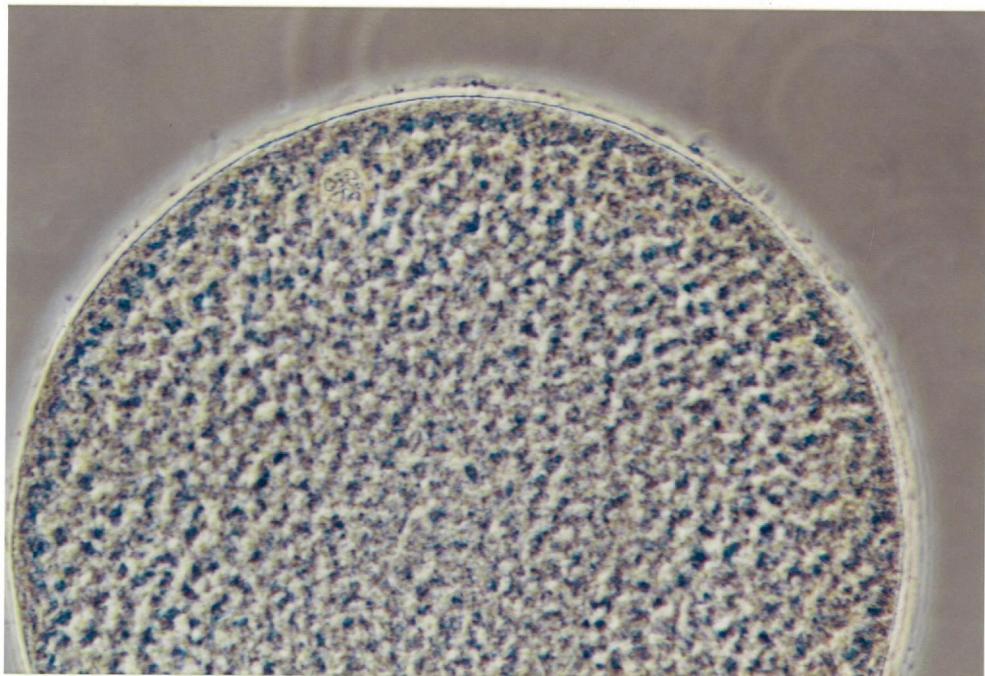


図2-5b ProM I を示す卵子のHMCM像
 著しく凝縮した染色体が観察される。(×450)

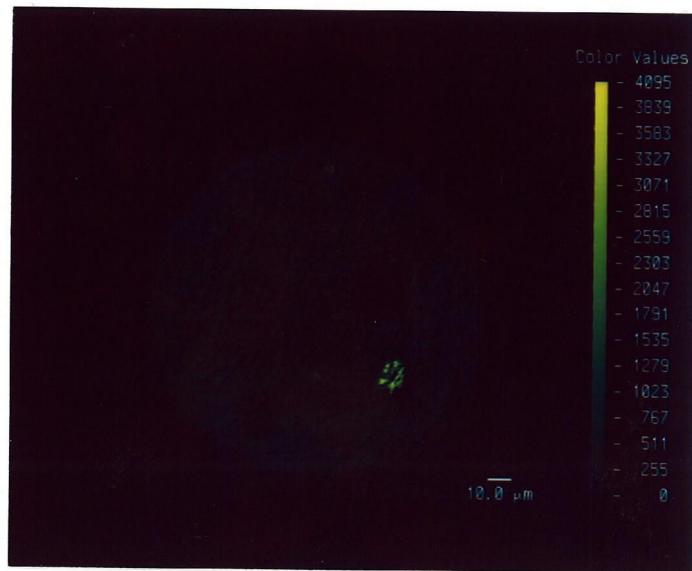


図2-6a MIを示す卵子のCLSM像
 蛍光の強い個々の染色体が明瞭に区別できる。

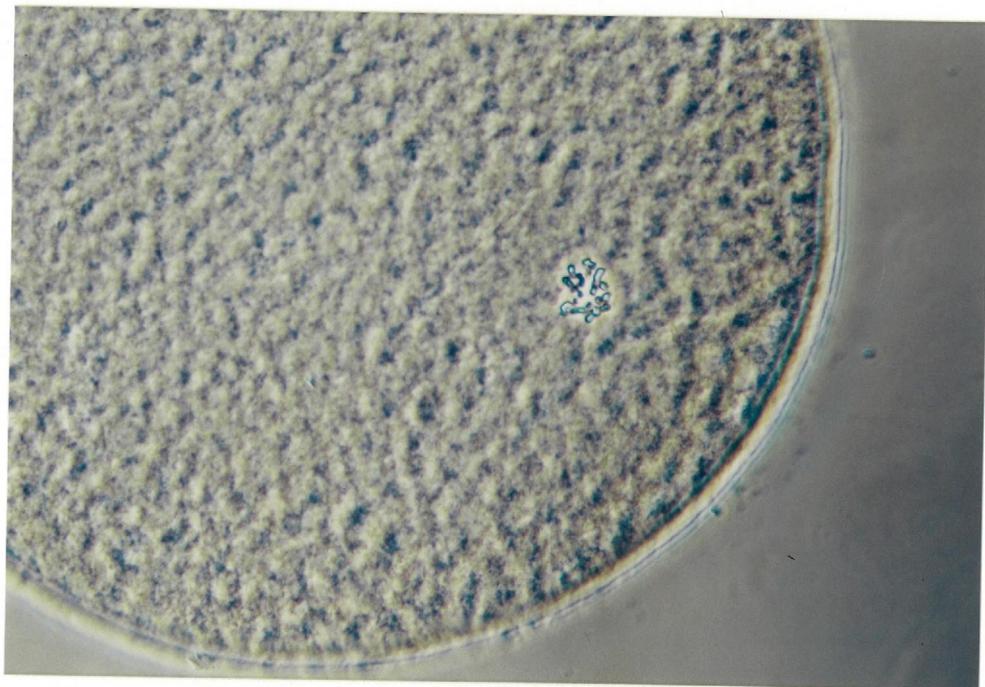


図2-6b MIを示す卵子のHMCM像
 個々の染色体が分離している様子が観察される。(×450)

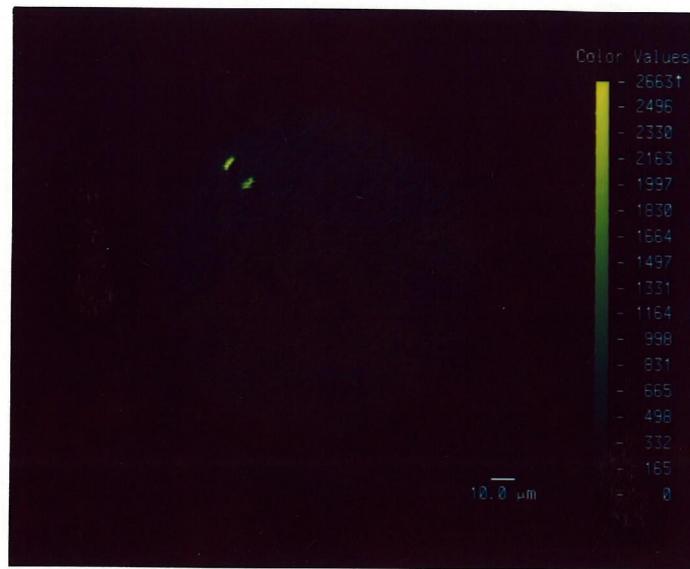


図2-7a AIを示す卵子のCLSM像
核と思われる蛍光の強い二つの塊が観察される。

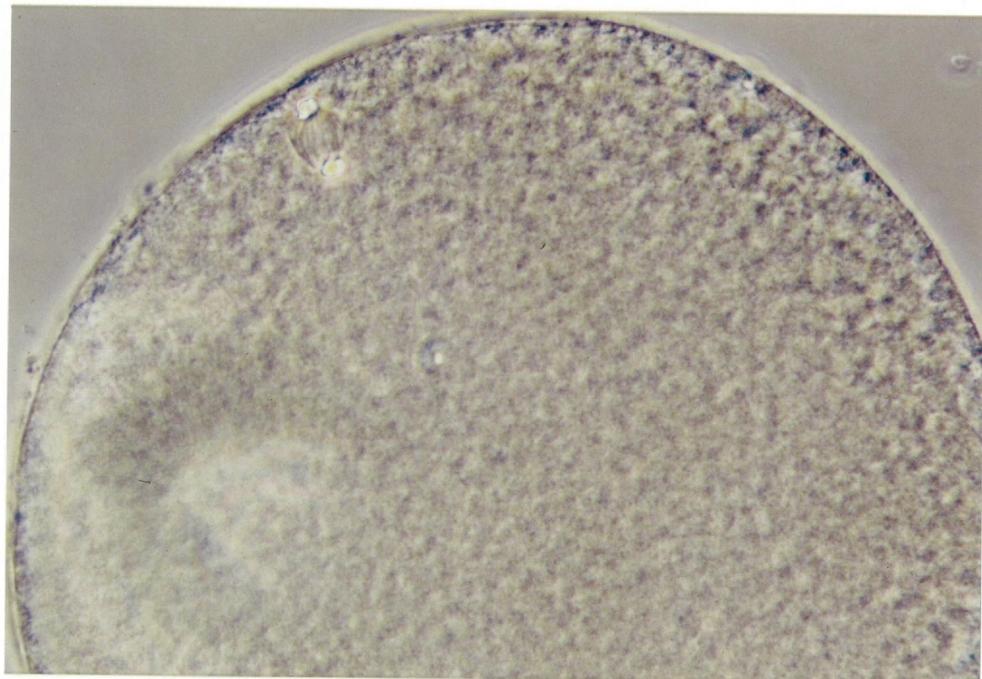


図2-7b AIを示す卵子のHMC像
両極へ分裂している核が観察される。(×450)

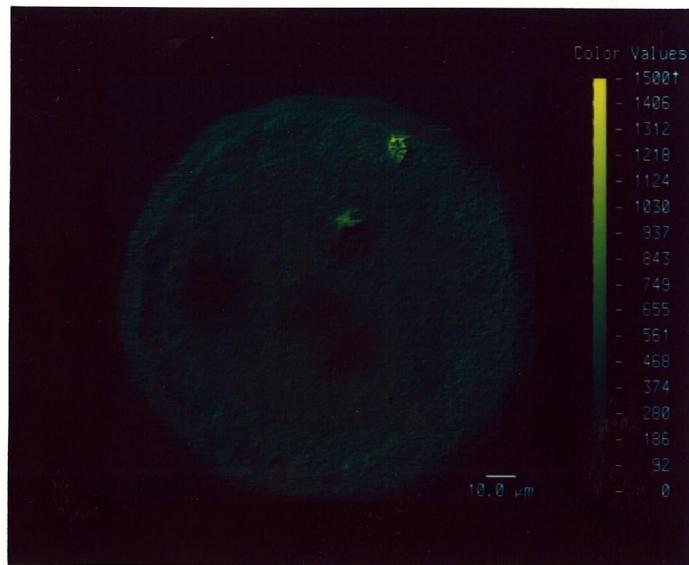


図2-8a MIIを示す卵子のCLSM像
 卵子の核と思われる物質は、個々の染色体が強い蛍光を示し、明瞭に区別でき、極体と思われる物質は、蛍光の強い一つの塊として観察される。

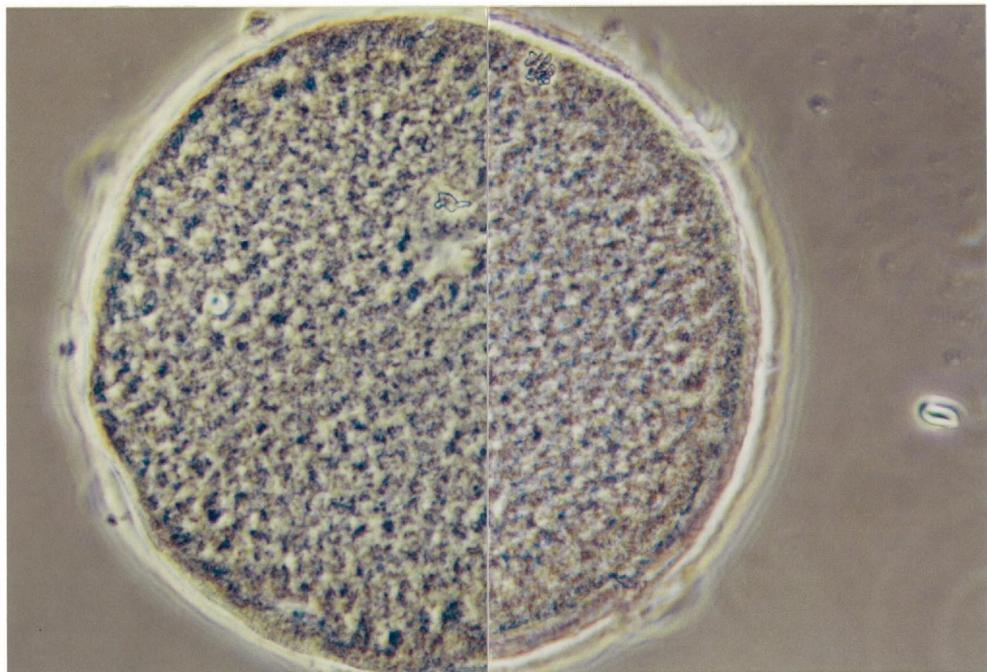


図2-8b MIIを示す卵子のHMCM像
 卵子の核および極体が認められる。(×450)

実験2 大きさの異なる卵胞から採取したブタ卵子における各核相を示す卵子の割合

大きさの異なる卵胞($\leq 2\text{mm}$, $2\sim 5\text{mm}$, $5\text{mm}\leq$)から採取したブタ卵胞卵子のうちコンパクトで完全な卵丘細胞を有する卵子の割合とそれ以外の卵子の割合を表2-1にまとめた。2mm以下の卵胞から採取した卵子においては、コンパクトで完全な卵丘細胞を有する卵子は34.3%であったが、2~5mmの卵胞から採取した卵子では49.8%に上昇した。さらに5mm以上の卵胞から採取した場合、ほとんどの卵子がコンパクトで完全な卵丘細胞を有していた。コンパクトで完全な卵丘細胞を有する卵子の割合は、卵子を採取する卵胞の直径が大きくなるにつれて有意に上昇した。

次に、コンパクトで完全な卵丘細胞を有する卵胞卵子の核相を、採取した卵胞の大きさごとに調べた結果を表2-2に示した。2mm以下の卵胞から採取した卵子においては、GVIVの卵子の割合が最も高く、次いで、GVI, GVIII, GVIIの順であった。しかし、2~5mmの卵胞から採取した卵子では、GVIの卵子の割合(42.3%)が最も高い値を示し、次いで、GVII, GVIV, GVIIIの順であった。また、2~5mmの卵胞から採取した区のGVIおよびGVIIの卵子の割合は、2mm以下の卵胞から採取した区のそれらに比べて有意に高い割合を示し、逆にGVIIIおよびGVIVの卵子の割合は2mm以下の卵胞から採取した卵子におけるそれらの値に比べて有意に低い割合であった。また、5mm以上の卵胞から採取した卵子においてはGVI卵子の割合(85.7%)が著しく高く、2~5mmの卵胞区

表 2-1 大きさの異なる卵胞から採取したブタ卵胞卵子におけるコンパクトな卵丘細胞を有する卵子の数とコンパクトな卵丘細胞を有さない卵子の数

卵胞の大きさ (x mm)	供試 卵数	コンパクトな卵丘 細胞を有する卵子 (%)	コンパクトな卵丘 細胞を有さない卵子 (%)
$x \leq 2$	108	37 (34.3) ^a	71 (65.7) ^a
$2 < x < 5$	223	111 (49.8) ^b	112 (50.2) ^b
$5 \leq x$	38	35 (92.1) ^c	3 (7.9) ^c

() 内の数値は供試卵数に対する割合 (%)

a, b, c : 各縦列の異文字間に有意差あり (P<0.01)

表2-2 大きさの異なる卵胞から採取したコンパクトな卵丘細胞を有するブタ卵胞卵子における各核相を示す卵子の数

卵胞の大きさ (x mm)	供試 卵数	GV (%)			
		I	II	III	IV
$x \leq 2$	111	25 (22.5) ^a	13 (11.7) ^a	25 (22.5) ^a	48 (43.2) ^a
$2 < x < 5$	104	44 (42.3) ^b	28 (26.9) ^b	11 (10.6) ^b	21 (20.2) ^b
$5 \leq x$	35	30 (85.7) ^c	5 (14.3) ^{ab}	0 (0.0) ^c	0 (0.0) ^c

GV: Germinal Vesicle

() 内の数値は供試卵数に対する割合 (%)

a, b, c : 各縦列の異文字間に有意差あり (P<0.05)

におけるその値よりも有意に高い割合であった。また、5mm以上の卵胞から採取した卵子には、GVⅢおよびGVⅣを示す卵子は全く観察されなかった。

次に、卵丘細胞が部分的に欠如した卵子および全く卵丘細胞を有していない卵子の核相を採取した卵胞の大きさごとに調べ、その結果を表2-3に示した。2mm以下の卵胞から採取した卵子のうち、76.2%の卵子がGV期であり、GVⅠ卵子の割合はわずかに8.9%であった。また、卵核胞崩壊(GVBD)以降の核相を示す卵子が23.8%も存在し、12.9%はMetⅡの核相を示す卵子であった。

2~5mmの卵胞から採取した卵子のうち、完全には卵丘細胞に囲まれていない卵子においてもGV期卵子は74.1%であり、そのうちGVⅠ卵子の割合は25.0%であった。この値は2mm以下の卵胞から採取した区におけるGVⅠ卵子の割合に比べて有意に高い値であった。2~5mmの卵胞区の卵子においてもGVBD以降の卵子が認められ、MetⅡ卵子は15.2%の割合で観察された。

5mm以上の卵胞から採取した卵子のうち完全な卵丘細胞を有していない卵子は3個しか回収されなかったが、それらの核相はすべてGVⅠを示した。この割合は2mm以下の卵胞から採取した区および2~5mmの卵胞から採取した区における割合より有意に高かった。

表 2-3 大きさの異なる卵胞から採取したブタ卵胞卵子のうち、コンパクトな卵丘細胞を有さない卵子における各核相を示す卵子の数

卵胞の大きさ (x mm)	供試 卵数	GV (%)				ProM I (%)	MI (%)	AI (%)	M II (%)
		I	II	III	IV				
$x \leq 2$	101	9 ^a (8.9)	6 ^a (5.9)	21 ^a (20.8)	41 ^a (40.6)	1 ^a (1.0)	10 ^a (9.9)	0 ^a (0.0)	13 ^a (12.9)
$2 < x < 5$	112	28 ^b (25.0)	8 ^a (7.1)	13 ^a (11.6)	34 ^a (30.4)	1 ^a (0.9)	9 ^a (8.0)	2 ^a (1.8)	17 ^a (15.2)
$5 \leq x$	3	3 ^c (100.0)	0 ^a (0.0)	0 ^a (0.0)	0 ^a (0.0)	0 ^a (0.0)	0 ^a (0.0)	0 ^a (0.0)	0 ^a (0.0)

GV: Germinal Vesicle ProMI: Prometaphase I MI: Metaphase I

AI: Anaphase I MII: Metaphase II

() 内の数値は供試卵数に対する割合 (%)

a, b, c : 各縦列の異文字間に有意差あり (P<0.01)

第四節 考 察

実験1において、GV I, GV II, GV III, GV IV, ProMI, MI, AIおよびMIIの核相を示す卵子において、PI染色し、CLSMで観察した像と、同一の卵子をアセトラクモイド染色し、HMCMで観察した像とは、卵核胞、核小体および核の位置が良く一致し、CLSMで判定した核相とHMCMで判定した核相は相同であることが明確にされた。したがって、酢酸アルコールで固定(6時間)しPI染色した卵子をCLSMで観察し、核相を判定する手法は非常に短期間に卵子の核相判定を行う有効な方法と考えられた。

本実験において、2mm以下の卵胞から採取したCOCのうち、コンパクトな卵丘細胞を有していない卵子の割合は65.7%であり、2~5mmの卵胞から採取した卵子においても約半数のCOC(50.2%)がコンパクトな卵丘細胞を有していなかった。しかし、5mm以上の卵胞から採取した卵子においては、卵丘細胞を有していない卵子の割合は、わずかに7.9%であった(表2-1)。これらのことから、卵子を採取する卵胞の大きさが減少するにつれて、コンパクトな卵丘細胞を有していない卵子の割合が増加することが明らかとなった。

Albertini & Andersen(1974)は、閉鎖卵胞内のCOCの卵丘細胞間結合は緩く、卵丘細胞-卵子間ギャップ結合は切断されていたことから、閉鎖卵胞からCOCを吸引すると、卵丘細胞は除去されると結論した。また、Tsafiriri & Channing(1975)は、卵子を卵胞から採取した段階で卵丘細胞を有していない卵子は閉鎖卵胞から採取した卵子であると述べている。

これらのことと、上述の卵子を採取する卵胞の大きさが減少するにつれて、コンパクトな卵丘細胞を有していない卵子の割合が増加することとを考え合わせると、卵胞の大きさが減少するにしたがって、閉鎖卵胞の割合が著しく増加すると考えられる。

閉鎖卵胞は白濁し、不透明であるため(Moor & Trounson, 1977), 本実験では透明な卵胞のみから卵子を吸引した。しかし、小卵胞から採取されたCOCには高い割合で、コンパクトな卵丘細胞を有さない卵子が認められた。このことは、透明な卵胞にも閉鎖卵胞が存在することを示す。

しかし、閉鎖卵胞の初期の段階(Stage I atresia)では卵胞液中にわずかな浮遊物があるのみであるという報告(Braw & Tsafiriri, 1980)から考えると、透明な卵胞に含まれる閉鎖卵胞は、極めて初期の段階の閉鎖卵胞であろう。

卵胞から採取した卵子のうちコンパクトな卵丘細胞を有する卵子のGV Iの核相を示す割合は、卵胞の大きさ2mm以下区(22.5%), 2~5mm区(42.3%)および5mm以上区(85.7%)と、卵胞の大きさが増加するにつれて有意に上昇した(表2-2)。逆に、GV II以降の核相を示す卵子の割合は、卵子を採取する卵胞の大きさが減少するにつれて上昇し、2mm以下の卵胞から採取した卵子においては、77.5%という割合を示した(表2-2)。

また、Motlik & Fulka(1976)は、卵胞から採取した直後にGV II以降の核相を示す卵子は、閉鎖卵胞から採取した卵子であると報告している。このことと、大きな卵胞(5mm以

上)から採取したコンパクトな卵丘細胞を有する卵子は85.7%がGV Iであったこととを考え合わせても、大卵胞のほとんどは閉鎖卵胞ではないと考えられた。

Moor & Trounson(1977)も、卵丘細胞の退行は卵胞閉鎖の初期の段階 (Secondary atresia) では認められず、かなり進行した段階 (Tertiary atresia) で初めて変化が現われると報告している。

卵胞から採取した時、コンパクトな卵丘細胞を有する卵子の中には、GV II以降の核相を示す卵子が、2mm以下区で77.5%、2~5mm区で57.7%、5mm以上区で14.3%も観察された。したがって、卵子を取り囲んでいるコンパクトな卵丘細胞は卵子の核相がGV IからGV IIへ移行することには関与していないと推察された。

Tsafiri & Channing(1975)は、1~2mm、3~5mmおよび6~12mmの卵胞から卵子を採取し48時間培養すると、成熟卵率はそれぞれ15.6、54.8および80.1%となり、卵子採取に用いる卵胞の直径が大きくなるにしたがって成熟卵率は上昇することを明らかにした。また、Motlik *et al.*(1984)は、0.3~0.7mm、0.8~1.6mm、1.7~2.2mmおよび3~5mmの卵胞から採取したCOCを成熟培養し、それぞれ0、17、49および76%の卵子が成熟したことを報告した。本実験では卵胞の直径が大きくなるにしたがってGV Iの核相を示す卵子の割合は急激に上昇したが、GV II、GV III、GV IVの核相を示す卵子の割合は減少した(表2-2)。このことは、卵胞から採取した直後にGV Iを示す卵子のみが、培養後、GVBDを

誘起し、M IIまで進行する能力を有することを示すものと考えられる。したがって、GVBD誘起に関する実験を行う場合には、通常のブタ卵胞卵子の体外成熟に用いられる2~6mmの卵胞から採取した卵胞卵子よりも大きい卵胞から採取した卵胞卵子を用いることが必要と考えられる。

要 約

(1) ブタ卵子の核相の判定法として、共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)で観察する手法が有効か否かを調べる目的で、卵胞から採取した直後の卵子を、酢酸アルコールで6時間固定し、プロピジウムアイオダイド(PI)で染色してCLS Mで観察した。さらに、同一の卵子をアセトラクモイドで染色し、ホフマン・モジュレーション・コントラスト顕微鏡(HMCM)で観察して、両像を比較検討した。GV I, GV II, GV III, GV IV, ProM I, M I, A IおよびM IIのいずれの核相を示す卵子においても、CLS M像とHMCM像とが良く一致した。このことから、PIで染色しCLS Mで観察する方法はブタ卵子の核相判定法に有効であることが明らかにされた。

(2) 種々の大きさの卵胞(2mm以下, 2~5mm, 5mm以上)から採取した卵子を、酢酸アルコールで固定し、PIで染色してCLS Mで核相を判定した。2mm以下の卵胞から採取したCOCのうち、コンパクトな卵丘細胞を有する卵子は34.3%を占めていた。2mm以下の卵胞から採取し、コンパクトな卵丘細胞を有する卵子においては、GV IVを示す卵子の割合が最も高く(43.2%), 続いて、GV I (22.5%)およびGV III (22.5%)を示す卵子の割合が高い値を示した。2mm以下の卵胞から採取した卵子のうち、コンパクトな卵丘細胞を有さない卵子においては、23.8%の卵子が既にGVBDを起こしており、そのうち12.9%の卵子はM IIの核相を示した。

(3) 2~5mmの卵胞から採取した卵子のうち49.8%の卵子がコンパクトな卵丘細胞を有していた。これらの卵胞から採取

し、コンパクトな卵丘細胞を有する卵子においては、GV Iを示す卵子の割合が最も高く、続いて、GV IIおよびGV IVを示す卵子の割合が高い値を示した。2～5mmの卵胞から採取し、コンパクトな卵丘細胞を有さない卵子においては、25.9%の卵子が既にGVBDを起こしており、15.2%の卵子がM IIの核相を示した。

(4) 5mm以上の卵胞から採取したCOCのうち、コンパクトな卵丘細胞を有するCOCは、92.1%を占めていた。5mm以上の卵胞から採取し、コンパクトな卵丘細胞を有するCOCでは、85.7%の卵子がGV Iを示し、GV IIIおよびGV IVの核相を示す卵子は全く観察されなかった。

(5) 以上のことから、卵子を採取する卵胞の大きさが減少するにしたがって、GV Iの核相を示す卵子が著しく減少することが明確にされた。

第三章 卵丘細胞を除去したブタ卵子の卵核胞崩壊 (GVBD)および成熟について

第一節 序 論

Cross & Brinster(1970)は、マウス卵丘細胞卵子複合体(COC)を体外で培養した時の成熟卵率(87~97%)は、裸化卵子(DO)を培養した時の成熟卵率(47~77%)に比べて著しく高い値を示したことを報告した。また、Kennedy and Donahue(1969)は、ヒトCOCとDOを培養した時の成熟卵率を比較し、COCの成熟卵率が、DOのそれに比べて有意に高い値を示したことを、さらに、Sirard *et al.* (1988)は、ウシ卵子の減数分裂進行に対する卵丘細胞の役割を追求する目的で、COCとDOを体外で培養し、COCがDOに比べて有意に高い成熟卵率を示したことを報告した。これらの報告は、卵丘細胞から卵子へ成熟を促進する因子が放出されている、すなわち、卵丘細胞が卵子の核相の進行を促進させることを示唆している。

また、Guoliang *et al.*(1994)は、マウスのCOCを4および10時間フォルスコリン(アデニルサイクラーゼ活性化物質)添加培地で培養し、その後フォルスコリン無添加培地で24時間培養すると、DOよりもCOCの卵核胞崩壊(GVBD)卵率および成熟卵率が有意に促進されたことから、卵丘細胞から卵子へ成熟促進因子が放出されていると主張した。

一方、Petr *et al.*(1989)は、10 μ l液滴に10個のCOCを入れ、24時間培養した時、81%の卵子がGVBDを誘起するが、

10 μ l 液滴に20および40個のCOCを入れて培養した時には、GVBD誘起卵子の割合は著しく低下したことを認め、卵丘細胞がGVBDを抑制する因子を放出すると結論した。

このように、哺乳動物卵子の核相の成熟(減数分裂の進行)に対する卵丘細胞の役割は促進的に作用する結果と、抑制的に作用するという相反する結果が報告されている。したがって、哺乳動物卵子の減数分裂の進行に対する卵丘細胞の役割は明確にされていないと云える。

本章では、卵丘細胞が卵子の減数分裂の進行に及ぼす影響を明らかにする目的で、成熟培養開始後種々の時間にCOCから卵丘細胞を除去し、その裸化卵子を培養開始24および48時間後まで継続して培養し、卵子のGVBD卵率および成熟卵率を調べた。

第二節 材料および方法

卵巢の採取および搬送と卵子の吸引および検卵

卵巢の採取および研究室までの搬送は第二章の方法と同様に行なった。卵子を採取する卵胞の大きさに関しては、第二章において、様々な大きさの卵胞から卵子を吸引採取し、核相を調べた結果、卵胞の直径が上昇するにつれて、正常卵胞卵子であるGV I 卵子の割合が有意に増加することが明確にされたので、本章では、通常、卵子の採取に使用される2～6mmの卵胞より大きい3～8mmの卵胞から、10mlのシリンジおよび21G(5/8)の注射針を用いて吸引した。卵子を含む卵胞液は、20ml試験管に移し、その試験管を37℃に保温したウォーターバス内に5～10分放置した後、上澄を捨て、沈殿物を数mlのリン酸緩衝生理食塩水(Phosphate buffered saline, PBS, Nissui, 5%BSおよび0.1mg/mlカナマイシンを添加し、濾過滅菌したもの)と混合して、シャーレに移し、実体顕微鏡下でコンパクトな卵丘細胞を有する卵子のみを選別し、実験に供した。

成熟培養

COCをPBSで2回、成熟培地で1回洗浄した後、35mmディッシュ(CORNING)内のミネラルオイル(SQUIBB)で覆われた100 μ l成熟培地の液滴に卵子を15～20個ずつ入れ、39℃、5%CO₂、95%空気、湿度100%の条件で培養した。成熟培地には10 IU/ml hCG (帝国臓器)、10 IU/ml PMSG (帝国臓器)、

1 μ g/ml 17 β -エストラジオール(SIGMA), 50 μ g/mlゲンタマイシン(SIGMA)および10%FCS(GIBCO)を添加したTCM-199 (GIBCO, Earle's salts) を0.45 μ mフィルター(Millipore)で濾過滅菌して用いた. 17 β -エストラジオール(E₂)は, 予め100%エタノール中に溶解し, 褐色のバイアルビンに入れ, 蓋をしっかりと閉めた後, 更にパラフィルムで密封して, 5 $^{\circ}$ C保存しておいたものを, 培地作成時, 培地2.48mlとE₂溶液20 μ lとを混合して用いた.

COCからの卵丘細胞の除去

COCを卵丘細胞除去用溶液(0.1%ヒアルロニダーゼ[SIGMA]および50 μ g/mlゲンタマイシン添加TCM-199を濾過滅菌したもの)に37 $^{\circ}$ Cで1分間浸漬した後, COCを約20 μ lの溶液とともに2.5ml試験管に移し, 1.5分間ボルテックスで攪拌した. ボルテックスでの攪拌強度は4とした. 管壁に付着した卵子を底に落とすために, 卵丘細胞除去用溶液を少量加えた. その後, 裸化卵子を含む溶液を時計皿に移した. なお付着している卵丘細胞は, 先の直径が透明帯を含む卵子の直径とほぼ等しいパスツールピペットを用いて, 完全に除去した.

卵子のホールマウント標本の作成および核相の判定

卵丘細胞を有する卵子においては卵丘細胞を除去後, 裸化卵子においてはそのままホールマウント標本に供された.

ホールマウント標本の作成においては, 裸化卵子を酢酸ア

ルコール(酢酸：エタノール=1：3)で48時間以上室温で固定した後，カルノア液(エタノール：クロロホルム：酢酸=6：3：1)を流し，完全に脱脂されたのを確認して，アセトラクモイド(1%ラクモイド添加45%酢酸)を流した．卵子の周辺がわずかに赤く染まるのを確認した後，再びカルノア液を流し，全てのラクモイドを除去した．次に，アセトグリセロール(蒸留水：グリセリン：酢酸=3：1：1)とカルノア液とを入れ替えた後，カバーガラスの4辺にマニキュアを塗布し封入した．卵子の核相は位相差顕微鏡(10×40)で調べ，Hunter & Polge (1966)の方法に基づいて，GV，ProMI，MI，AI，TIおよびMIIに分類した．

実験計画

実験1 培養開始前における卵丘細胞の除去

試験1

培養開始前にCOCから卵丘細胞を除去し，これらの卵丘細胞除去卵子を24時間培養した．この区を0hcf+24h区とした．また，対照として卵丘細胞を除去せずにCOCを24時間培養した区(24h区)を設定した．

試験2

培養開始前にCOCから卵丘細胞を除去し，これらの卵丘細胞除去卵子を48時間培養した．この区を0hcf+48h区とした．また，対照としてCOCを48時間培養した区(48h区)を設定した．

実験2 培養8時間後における卵丘細胞の除去

試験1

8時間培養したCOCから卵丘細胞を除去し、新しい培地内に移して、さらに16時間培養した。この区を8hcf+16h区とした。新しい培地に移し替えることが卵子のGVBDに及ぼす影響を調べるために、対照区として、8時間培養したCOCを、卵丘細胞を除去せずに新しい培地に移し、さらに16時間培養した。この区を8h+16h区とした。また、培養開始8時間後に培地を変えないでCOCを培養開始から24時間後まで継続して培養した。この区を24h区とした。さらに、8時間培養した時の卵子の核相を調べるために、8時間培養した後、核相を判定した。この区を8h区とした。

試験2

8時間培養したCOCから卵丘細胞を除去し、新しい培地内に移して、さらに40時間培養した。この区を8hcf+40h区とした。新しい培地に移し替えることが卵子の成熟に及ぼす影響を調べるために、対照区として、8時間培養したCOCを、卵丘細胞を除去せずに新しい培地に移し、さらに40時間培養した。この区を8h+40h区とした。また、培養開始8時間後に培地を変えないでCOCを培養開始48時間後まで継続して培養した。この区を48h区とした。

実験3 培養16時間後における卵丘細胞の除去

試験1

16時間培養したCOCから卵丘細胞を除去し、新しい培地内に移して、さらに8時間培養した。この区を16hcf+8h区とした。新しい培地に移し替えることが卵子のGVBDに及ぼす影響を調べるために、対照区として、16時間培養したCOCを、卵丘細胞を除去せずに新しい培地に移し、さらに8時間培養した。この区を16h+8h区とした。また、培養開始16時間後に培地を変えないでCOCを培養開始24時間後まで継続して培養した。この区を24h区とした。さらに、16時間培養した時の卵子の核相を調べるために、16時間培養した後、核相を判定した。この区を16h区とした。

試験2

16時間培養したCOCから卵丘細胞を除去し、新しい培地内に移して、さらに32時間培養した。この区を16hcf+32h区とした。対照区として、新しい培地に移し替えることが卵子の成熟に及ぼす影響を調べるために、16時間培養したCOCを、卵丘細胞を除去せずに新たな培地に移し、さらに32時間培養した。この区を16h+32h区とした。また、培養開始16時間後に培地を変えないでCOCを培養開始48時間後まで継続して培養した。この区を48h区とした。

実験4 培養20時間後における卵丘細胞の除去

20時間培養したCOCから卵丘細胞を除去し、新しい培地内

に移して，さらに28時間培養した．この区を20 hcf + 28 h区とした．対照区として，新しい培地に移し替えることが卵子のGVBDおよび成熟に及ぼす影響を調べるために，20時間培養したCOCを，卵丘細胞を除去せずに，新しい培地に移し，さらに28時間培養した．この区を20 h + 28 h区とした．また，培養開始20時間後に培地を変えないでCOCを培養開始48時間後まで継続して培養した．この区を48 h区とした．さらに，20時間培養した後の卵子の核相を調べるために，20時間だけ培養したCOCの核相を判定した．この区を20 h区とした．

実験5 培養24時間後における卵丘細胞の除去

24時間培養したCOCから卵丘細胞を除去し，新しい培地内に移して，さらに24時間培養した．この区を24 hcf + 24 h区とした．対照区として，新しい培地に移し替えることが卵子のGVBDおよび成熟に及ぼす影響を調べるために，24時間培養したCOCを，卵丘細胞を除去せずに新しい培地に移し，さらに24時間培養した．この区を24 h + 24 h区とした．また，培養開始24時間後に培地を変えないでCOCを培養開始48時間後まで継続して培養した．この区を48 h区とした．さらに，24時間培養した時の卵子の核相を調べるために，24時間だけ培養したCOCの核相を判定した．この区を24 h区とした．

実験6 培養28時間後における卵丘細胞の除去

28時間培養したCOCから卵丘細胞を除去し，新しい培地内に移して，さらに20時間培養した．この区を28 hcf + 20 h区

とした。対照区として、新しい培地に移し替えることが卵子のGVBDおよび成熟に及ぼす影響を調べるために、28時間培養したCOCを、卵丘細胞を除去せずに新しい培地に移し、さらに20時間培養した。この区を28h+20h区とした。また、培養開始28時間後に培地を変えないでCOCを培養開始48時間後まで継続して培養した。この区を48h区とした。さらに、28時間培養した時の卵子の核相を調べるために、28時間だけ培養したCOCの核相を判定した。この区を28h区とした。

実験7 培養32時間後における卵丘細胞の除去

32時間培養したCOCから卵丘細胞を除去し、新しい培地内に移して、さらに16時間培養した。この区を32hcf+16h区とした。対照区として、新しい培地に移し替えることが卵子のGVBDおよび成熟に及ぼす影響を調べるために、32時間培養したCOCを、卵丘細胞を除去せずに新しい培地に移し、さらに16時間培養した。この区を32h+16h区とした。また、培養開始32時間後に培地を変えないでCOCを培養開始48時間後まで継続して培養した。この区を48h区とした。さらに、32時間培養した時の卵子の核相を調べるために、32時間だけ培養したCOCの核相を判定した。この区を32h区とした。

実験8 卵丘細胞で合成される卵成熟抑制因子は培地に分泌されるか否か

実験4および5において、20および24時間培養したCOCから卵丘細胞を除去し、その後、新しい培地に移してさらに28

および24時間培養した時，卵丘細胞を除去しなかった卵子に比べて，有意に高い成熟卵率を示した．このことから，卵丘細胞が，卵子の減数分裂の進行を抑制する因子を放出すると考えられた．そこで，実験8は卵丘細胞で合成される成熟抑制因子が培地内に分泌されるか否かを調べる目的で行った．

24時間培養したCOCを三等分し，最初のグループと二番目のグループのCOCは卵丘細胞を除去した後に，三番目のグループのCOCは卵丘細胞を除去せずにそのまま用いた．最初のグループの裸化卵子15個(対照区)は100 μ lのドロップに入れ24時間培養した．二番目のグループの裸化卵子15個(共培養DO区)と，三番目のグループのCOC15個(共培養COC区)とは一つのドロップ(100 μ l)内で24時間共培養した．

第三節 結 果

実験1 培養開始前における卵丘細胞の除去

培養開始前に卵丘細胞を除去し、24時間培養した時の卵子の核相を調べ、その結果を表3-1に示した。卵丘細胞を除去せずに24時間培養した区(24h区)では、約50%の卵子がGVを示したが、卵丘細胞を除去した後、24時間培養した区(0hcf+24h区)では、わずかに5.5%の卵子がGVに停止していたにすぎなかった。そして、24h区のGV卵子の割合と0hcf+24h区のそれとの間には有意差が認められた。MI, AIおよびTIの核相を示すそれぞれの卵子の割合は、卵丘細胞を除去した区が有意に高い値を示した。また、0hcf+24h区のMIIを示す卵子の割合および退行卵子(Deg卵子)の割合とも24h区より有意に高い値を示した。

次に、培養開始前に卵丘細胞を除去し、48時間培養した時の卵子の核相を調べ、その結果を表3-2に示した。卵丘細胞を除去せずに48時間継続して培養した区(48h区)のGVを示す卵子の割合は、卵丘細胞を除去して48時間培養した区(0hcf+48h区)の値に比べて有意に高い値を示した。ProMI, MI, AIおよびTIを示す各卵子の割合においては48h区と0hcf+48h区との間に有意差は認められなかった。また、MII卵子の割合においても両区間に有意差は認められなかったが、48h区のそれがかなり高かった。卵丘細胞を除去した区の卵子の20.8%は退行した。この割合は、卵丘細胞を除去しなかった区のものに比べて有意に高かった。

表3-1 培養開始前に卵丘細胞を除去することが卵子のGVBDに及ぼす影響

処理	供試 卵数	GV (%)	GVBD (%)					Deg. (%)
			総数	ProMI	MI	AI, TI	MII	
24h	110	56 (50.9) ^a	50 (45.5) ^a	24 (21.8) ^a	22 (20.0) ^a	2 (1.8) ^a	2 (1.8) ^a	4 (3.6) ^a
0hcf+24h	109	6 (5.5) ^b	90 (82.6) ^b	18 (16.5) ^a	46 (42.2) ^b	12 (11.0) ^b	14 (12.8) ^b	13 (11.9) ^b

GV : Germinal Vesivle GVBD : Germinal Vesicle Breakdown ProMI : Prometaphase I
 MI : Metaphase I AI : Anaphase I TI : Telophase I MII : Metaphase II Deg. : Degenerated
 a, b : 各縦列の異文字間に有意差あり (P<0.05)

表3-2 培養開始前に卵丘細胞を除去することが卵子の成熟に及ぼす影響

処理	供試 卵数	GV (%)	GVBD (%)					Deg. (%)
			総数	ProMI	MI	AI, TI	MII	
48h	113	7 (6.2) ^a	99 (87.6) ^a	7 (6.2) ^a	22 (19.5) ^a	3 (2.7) ^a	67 (59.3) ^a	7 (6.2) ^a
0hcf+48h	106	1 (0.9) ^b	83 (78.3) ^a	4 (3.8) ^a	23 (21.7) ^a	0 (0.0) ^a	56 (52.8) ^a	22 (20.8) ^b

GV : Germinal Vesivle GVBD : Germinal Vesicle Breakdown ProMI : Prometaphase I
 MI : Metaphase I AI : Anaphase I TI : Telophase I MII : Metaphase II Deg. : Degenerated
 a, b : 各縦列の異文字間に有意差あり (P<0.05)

実験2 培養8時間後における卵丘細胞の除去

培養開始8時間後に卵丘細胞を除去し、その後16時間培養した時の卵子の核相を調べ、その結果を表3-3に示した。卵丘細胞を除去する時の卵子の核相を調べるために、8時間培養した卵子を直ちに固定し、核相を観察した。ほとんどの卵子(99.0%)がGVで停止していた。培養8時間後に卵丘細胞を除去し、その後、新しい培地でさらに16時間培養した卵子(8hcf+16h区)においては、GV卵子は全く認められず、91.3%の卵子がGVBDを起こしていた。このGVBDを起こした卵子の割合は、卵丘細胞を除去せずに24時間継続して同一の培地で培養した卵子(24h区)および培養8時間後、卵丘細胞を除去せずに新しい培地に移し、さらに16時間培養した卵子(8h+16h区)の値と比較して、有意に高い値を示した。ProMI卵子の割合は、24h区において最も高い値を示したが、MI~TIの卵子の割合は、8hcf+16h区において有意に高かった。8hcf+16h区においては、4.3%の卵子がすでにMIIに達していた。Deg卵子は8h区を除くすべての区においてわずかながら観察され、8h+16h区のその割合と8hcf+16h区のそれとの間には有意差が認められた。

培養8時間後に卵子から卵丘細胞を除去し、その裸化卵子を新しい培地でさらに40時間培養した時(8hcf+40h区)、GV卵子は全く観察されなかった(表3-4)。このGV卵子の割合は8時間培養した後卵丘細胞を除去せずに新しい培地でさらに40時間培養した卵子(8h+40h区)のその値に比べて有意に低い値であった。ProMIを示す卵子の割合およびMI~TIを

表3-3 8時間培養した卵子から卵丘細胞を除去することが卵子のGVBDに及ぼす影響

処理	供試 卵数	GV (%)	GVBD (%)					Deg. (%)
			総数	ProMI	MI	AI, TI	MII	
8h	104	103 (99.0) ^a	1 (1.0) ^a	1 (1.0) ^a	0 (0.0) ^a	0 (0.0) ^a	0 (0.0) ^a	0 (0.0) ^a
24h	111	42 (37.8) ^b	64 (57.7) ^b	33 (29.7) ^b	27 (24.3) ^b	1 (0.9) ^a	3 (2.7) ^{ab}	5 (4.5) ^{bc}
8h+16h	114	57 (50.0) ^b	54 (47.4) ^b	13 (11.4) ^c	37 (32.5) ^b	1 (0.9) ^a	3 (2.6) ^{ab}	3 (2.6) ^{ab}
8hcf+16h	115	0 (0.0) ^c	105 (91.3) ^c	8 (7.0) ^c	71 (61.7) ^c	21 (18.3) ^b	5 (4.3) ^b	10 (8.7) ^c

GV : Germinal Vesicle GVBD : Germinal Vesicle Breakdown ProMI : Prometaphase I
MI : Metaphase I AI : Anaphase I TI : Telophase I MII : Metaphase II Deg. : Degenerated
a, b, c : 各縦列の異文字間に有意差あり (P<0.05)

表3-4 8時間培養した卵子から卵丘細胞を除去することが卵子の成熟に及ぼす影響

処理	供試 卵数	GV (%)	GVBD (%)					Deg. (%)
			総数	ProMI	MI	AI, TI	MII	
48h	120	3 (2.5) ^{ab}	109 (90.8) ^a	5 (4.2) ^a	18 (15.0) ^a	1 (0.8) ^a	85 (70.8) ^a	8 (6.7) ^a
8h+40h	113	9 (8.0) ^a	95 (84.1) ^a	8 (7.1) ^a	24 (21.2) ^a	0 (0.0) ^a	63 (55.8) ^b	9 (8.0) ^a
8hcf+40h	115	0 (0.0) ^b	104 (90.4) ^a	6 (5.2) ^a	18 (15.7) ^a	0 (0.0) ^a	80 (69.6) ^a	11 (9.6) ^a

GV : Germinal Vesicle GVBD : Germinal Vesicle Breakdown ProMI : Prometaphase I
MI : Metaphase I AI : Anaphase I TI : Telophase I MII : Metaphase II Deg. : Degenerated
a, b : 各縦列の異文字間に有意差あり (P<0.05)

示す卵子の割合は、いずれの区間にも有意差は認められなかったが、MIIを示す卵子の割合は、8h+40h区において、他の区(48h区, 8hcf+40h区)に比べて有意に低い値を示した。また、いずれの区においてもDeg卵子の割合は、著しく低く、いずれの区間にも有意差は認められなかった。

実験3 培養16時間後における卵丘細胞の除去

16時間培養した後、卵丘細胞を除去し、さらに8時間培養した時の卵子の核相を調べ、表3-5に示した。16時間培養しただけの区では(16h区)、78.4%の卵子がGVに停止したままであり、GVBDを起こした卵子の割合はわずかに、21.6%であった。16時間培養した後、卵丘細胞を除去し、さらに8時間培養した区(16hcf+8h区)のGV卵子の割合は、卵丘細胞を除去せずに24時間培養した他の2区(24h区, 16h+8h区)に比べて、有意に減少した。ProMI卵子の割合も、16hcf+8h区において、かなり低い値を示し、16h+8h区に比べて有意に低い値であった。MI卵子の割合は逆に、培養16時間後に卵丘細胞を除去したことによって有意に上昇し、58.6%という高い値を示した。一方、16hcf+8h区のDeg卵子の割合は、他のすべての区(16h区, 24h区, 16h+8h区)に比べて有意に高い値であった。

次に、16時間培養した後に卵丘細胞を除去し、さらに32時間培養した時の卵子の核相を調べ、表3-6に示した。卵丘細胞を除去した区(16hcf+32h区)のGV卵子の割合は最も低く、その値と卵丘細胞を除去せず、培地交換も行わなかった区

表3-5 16時間培養した卵子から卵丘細胞を除去することが卵子のGVBDに及ぼす影響

処理	供試 卵数	GV (%)	GVBD (%)					Deg. (%)
			総数	ProMI	MI	AI, TI	MII	
16h	111	87 (78.4) ^a	24 (21.6) ^a	19 (17.1) ^a	5 (4.5) ^a	0 (0.0) ^a	0 (0.0) ^a	0 (0.0) ^a
24h	100	31 (31.0) ^b	65 (65.0) ^{bc}	25 (25.0) ^{ab}	32 (32.0) ^b	4 (4.0) ^b	4 (4.0) ^b	4 (4.0) ^b
16h+8h	100	38 (38.0) ^b	54 (54.0) ^b	29 (29.0) ^b	22 (22.0) ^b	3 (3.0) ^{ab}	0 (0.0) ^a	8 (8.0) ^b
16hcf+8h	99	4 (4.0) ^c	76 (76.8) ^c	17 (17.2) ^a	58 (58.6) ^c	0 (0.0) ^a	1 (1.0) ^{ab}	19 (19.2) ^c

GV : Germinal Vesivle GVBD : Germinal Vesicle Breakdown ProMI : Prometaphase I
 MI : Metaphase I AI : Anaphase I TI : Telophase I MII : Metaphase II Deg. : Degenerated
 a, b, c : 各縦列の異文字間に有意差あり (P<0.05)

表3-6 16時間培養した卵子から卵丘細胞を除去することが卵子の成熟に及ぼす影響

処理	供試 卵数	GV (%)	GVBD (%)					Deg. (%)
			総数	ProMI	MI	AI, TI	MII	
48h	120	7 (5.8) ^a	93 (77.5) ^a	2 (1.7) ^a	6 (5.0) ^a	4 (3.3) ^a	81 (67.5) ^a	20 (16.7) ^{ab}
16h+32h	116	5 (4.3) ^{ab}	101 (87.1) ^a	1 (0.9) ^a	15 (12.9) ^b	0 (0.0) ^b	85 (73.3) ^a	10 (8.6) ^a
16hcf+32h	107	1 (0.9) ^b	83 (77.6) ^a	2 (1.9) ^a	9 (8.4) ^{ab}	0 (0.0) ^{ab}	72 (67.3) ^a	23 (21.5) ^b

GV : Germinal Vesivle GVBD : Germinal Vesicle Breakdown ProMI : Prometaphase I
 MI : Metaphase I AI : Anaphase I TI : Telophase I MII : Metaphase II Deg. : Degenerated
 a, b : 各縦列の異文字間に有意差あり (P<0.05)

(48h区)のそれとの間に有意差が認められた。ProMIを示す卵子の割合は、いずれの区も2%以下の著しく低い値を示したが、16h+32h区のMI卵子の割合は、最も高い値を示し、卵丘細胞を除去せず、培地も交換しなかった区(48h区)のそれとの間に有意差が認められた。いずれの区の成熟卵率も70%前後であり、各区間に有意差は認められなかった。また、16hcf+32h区のDeg卵子の割合は、16h+32h区のそれに比べて有意に高い値であった。

実験4 培養20時間後における卵丘細胞の除去

20時間培養した後、卵丘細胞を除去してさらに28時間培養した時の核相を表3-7に示した。20時間培養しただけの区(20h区)では、37.6%の卵子がGVBDを起こしていた。また、この区においてすでにDeg卵子の割合が1.8%観察された。20時間培養した後、卵丘細胞を除去し、さらに28時間培養した区(20hcf+28h区)においては、GV卵子は全く観察されず、このGV卵子の割合は、卵丘細胞を除去せずに培地を交換した区(20h+28h区)の割合より有意に低い値であった。ProMIおよびMIを示す卵子の割合は、48時間培養したいずれの区においても有意な差は認められなかったが、ProMI、MI、AIおよびTIを示す卵子の合計の割合は、20hcf+28h区(13.1%)が、48h区(20.1%)および20h+28h区(18.1%)よりかなり低い値を示した。20hcf+28h区の成熟卵率は著しく高い値を示し、48h区および20h+28h区のその値との間には有意差が認められた。また、Deg卵子の割合におけるいずれの

表3-7 20時間培養した卵子から卵丘細胞を除去することが
卵子のGVBDおよび成熟に及ぼす影響

処理	供試 卵数	GV (%)	GVBD (%)					Deg. (%)
			総数	ProMI	MI	AI, TI	MII	
20h	109	66 (60.6) ^a	41 (37.6) ^a	21 (19.3) ^a	17 (15.6) ^a	1 (0.9) ^a	2 (1.8) ^a	2 (1.8) ^a
48h	109	3 (2.8) ^b	99 (90.8) ^{bc}	2 (1.8) ^b	19 (17.4) ^a	1 (0.9) ^a	77 (70.6) ^b	7 (6.4) ^a
20h+28h	105	11 (10.5) ^c	88 (83.8) ^b	5 (4.8) ^b	14 (13.3) ^a	0 (0.0) ^a	69 (65.7) ^b	6 (5.7) ^a
20hcf+28h	115	0 (0.0) ^b	111 (96.5) ^c	1 (0.9) ^b	13 (11.3) ^a	1 (0.9) ^a	96 (83.5) ^c	4 (3.5) ^a

GV : Germinal Vesivle GVBD : Germinal Vesicle Breakdown ProMI : Prometaphase I
MI : Metaphase I AI : Anaphase I TI : Telophase I MII : Metaphase II Deg. : Degenerated
a, b, c : 各縦列の異文字間に有意差あり (P<0.05)

表3-8 24時間培養した卵子から卵丘細胞を除去することが
卵子のGVBDおよび成熟に及ぼす影響

処理	供試 卵数	GV (%)	GVBD (%)					Deg. (%)
			総数	ProMI	MI	AI, TI	MII	
24h	98	24 (24.5) ^a	68 (69.4) ^a	33 (33.7) ^a	27 (27.6) ^a	3 (3.1) ^a	5 (5.1) ^a	6 (6.1) ^a
48h	104	11 (10.6) ^b	83 (79.8) ^{ab}	9 (8.7) ^b	17 (16.3) ^{ab}	0 (0.0) ^{ab}	57 (54.8) ^b	10 (9.6) ^a
24h+24h	98	3 (3.1) ^c	84 (85.7) ^{bc}	3 (3.1) ^{bc}	22 (22.4) ^{ab}	1 (1.0) ^{ab}	58 (59.2) ^b	11 (11.2) ^a
24hcf+24h	125	1 (0.8) ^c	113 (90.4) ^c	2 (1.6) ^c	16 (12.8) ^b	0 (0.0) ^b	95 (76.0) ^c	11 (8.8) ^a

GV : Germinal Vesivle GVBD : Germinal Vesicle Breakdown ProMI : Prometaphase I
MI : Metaphase I AI : Anaphase I TI : Telophase I MII : Metaphase II Deg. : Degenerated
a, b, c : 各縦列の異文字間に有意差あり (P<0.05)

区間の差も有意ではなかった。

実験5 培養24時間後における卵丘細胞の除去

24時間培養した後、卵丘細胞を除去し、さらに24時間培養した時の核相を表3-8に示した。24時間培養しただけの区(24h区)のGVBD卵率は、69.4%であり、すでにDeg卵子も6.1%の割合で観察された。24時間培養した後、卵丘細胞を除去し、さらに24時間培養した区(24hcf+24h区)のGV卵子の割合は著しく低く、卵丘細胞を除去せずに培地交換も行なわなかった区(48h区)のそれとの間には有意差が認められた。24hcf+24h区のProMI卵子の割合はかなり低く、48h区のそれに比べて有意差が認められた。また、MI卵子の割合における48時間培養した3区間の差は有意ではなかったが、24hcf+24h区のMI卵子の割合が最も低い値を示した。ProMI、MI、AIおよびTIを示す卵子の合計の割合では、24hcf+24h区(14.4%)が、48h区(25.0%)および24h+24h区(26.5%)に比較して、有意に低い値を示した。逆に、成熟卵率は、48h区および24h+24h区に比較して、24hcf+24h区が、有意に高かった。しかし、Deg卵子の割合においては、いずれの区間にも有意差は認められなかった。

実験6 培養28時間後における卵丘細胞の除去

ほぼGVBDが終了していると思われる、培養開始28時間後に卵丘細胞を除去し、その後さらに20時間培養した時の核相を調べ、表3-9に示した。28時間培養しただけの区(28h区)

表3-9 28時間培養した卵子から卵丘細胞を除去することが
卵子のGVBDおよび成熟に及ぼす影響

処理	供試 卵数	GV (%)	GVBD (%)					Deg. (%)
			総数	ProMI	MI	AI, TI	MII	
28h	110	22 (20.0) ^a	84 (76.4) ^a	28 (25.5) ^a	48 (43.6) ^a	4 (3.6) ^a	4 (3.6) ^a	4 (3.6) ^a
48h	118	9 (7.6) ^b	103 (87.3) ^b	2 (1.7) ^b	17 (14.4) ^b	0 (0.0) ^b	84 (71.2) ^b	6 (5.1) ^{ab}
28h+20h	101	4 (4.0) ^{bc}	93 (92.1) ^b	1 (1.0) ^b	19 (18.8) ^b	0 (0.0) ^{ab}	73 (72.3) ^b	4 (4.0) ^{ab}
28hcf+20h	119	1 (0.8) ^c	105 (88.2) ^b	0 (0.0) ^b	28 (23.5) ^b	0 (0.0) ^b	77 (64.7) ^b	13 (10.9) ^b

GV : Germinal Vesivle GVBD : Germinal Vesicle Breakdown ProMI : Prometaphase I
MI : Metaphase I AI : Anaphase I TI : Telophase I MII : Metaphase II Deg. : Degenerated
a, b, c : 各縦列の異文字間に有意差あり (P<0.05)

表3-10 32時間培養した卵子から卵丘細胞を除去することが
卵子のGVBDおよび成熟に及ぼす影響

処理	供試 卵数	GV (%)	GVBD (%)					Deg. (%)
			総数	ProMI	MI	AI, TI	MII	
32h	117	19 (16.2) ^a	89 (76.1) ^a	13 (11.1) ^a	47 (40.2) ^a	7 (6.0) ^{ab}	22 (18.8) ^a	9 (7.7) ^a
48h	92	6 (6.5) ^b	82 (89.1) ^b	4 (4.3) ^a	10 (10.9) ^{bc}	2 (2.2) ^a	66 (71.7) ^b	4 (4.3) ^a
32h+16h	116	9 (7.8) ^b	104 (89.7) ^b	10 (8.6) ^a	10 (8.6) ^b	2 (1.7) ^a	82 (70.7) ^b	3 (2.6) ^a
32hcf+16h	112	0 (0.0) ^c	104 (92.9) ^b	8 (7.1) ^a	20 (17.9) ^c	12 (10.7) ^b	64 (57.1) ^c	8 (7.1) ^a

GV : Germinal Vesivle GVBD : Germinal Vesicle Breakdown ProMI : Prometaphase I
MI : Metaphase I AI : Anaphase I TI : Telophase I MII : Metaphase II Deg. : Degenerated
a, b, c : 各縦列の異文字間に有意差あり (P<0.05)

では、大半の卵子(76.4%)がGVBDを起こしており、そのうち、43.6%の卵子はMIにまで進行していた。卵丘細胞を除去し、その後さらに20時間培養した区(28hcf+20h区)では、GV卵子はわずかに1個(0.8%)観察されたのみで、この区のGV卵子の割合は、卵丘細胞除去および培地交換を行なわなかった区(48h区)のそれに比べて有意に低かった。ProMIおよびMI卵子の割合においては、48時間培養したいずれの区間にも有意差は認められなかったが、28hcf+20h区のMI卵子の割合は、卵丘細胞を除去せずに48時間培養した両区(培地交換区、培地否交換区)に比べてかなり高かった。成熟卵率は、28hcf+20h区において最も低い値を示したが、48時間培養した3区(48h区、28h+20h区、28hcf+20h区)間いずれの差も有意ではなかった。また、28hcf+20h区のDeg卵子の割合は、かなり高い値を示し、28h区との差は有意であった。

実験7 培養32時間後における卵丘細胞の除去

32時間培養した卵子から卵丘細胞を除去し、さらに16時間培養した卵子の核相を表3-10に示した。32時間培養しただけの区(32h区)では、76.1%の卵子がGVBDを誘起し、そのうち、40.2%の卵子がMIへ、18.8%の卵子がすでにMIIに達していた。卵丘細胞を除去し、さらに16時間培養した区(32hcf+16h区)にはGV卵子は全く観察されなかった。この区のGV卵子の割合は他の区(48h区、32h+16h区)のそれに比べて有意に低かった。32hcf+16h区のMI卵子の割合は、著しく高い値を示し、この値と、卵丘細胞を除去せずに培地

を交換した区(28h+20h区)のその値との差は有意であった。同様に、32hcf+16h区のA IおよびT Iを示す卵子の割合は、卵丘細胞を除去せずに48時間培養した両区(48h区、32h+16h区)に比べて、有意に高い値を示した。32hcf+16h区の成熟卵率は、他の区(48h区、32h+16h区)に比較して有意に低かった。Deg卵子の割合においてはいずれの区間にも有意差は認められなかった。

実験8 卵丘細胞から放出される卵成熟抑制因子は培地に分泌されるか否か

24時間培養した後、卵丘細胞を除去した裸化卵子と、卵丘細胞を除去していないCOCとを24時間共培養した時の卵子(共培養DO区、共培養COC区)と、24時間培養した後、卵丘細胞を除去し、COCと共培養せずに24時間培養した卵子(対照区)の核相を表3-11に示した。対照区と共培養DO区のGV卵子の割合は、卵丘細胞を除去しなかった区(共培養COC区)に比べて有意に低かった。ProM IおよびM Iの卵子の割合においては、いずれの区間にもほとんど差はなかったが、対照区および共培養DO区の成熟卵率は、高い値を示し、共培養DO区の成熟卵率と共培養COC区のそれとの差は有意であった。Deg卵子の割合にはいずれの区間にも有意差は認められなかった。

表3-11 卵丘細胞から放出される因子は培地を介して卵子の成熟を抑制しているのか否か

処理	供試 卵数	GV (%)	GVBD (%)					Deg. (%)
			総数	ProMI	MI	AI, TI	MII	
対照	110	1 (0.9) ^a	97 (88.2) ^{ab}	1 (0.9) ^a	15 (13.6) ^a	0 (0.0) ^a	81 (73.6) ^{ab}	12 (10.9) ^a
共培養	DO	0 (0.0) ^a	101 (92.7) ^a	1 (0.9) ^a	16 (14.7) ^a	0 (0.0) ^a	84 (77.1) ^a	8 (7.3) ^a
	COC	7 (6.8) ^b	81 (78.6) ^b	2 (1.9) ^a	16 (15.5) ^a	0 (0.0) ^a	63 (61.2) ^b	15 (14.6) ^a

GV : Germinal Vesicle GVBD : Germinal Vesicle Breakdown ProMI : Prometaphase I
 MI : Metaphase I AI : Anaphase I TI : Telophase I MII : Metaphase II Deg. : Degenerated
 a, b : 各縦列の異文字間に有意差あり (P<0.05)

第四節 考 察

培養開始前に卵丘細胞を除去し、24時間培養した区(0hcf+24h区)のGV卵子の割合は、すでに5.5%と著しく低い値を示したが、卵丘細胞を除去せずに24時間培養した区(24h区)のそれは50.9%とかなり高かった(表3-1)。また、培養開始前に卵丘細胞を除去し、48時間培養した区(0hcf+48h区)のGV卵子の割合は0.9%を示し、24時間だけ培養した区(0hcf+24h区)のそれに比べて4.6%しか低下しなかった。しかし、卵丘細胞を除去せずに48時間培養した区(48h区)のGV卵子の割合は6.2%であり、24時間だけ培養した区(24h区)のそれに比べて44.7%も低かった(表3-2)。

同様に、培養開始8時間後に卵丘細胞を除去し、培養開始24時間後まで培養した区(8hcf+16h区)のGV卵子の割合は、すでに0.0%と著しく低い値を示したが、卵丘細胞を除去せずに24時間培養した区(24h区)のそれは37.8%とかなり高かった(表3-3)。また、培養開始8時間後に卵丘細胞を除去し、培養開始48時間後まで培養した区(8hcf+40h区)のGV卵子の割合は0.0%を示し、24時間だけ培養した区(8hcf+16h区)のその割合も0.0%であった。しかし、卵丘細胞を除去せずに48時間培養した区(48h区)のそれは2.5%と24時間だけ培養した区(24h区)のそれに比べて35.3%も低かった(表3-4)。

さらに、培養開始16時間後に卵丘細胞を除去し、培養開始24時間後まで培養した区(16hcf+8h区)のGV卵子の割合は、すでに4.0%と著しく低い値を示したが、卵丘細胞を除去せずに24時間培養した区(24h区)のそれは31.0%とかなり高か

った(表3-5). また, 培養開始16時間後に卵丘細胞を除去し, 培養開始48時間後まで培養した区(16hcf+32h区)のGV卵子の割合は0.9%を示し, 24時間だけ培養した区(16hcf+8h区)に比べて, 3.1%減少しただけだったが, 卵丘細胞を除去せずに48時間培養した区(48h区)のそれは5.8%と24時間だけ培養した区(24h区)のそれに比べて25.2%も低かった(表3-6).

このように, 24時間培養した時は, 卵丘細胞除去区のGV卵子の割合と対照区のそれとの間に大差が認められたが, 48時間培養した時には, その差はほとんど認められなかった. これらのことから, 卵丘細胞の除去はGVBDを早期に誘起させると考えられる. すなわち, 卵子から卵丘細胞を除去することによって, 卵丘細胞で合成されたGVBDを抑制する因子が卵子に移行しなくなり, 卵子のGVBDが早期に誘起されたと考えられる.

Dekel & Beer (1980)も, 培養開始前にラットCOCから卵丘細胞を除去し, ホルモン無添加培地で培養した時, GVBDはCOCのそれより早い時期に起きたことを報告している.

また, 培養開始, 0, 8, 16, 20, 24, 28および32時間後に卵丘細胞を除去し, その後培養開始48時間後まで培養した時, 卵丘細胞を除去しなかった区に比べて卵丘細胞を除去した区は, 有意に低いGV卵子の割合を示した(表3-2, 4, 6, 7, 8, 9, 10). このことは, 卵丘細胞を除去することが, GV卵子の割合を減少させる, すなわち, 上述した通り, 卵子から卵丘細胞を除去することによって, 卵丘細胞で合成されたGVBDを抑制する因子が, 卵子に移行しなくなり, 卵子

のGVBDが誘起されたものと推察される。

卵丘細胞で合成されるGVBDを抑制する因子に関連して、Vanderhyden & Armstrong (1989)はラットのCOCとDOを培養し、COCよりもDOが、2～4時間早期にGVBDが起きたことを認め、COCのGVBDの遅れは、卵丘細胞で合成されたcAMPが卵子へ移行し、その結果、卵子内cAMP濃度が上昇することによって、卵子のGVBDが抑制されたためと考察した。

しかし、Racowsky(1985)は、ブタCOCをフォルスコリン添加培地で24時間培養すると、卵子内cAMP濃度が上昇するとともにGVBDも抑制されたが、フォルスコリン添加培地で48時間培養すると、卵子内cAMP濃度は上昇したが、GVBDが誘起されたことから、ブタ卵子のGVBDは、cAMP濃度に依存しないと結論した。

培養開始20および24時間後に卵丘細胞を除去し、さらに28および24時間培養した時、卵丘細胞を除去せずに48時間培養した卵子に比べて、成熟卵率が有意に上昇した(表3-7, 8)。したがって、成熟抑制因子は培養20～24時間の間に放出されると推察された。Zheng & Sirard (1992)も、培養開始24時間後に卵丘細胞を除去し、さらに24時間培養すると、卵丘細胞を除去しなかった卵子に比べて、有意に成熟卵率が上昇したことを報告している。

培養開始20および24時間後に卵丘細胞を除去することによって、GVBD卵率も有意に上昇した(表3-7, 8)ことから、卵丘細胞を除去することによって、成熟卵率が上昇した原因の

一つとして、GVBD卵率が増加したことが考えられる。

さらに、培養開始20および24時間後に卵丘細胞を除去することによって、ProMIからTIの卵子の合計の割合が減少した(表3-7, 8)。このことから、卵丘細胞除去卵子の成熟卵率上昇の二つ目の理由は、ProMIからTIまでに停止した卵子の割合が減少したことによるものと思われる。

卵丘細胞で生産される成熟抑制因子が培地に放出されるか否かを調べた結果、DOと共培養したCOCの成熟卵率は、共培養したDOおよび、共培養しなかったDOの成熟卵率に比べて有意に低い値を示した(表3-11)。また、DOをCOCと共培養しても、共培養しない時とほぼ同様の成熟卵率であった(表3-11)。これらのことから、卵丘細胞から放出されている成熟抑制因子は培地を介して卵子に影響を及ぼしているのではなく、ギャップ結合を介して卵子の成熟卵率を減少させていることが示唆された。

Tsafiriri & Channing (1975)は、ブタ卵胞卵子を小卵胞、中卵胞および大卵胞から採取した顆粒層細胞と共培養すると、GVBDが著しく抑制されたことを報告した。佐藤ら(1980)は、ブタCOCを壁顆粒層細胞に付着させた状態で培養すると、COCのみを培養した時に比べて、有意にGVBD卵率が減少したことを認めた。Kalous *et al.* (1993)は、ウシCOCのみを8時間培養した時、82%の卵子がGVBDを起こしていたが、COCをブタ壁顆粒層細胞と付着させた状態で8時間培養すると、GVBD卵率は16%まで低下したことを報告した。また、Wert & Larsen(1989)はフリーズ・フラクチャー法を用いて、

ラットCOCのギャップ結合とGVBDとの関係を検討し、卵丘細胞間ギャップ結合の切断の直後にGVBDが起こることを見だし、卵子のGVBDは、卵丘細胞間ギャップ結合の切断により、顆粒層細胞からの成熟を抑制する因子が卵子へ移行しなくなることによって誘起されると結論した。これらのことは、顆粒層細胞が卵子の成熟抑制因子を産生しており、この因子はギャップ結合を通じて卵子へ移行していることを示している。

本章の実験には、壁顆粒層細胞の付着しないCOCを使用したもので、卵子の成熟抑制因子の生産は顆粒層細胞で合成されたものではないことは明らかである。したがって、前述の顆粒層細胞で合成されている成熟を抑制する因子と本実験において明確にされた卵丘細胞で合成されている成熟抑制因子とは異なっているものと考えられる。

また、Petr *et al.* (1989)は、10 μ l液滴で20個以上のCOCを培養すると、GVBDは有意に抑制されたことから、卵丘細胞から培地中へGVBDを抑制する因子が放出されていると結論した。しかし、本実験において、卵丘細胞で合成された成熟抑制因子は、培地を介して卵子の成熟を抑制しているものではないと考えられた(表3-11)ことから、本実験で示された成熟抑制因子は、Petr *et al.* (1989)の報告したGVBDを抑制する因子とも異なるものと推察される。

培養開始20および24時間後に卵丘細胞を除去し、さらに28および24時間培養した時、卵丘細胞を除去せずに48時間培養した卵子に比べて、成熟卵率が有意に上昇した(表3-7, 8)。

しかし、これらの卵丘細胞を除去した卵子が正常に受精し、その後、正常に発生するか否かは明らかではない。実際、成熟培養したCOCが、成熟培養したDOより、有意に雄性前核形成率、分割率および桑実胚への発生率が高かったという報告がある(Sirard & First, 1988 ; Ocampo *et al.*, 1993 ; Zhang *et al.*, 1995)。したがって、培養開始後様々な時間に卵丘細胞を除去し、48時間後まで培養した卵子に媒精して、高い雄性前核形成率および発生率を得るためには成熟のどの段階まで卵丘細胞が必要なのか検討する必要があると思われる。

要 約

- (1) 卵丘細胞が卵子の減数分裂の進行に及ぼす影響を明らかにする目的で、成熟培養開始後種々の時間にCOCから卵丘細胞を除去し、その裸化卵子を培養開始24および48時間後まで継続して培養し、卵子のGVBD卵率および成熟卵率を調べた。
- (2) COCを0, 8および16時間培養した後、COCから卵丘細胞を除去し、さらに培養開始24時間後まで培養した時、対照区の卵丘細胞を除去しないで培養した卵子(45.5, 57.7, 54.0%)に比べて有意に高いGVBD卵率(82.6, 91.3, 76.8%)を示した。これらのことから、卵丘細胞を除去することは、GVBDを促進させる、すなわち卵丘細胞からGVBDを抑制する因子が生産されていると推察された。
- (3) COCを0, 8, 16, 20, 24, 28および32時間培養した後、COCから卵丘細胞を除去し、その後培養開始48時間後まで培養した時、卵丘細胞を除去しなかった区(6.2, 8.0, 5.8, 10.5, 10.6, 7.6, 7.8%)に比べて卵丘細胞を除去した区は、有意に低いGV卵子の割合を示した(0.9, 0.0, 0.9, 0.0, 0.8, 0.8, 0.0%)。このことから、卵丘細胞付着状態で培養した時には誘起されない卵子のGVBDが、卵丘細胞を除去して培養すると、誘起されることが明らかにされた。
- (4) COCを20および24時間培養した後、COCから卵丘細胞を除去し、さらに28および24時間培養した時、卵丘細胞を除去せずに48時間培養した卵子に比べて、成熟卵率が有意に上

昇した。したがって、成熟抑制因子は培養20～24時間の間に放出されると推察された。

(5) COCを20および24時間培養した後、COCから卵丘細胞を除去し、さらに28および24時間培養した時、卵丘細胞を除去しなかった卵子に比べて、卵丘細胞を除去した卵子において有意に高いGVBD卵率(20時間：83.8%および96.5%；24時間：79.8%および90.4%)および有意に低いProMIからTIの卵子の合計の割合(20時間：20.1%および13.1%；24時間：25.0%および14.4%)を示した。したがって、培養開始20および24時間後に卵丘細胞を除去することによる成熟卵率の上昇は、GVBD卵率の増加およびProMIからTIの卵子の合計割合の減少によるものと考えられた。すなわち卵丘細胞から、GVBDを抑制する因子と共にProMIからTIへの減数分裂の進行を抑制する因子も放出されていることが推察された。

(6) COCを24時間培養した後、COCから卵丘細胞を除去し、裸化卵子(DO)15個とCOC15個とを100 μ l液滴で24時間共培養した。共培養したDOの成熟卵率(77.1%)は、共培養したCOC(61.2%)に比べて有意に高かった。また、共培養したDOの成熟卵率(77.1%)は、対照区の共培養しないDOの成熟卵率(73.6%)とほぼ同じ値を示した。したがって、卵丘細胞で合成される成熟抑制因子は、培地に放出されずギャップ結合を介して卵子の成熟を抑制しているものと考えられた。

(7) 以上の結果から、卵丘細胞において卵子の成熟抑制因子が合成されており、この因子は培地を介して卵子に影響を

及ぼしているのではなく，ギャップ結合を介して卵子の成熟卵率を減少させていることが示唆された。

第四章 ブタ卵胞卵子の卵核胞崩壊(GVBD)に対する卵丘細胞 間ギャップ結合の役割

第一節 序 論

第三章において、卵丘細胞が卵子の減数分裂の進行に及ぼす影響を調べた結果、培養開始0, 8, 16, 20, 24, 28および32時間後に卵丘細胞を除去し、その後培養開始48時間後まで培養した時、卵丘細胞を除去しなかった区に比べて有意に低いGV卵子の割合を示した。このことから、卵丘細胞において卵核胞崩壊(GVBD)を抑制する因子が合成されていると考えられた。

また、培養開始24時間後に卵丘細胞を除去した裸化卵子(DO)をさらに、24時間培養すると、卵丘細胞を除去しなかった区に比べてかなり低いGV卵子の割合を示したが、培養開始24時間後に卵丘細胞を除去したDOをさらに、卵丘細胞卵子複合体(COC)と24時間共培養しても、共培養しなかったDOとほぼ同じGV卵子の割合を示した。このことから、卵丘細胞で合成されたGVBDを抑制する因子は、卵丘細胞間および卵丘細胞-卵子間ギャップ結合を通じて、卵子へ移行することによって、卵子のGVBDが抑制されていると考えられた。したがって、これらの細胞間ギャップ結合の切断により、GVBDを抑制する因子が卵丘細胞から卵子へ移行しなくなることによって、卵子のGVBDが引き起こされると推察される。

Motlik *et al.* (1991) は壁顆粒層細胞に付着したブタCOCと壁顆粒層細胞の付着していないCOCをホルモン無添加培地

で24時間培養すると、GVBDを誘起した卵子の割合はそれぞれ4および96%であり、壁顆粒層細胞が、卵子のGVBDを著しく抑制することを明らかにした。

また、Kalous *et al.* (1993)は、ブタ壁顆粒層細胞と付着させたウシCOCと付着させていないウシCOCを8時間培養したところ、壁顆粒層細胞と付着させず、COCのみを培養した時のGVBD卵率は82%であったが、壁顆粒層細胞と付着させることによって、GVBD卵率は16%にまで減少したことを報告した。

これらの報告から、顆粒層細胞からもGVBDを抑制する因子が放出されており、その因子は顆粒層細胞-卵丘細胞間、卵丘細胞間および卵丘細胞-卵子間ギャップ結合を通して卵子へ移行しているものと考えられる。

体外で成熟される哺乳動物卵子においてGVBDを抑制する因子の流れが、顆粒層細胞-卵丘細胞間、卵丘細胞間および卵丘細胞-卵子間ギャップ結合のいずれかで切断されるとGVBDが誘起される。そこで、どのギャップ結合の切断が、GVBDの引き金かに関してラットおよびマウスを用いて検討されている。

たとえば、Dekel & Beer (1980) および Dekel *et al.* (1981)はラットを用いて、卵丘細胞-卵子間ギャップ結合の切断が卵子のGVBDの引き金と主張した。また、Salustri & Siracusa (1983)およびSchultz *et al.* (1983)はマウスを用いて、Larsen *et al.* (1986, 1987)はラットを用いて、卵丘細胞間ギャップ結合の切断がGVBDの引き金と推論した。こ

のようにラットやマウスCOCにおいては，ギャップ結合の切断とGVBDとの関係はある程度調べられているが，体外で培養するブタCOCのGVBD誘起とギャップ結合の切断との関係はほとんど検討されていない。

そこで，本章では，蛍光色素であるルシファーイエローを卵子に注入する方法を用いて，ブタ卵子のGVBDと細胞間ギャップ結合の切断との関係を明らかにしようとした。

第二節 材料および方法

卵巢の採取および搬送，卵子の吸引採取および検卵は，第二章の方法と同様に行なった。

ホールディング・ピペットおよびインジェクション・ピペットの作成

ホールディング・ピペットおよびインジェクション・ピペットのいずれを作成する時も，まずプラー(MICROPIPETTE PULLER, MODEL PC-84, Leica)を用いて，キャピラリーガラス管を引き伸ばした。ホールディング・ピペット作成時には，この引き伸ばしたピペットの外径 $150\sim 200\mu\text{m}$ の位置を，フォージ(WILD M3B, Leica)を用いて切断し，さらに，この切断面を溶融し，ピペットの内径を $100\sim 130\mu\text{m}$ に調整した。

インジェクション・ピペット作成時には，引き伸ばしたピペットの先を，フォージに作成したガラス玉に強く当てて破砕し，さらにベベラー(MICROPIPETTE BEVELER MODEL BV-10, Leica)を用いて，約 35° になるように研磨した。このピペットの先端をフッ化水素に2秒間浸漬して，ガラス管壁を薄くした。外径は $10\sim 15\mu\text{m}$ になるように調整した。これらのホールディング・ピペットおよびインジェクション・ピペットをシリコン(silicofilm, ナカライ)処理し，アルコールで洗浄した。

インジェクション

マイクロマニピュレーター(Leitz)およびホフマン・モジュレーション・コントラスト顕微鏡 (Hoffmann Modulation Contrast Microscopy, Modulation Optics)を用いて, 卵丘細胞に囲まれた卵子内に, 10mM HEPES 添加PBSに10%ルシファーイエロー(SIGMA)を溶解させたルシファーイエロー溶液の4pl/oocyteを注入した. ホールディング・ピペットおよびインジェクション・ピペットは, マイクロインjekター (Microinjector, CIJ-1, SHIMADZU)のそれぞれポート2およびポート1に接続し, インジェクション圧力およびインジェクション時間はそれぞれ20~30KPaおよび0.05秒の条件で注入を行なった. インジェクション量は, オイル中にインジェクションした液滴を作り, その半径から算出した. インジェクションおよびギャップ結合の切断状態の観察は, いずれも5%BS 添加PBS中で行なった.

卵丘細胞間ギャップ結合の切断状態の観察

ルシファーイエロー溶液を注入したCOCをPBSで数回洗浄した後, スライドガラスとカバーガラス間にマウントし, マニキュアで封入した. 注入して10~15分間後に共焦点レーザー顕微鏡 (Confocal Laser Scanning Microscopy, ACAS 570, MERIDIAN)を用いて, ルシファーイエローの卵丘細胞への移行状態を励起波長488nmで観察した. 測定波長は575nm以下のショート・パス・ダイクロイックミラー (short pass

dichroic mirror)を通過した515~545nmとした.ピンホールは100とし,対物レンズは100倍の油浸を用いた.この設定条件でスキャンした時の光学的切片の厚さは,14.5 μ mであった.

ルシファーイエローの卵丘細胞への移行状態は,以下の4型に分類した.

- I型:ルシファーイエローが全ての卵丘細胞に移行したCOC(図4-1a, b)
- II型:ルシファーイエローが内側から2層以上へは移行していたが,全ての卵丘細胞へは移行しなかったCOC(図4-1c, d)
- III型:ルシファーイエローが最内側1層の卵丘細胞にのみ移行したCOC(図4-1e, f)
- IV型:ルシファーイエローが卵丘細胞へ全く移行しなかったCOC(図4-1g, h)

実験計画

実験1 100 μ l液滴で培養した卵丘細胞卵子複合体(COC)について

0, 8, 16, 24, 32, 40および48時間培養した後,それぞれの区の半数のCOCにルシファーイエローを注入し,ギャップ結合の切断状態を観察した.各区における残りの半数のCOCは裸化させ,ホルマウント標本を作成し,核相を判定した.培養方法およびホルマウント標本の作成は,第三章

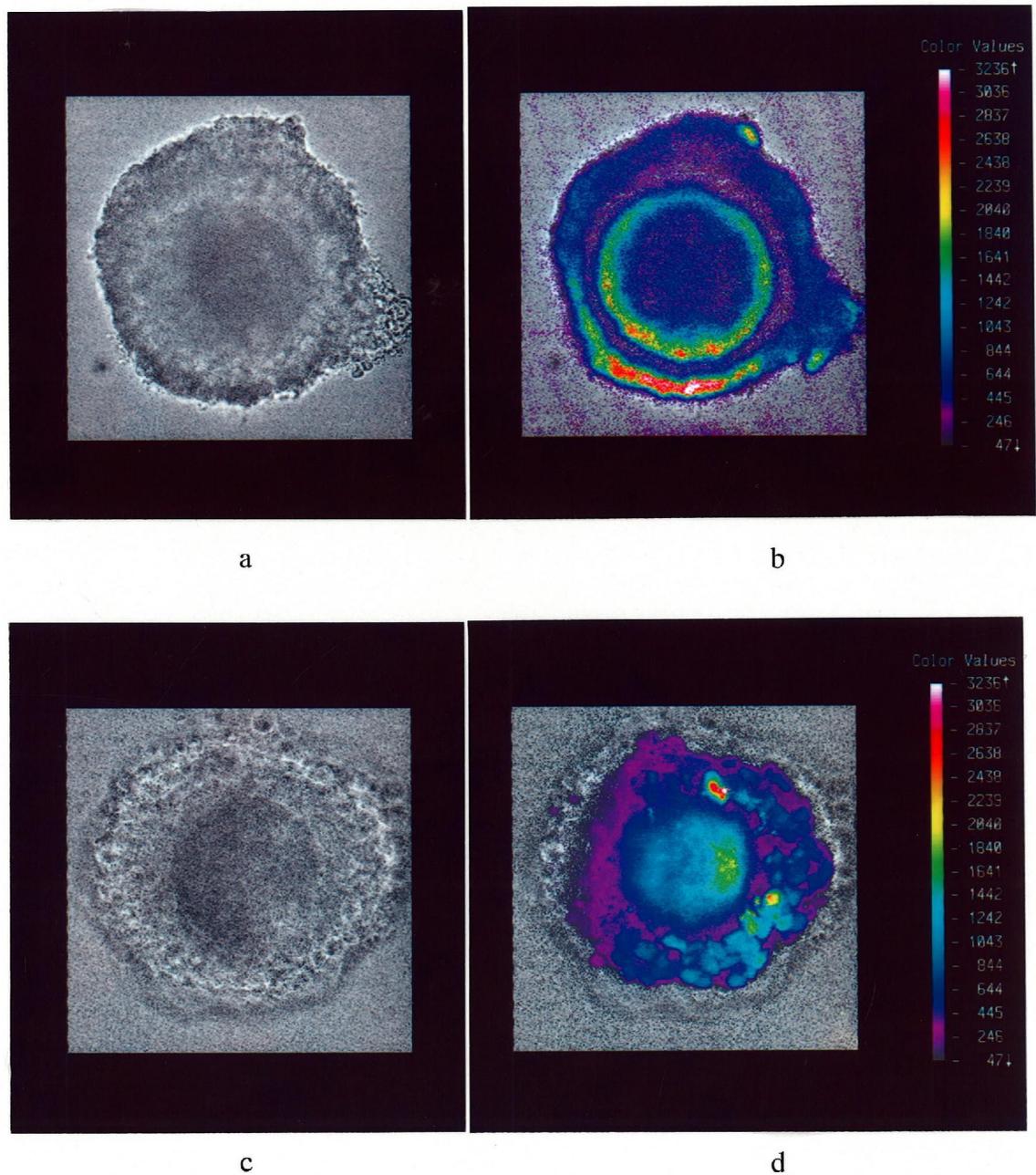


図4-1 ルシファーイエローの卵丘細胞への移行状態によるCOCの分類(IおよびII型)
 上段：a,bはI型を示した同一の卵子，aは光学顕微鏡像で，bは蛍光像を示す。(×227)
 下段：c,dはII型を示した同一の卵子，cは光学顕微鏡像で，dは蛍光像を示す。(×190)

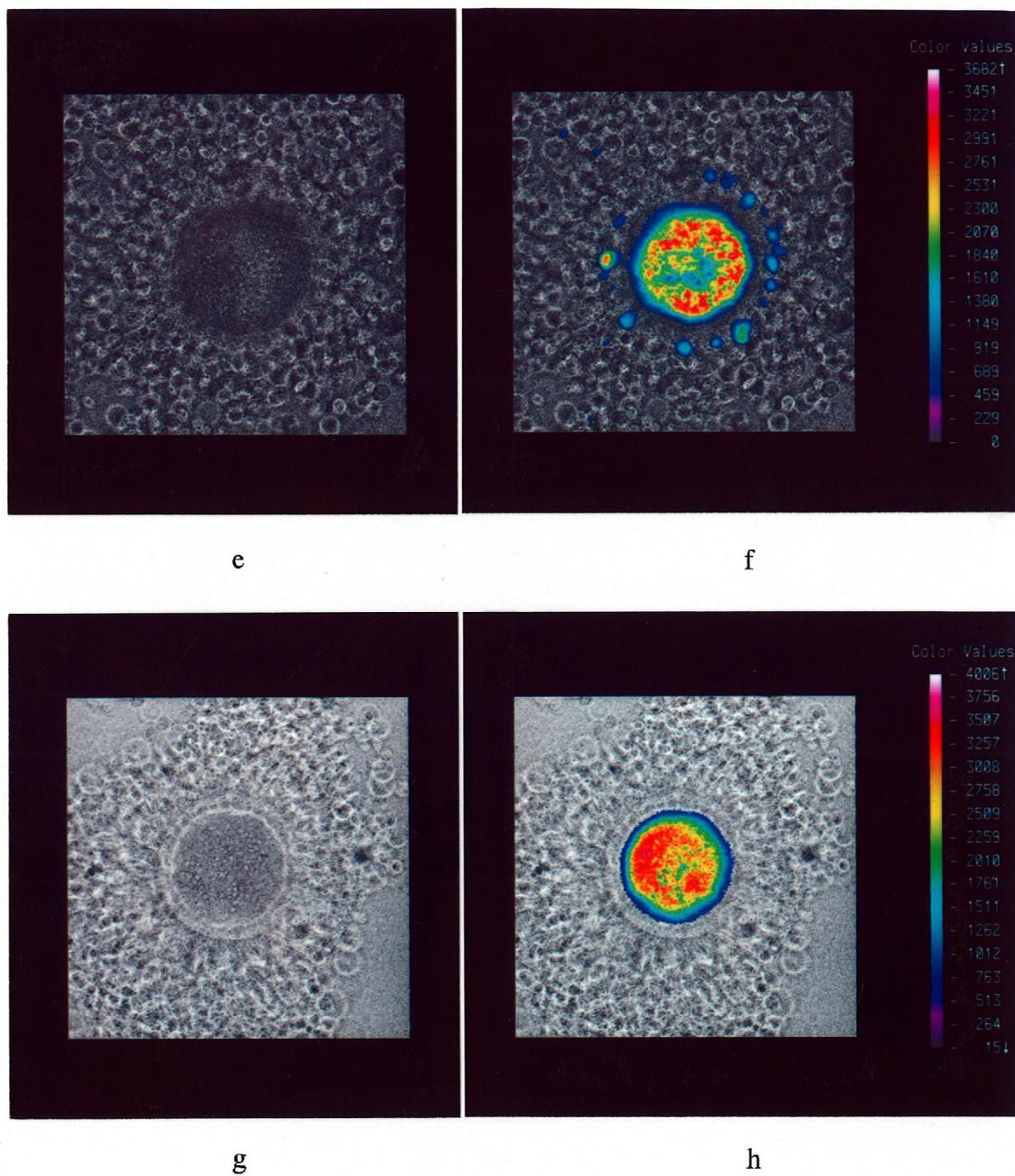


図4-1 ルシファーイエローの卵丘細胞への移行状態によるCOCの分類(ⅢおよびⅣ型)
 上段：e, fはⅢ型を示した同一の卵子，eは光学顕微鏡像で，fは蛍光像を示す．(×164)
 下段：g, hはⅣ型を示した同一の卵子，gは光学顕微鏡像で，hは蛍光像を示す．(×145)

の方法に準じた。

各区における，Ⅱ型，Ⅲ型およびⅣ型COCの合計の割合，Ⅲ型およびⅣ型COCの合計の割合，Ⅳ型COCの割合およびGVBD卵率をそれぞれ算出した。それらの割合を $\arcsin\sqrt{\%}$ の式に当てはめて得られた値を用いて，各割合間における相関を求めた。それぞれの相関係数からt-検定を行い， $P < 0.05$ を有意とした。

実験2 微小液滴(10 μ l)で培養した卵丘細胞卵子複合体(COC)について

10 μ l液滴で多数のCOCを培養するとGVBDが抑制される(Petr *et al.*, 1989)。そこで，10 μ l液滴で様々な数のCOCを培養し，卵丘細胞間ギャップ結合の切断とGVBDとの関係を追及した。

微小液滴(10 μ l)で1，3，6，10，20および40個のCOCを24時間培養した後，各区の半数のCOCにルシファーイエローを注入し，ギャップ結合の切断状態を観察した。各区の残りの半数のCOCは，ホルマウント法による核相の判定に使用した。培養方法およびホルマウント標本の作成は，第三章の方法に準じた。

第三節 結 果

実験1 100 μ l液滴で培養した卵丘細胞卵子複合体(COC)について

0および8時間培養したCOCの卵子内にルシファーイエローを注入し、ギャップ結合の切断状態を調べた。90%以上のCOCがI型を示し、III型およびIV型のCOCは全く観察されなかった(表4-1)。培養16時間後のCOCにおいては、I型のCOCの割合は著しく減少し、その値と培養8時間後のその割合との間には有意差が認められた。また、培養16時間後はIII型およびIV型のCOCが初めて観察されるようになったが、それらの割合は著しく低かった。また、培養16時間後のII型COCの割合は最高値を示し、この値と、培養8時間後のその値との間には有意差が認められた。培養24時間後においては、II型のCOCの割合が培養16時間後に比べて有意に減少し、IV型COCの割合が培養16時間後に比べて有意に増加した。さらに、培養時間が32時間以上になるとI型COCは全く観察されず、IV型COCの割合は培養時間が長くなるにしたがって有意に増加した。また、培養48時間後には全てのCOCがIV型を示した。

次に、各培養時間におけるGVBD卵率を調べた結果を表4-2に示した。培養開始0および8時間後の卵子のほとんどはGV期であった。GVBDは培養開始16時間後から始まり、培養開始32時間後まで、GVBD卵率は急激に上昇した。さらに培養時間が長くなると、GVBD卵率は徐々に増加し、培養48時間

表4-1 様々な時間培養した時の、各ギャップ結合切断状態を示すCOCの割合の推移

培養時間 (hr)	供試卵数	ギャップ結合の切断状態により分類された各型 (%)			
		I	II	III	IV
0	100	91(91.0) ^a	9 (9.0) ^a	0 (0.0) ^a	0 (0.0) ^a
8	71	65(91.5) ^a	6 (8.5) ^a	0 (0.0) ^a	0 (0.0) ^a
16	68	12(17.6) ^b	42(61.8) ^b	8(11.8) ^{bd}	6 (8.8) ^b
24	77	6 (7.8) ^b	28(36.4) ^c	12(15.6) ^{bc}	31 (40.3) ^c
32	72	0 (0.0) ^c	4 (5.6) ^{ad}	18(25.0) ^c	50 (69.4) ^d
40	63	0 (0.0) ^c	2 (3.2) ^{ad}	3 (4.8) ^{ad}	58 (92.1) ^e
48	66	0 (0.0) ^c	0 (0.0) ^d	0 (0.0) ^a	66(100.0) ^f

a, b, c, d, e, f: 各縦列の異文字間に有意差あり (P<0.05)

I型: ルシファーイエローが全ての卵丘細胞に移行したCOC

II型: ルシファーイエローが内側から2層以上へは移行していたが、全ての卵丘細胞へは移行しなかったCOC

III型: ルシファーイエローが最内側1層の卵丘細胞にのみ移行したCOC

IV型: ルシファーイエローが卵丘細胞へ全く移行しなかったCOC

表4-2 様々な時間培養したCOCにおけるGVBD卵率の推移

培養時間 (hr)	供試卵数	GVBD卵数	GVBD卵率 (%)
0	65	2	3.1 ^a
8	121	1	0.8 ^a
16	128	29	22.7 ^b
24	105	70	66.7 ^c
32	125	105	84.0 ^d
40	73	65	89.0 ^{de}
48	124	116	93.5 ^e

GVBD: Germinal Vesicle breakdown

a, b, c, d, e: 異文字間に有意差あり (P<0.05)

後には93.5%を示した。この培養開始48時間後のGVBD卵率と培養開始32時間後のその値との差は有意であった。

これまでの結果をもとに、培養時間に伴うGVBD卵率の推移、Ⅱ、ⅢおよびⅣ型を示したCOCの合計が全COCの中で占める割合の推移、ⅢおよびⅣ型を示したCOCの合計が全COCの中で占める割合の推移およびⅣ型を示したCOCの割合の推移を図4-2に示した。Ⅱ、ⅢおよびⅣ型を示したCOCの合計の割合は、卵子内に注入されたルシファーイエローが少なくとも最外層の卵丘細胞へは移行しなかったCOCの割合を示す。ⅢおよびⅣ型COCの合計の割合は、卵子内に注入されたルシファーイエローが少なくとも内側から2層以上の卵丘細胞へは移行しなかったCOCの割合を示す。Ⅳ型COCの割合は卵子内に注入されたルシファーイエローが全く卵丘細胞へ移行しなかったCOCの割合を示す。

GVBD卵率とⅡ、ⅢおよびⅣ型を示すCOCの合計割合との相関($r=0.96$, $P<0.01$)、GVBD卵率とⅢおよびⅣ型を示すCOCの合計割合との相関($r=0.99$, $P<0.01$)およびGVBD卵率とⅣ型を示すCOCの割合との相関($r=0.97$, $P<0.01$)はいずれも有意であった。そのうち、GVBD卵率とⅢおよびⅣ型を示すCOCの合計割合との相関が最も高い有意性を示した。

さらに、GVBDが開始された培養開始16時間後からGVBDがほぼ終了していると思われる培養32時間後まで、Ⅳ型を示すCOCの割合はGVBD卵率よりも常に低い値を示した。

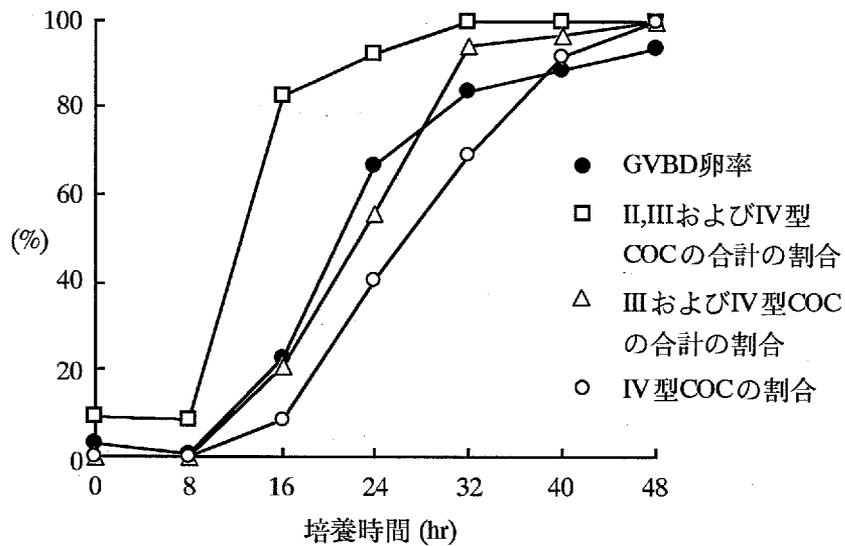


図4-2 様々な時間培養したCOCにおけるギャップ結合の切断とGVBDとの関係

表4-3 ギャップ結合の切断状態により分類した時の各型を示すCOC数

COC数 (個/10 μ l)	供試卵数	ギャップ結合の切断状態により分類された各型 (%)			
		I	II	III	IV
1	30	0 (0.0) ^a	23(76.7) ^a	4(13.3) ^a	3(10.0) ^{ab}
3	49	1 (2.0) ^a	35(71.4) ^a	7(14.3) ^a	6(12.2) ^{ab}
6	49	5(10.2) ^{ab}	29(59.2) ^a	8(16.3) ^a	7(14.3) ^{ac}
10	58	12(20.7) ^b	33(56.9) ^a	3 (5.2) ^{ab}	10(17.2) ^a
20	43	31(72.1) ^c	11(25.6) ^b	0 (0.0) ^b	1 (2.3) ^b
40	65	60(92.3) ^d	2 (3.1) ^c	0 (0.0) ^b	3 (4.6) ^{bc}

a, b, c, d : 各縦列の異文字間に有意差あり (P<0.05)

I 型 : ルシファーイエローが全ての卵丘細胞に移行したCOC

II 型 : ルシファーイエローが内側から2層以上へは移行していたが、全ての卵丘細胞へは移行しなかったCOC

III 型 : ルシファーイエローが最内側1層の卵丘細胞にのみ移行したCOC

IV 型 : ルシファーイエローが卵丘細胞へ全く移行しなかったCOC

実験2 微小液滴(10 μ l)で培養した卵丘細胞卵子複合体(COC)について

1個区(1個のCOCを10 μ l液滴に培養した区)および3個区(3個のCOCを10 μ l液滴に培養した区)においては, I型のCOCの割合は著しく低く,ほとんどのCOCはII型を示していた(表4-3). また, IIIおよびIV型のCOCも10~15%程度観察された. 6個区(6個のCOCを10 μ l液滴に培養した区)では, I型COCの割合が有意差はなかったもののかなり高かった. さらに, 10個区(10個のCOCを10 μ l液滴に培養した区)においては, I型COCの割合はかなり高い値を示し, この値は, 1および3個区のその値に比べて有意に高かった. 6個および10個区では, 50%以上のCOCがII型を示した. 20個区(20個のCOCを10 μ l液滴に培養した区)においては, I型COCの割合は著しく高い値を示し, 1, 3, 6および10個のCOCを培養した時のその値に比べて有意に高かったが, III型およびIV型COCはほとんど観察されなかった. 40個区(40個のCOCを10 μ l液滴に培養した区)では, I型COCの割合は他のいずれの区と比較しても有意に高かった.

次に, 10 μ l液滴に様々な数のCOCを培養した時のGVBD卵率を調べた結果を表4-4に示した. 1個区, 3個区および6個区では, 24時間培養すると, GVの核相を示す卵子の割合はわずか20%前後であり, 70%以上のCOCがGVBDを誘起していた. しかし, 10個区におけるGVの核相を示した卵子の割合は1, 3および6個区のそれに比べて有意に高く, GVBDを誘

表4-4 様々な数のCOCを10 μ l液滴中で24時間培養した時の卵子の核相

COC数 (個/10 μ l)	供試卵数	各核相卵子数		Deg. (%) ²
		GV (%) ¹	GVBD (%) ¹	
1	74	16(23.9) ^a	51(76.1) ^a	7 (9.5) ^{ab}
3	77	14(18.7) ^a	61(81.3) ^a	2 (2.6) ^b
6	58	14(27.5) ^a	37(72.5) ^a	7(12.1) ^a
10	113	53(51.0) ^b	51(49.0) ^b	9 (8.0) ^{ab}
20	71	50(79.4) ^c	13(20.6) ^c	8(11.3) ^a
40	138	109(87.2) ^c	16(12.8) ^c	13 (9.4) ^{ab}

GV : Germinal Vesicle GVBD : Germinal Vesicle Breakdown
 Deg. : Degenerated

1: 核相判定可能卵子数に対する割合

2: 供試卵数に対する割合

a, b, c: 各縦列の異文字間に有意差あり (P<0.05)

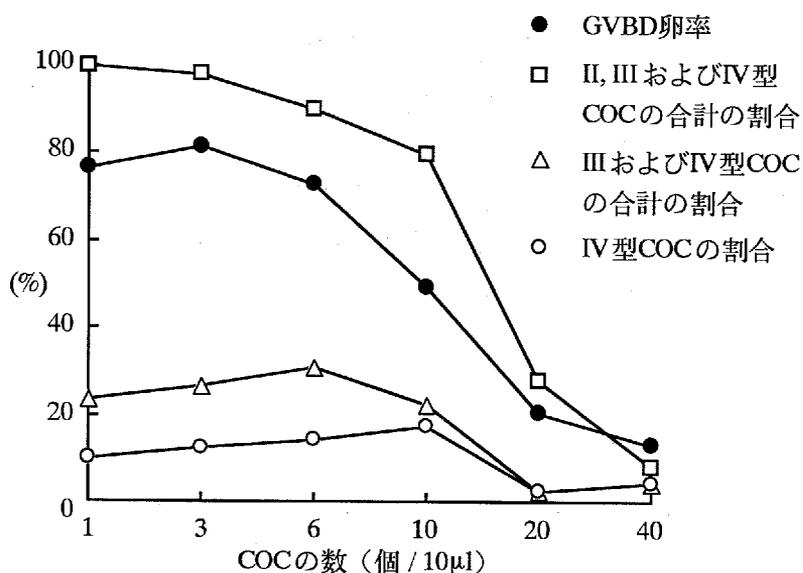


図4-3 10 μ l液滴中で様々な数のCOCを培養した時のギャップ結合の切断とGVBDとの関係

起した卵子の割合は逆に，1，3および6個区に比べて有意に低かった．さらに，20個区および40個区のGV卵子の割合はそれぞれ79.4および87.2%で，これらの値は他の区のものに比べて，有意に高かった．また，6個区および20個区の退行卵子(Deg卵子)の割合が3個区のものに比べて，有意に高くなったが，他の区間のいずれの差も有意ではなかった．

これまでの結果をもとに，10 μ l液滴に培養したCOCの数に伴う，GVBD卵率の推移，Ⅱ，ⅢおよびⅣ型を示したCOCの合計の割合の推移，ⅢおよびⅣ型を示したCOCの合計の割合の推移およびⅣ型を示したCOCの割合の推移を求め，図4-3に示した．

GVBD卵率とⅡ，ⅢおよびⅣ型を示したCOCの合計割合との相関($r=0.98$ ， $P<0.01$)およびGVBD卵率とⅢおよびⅣ型を示したCOCの合計割合との相関($r=0.92$ ， $P<0.01$)は有意であった．

さらに，液滴にいずれの数のCOCを培養した時にも，Ⅳ型COCの割合はGVBD卵子の割合よりも常に低い値を示した．

第四節 考 察

Dekel & Beer (1980)は、FSH添加培地でラットCOCと裸化卵子を培養して、FSHが卵丘細胞を膨潤させ、卵丘細胞－卵子間ギャップ結合を切断することと、人為的に卵丘細胞を除去して卵丘細胞－卵子間ギャップ結合を切断することとは卵子のGVBD誘起に対して同じ作用を有することを明らかにするとともに、卵丘細胞－卵子間ギャップ結合の切断がGVBDの引き金であると主張した。また、Dekel *et al.* (1981)は、卵胞に包まれたラットの卵子を、LH添加および無添加培地で20時間培養し、LH添加培地で培養した卵子の卵丘細胞－卵子間ギャップ結合は切断され、GVBDは誘起されたが、LH無添加培地で培養した卵子の卵丘細胞－卵子間ギャップ結合は切断されず、GVBDも誘起されなかったことから、卵丘細胞－卵子間ギャップ結合の切断が卵子のGVBDの引き金であると結論した。

本章の実験1において、卵丘細胞－卵子間ギャップ結合の切断を意味するIV型を示すCOCの割合は、培養開始0、8、16、24および32時間後に観察されたいずれの割合も、GVBD卵率よりかなり低い値を示した(図4-2)。また、実験2の、IV型COCの割合は、1、3、6、10、20および40個区のGVBD卵率よりかなり低い値を示した(図4-3)。これらの結果は、卵丘細胞－卵子間ギャップ結合が切断されるより前にGVBDが誘起されていることを示す。したがって、卵丘細胞－卵子間ギャップ結合の切断は、GVBDの引き金ではないことは明らかである。

Eppig(1982)も、hCG投与6時間後、卵丘細胞-卵子間ギャップ結合は維持されていたが、投与3時間後に、すでにGVBDが誘起されており、卵丘細胞-卵子間ギャップ結合の切断が、GVBDの後に起こることを認めている。

実験1において、GVBD卵率とⅡ、ⅢおよびⅣ型を示すCOCの合計割合との相関、GVBD卵率とⅢおよびⅣ型を示すCOCの合計割合との相関およびGVBD卵率とⅣ型を示すCOCの割合との相関はいずれも有意なことを認めた(図4-2)。しかし、培養16および24時間後のⅢおよびⅣ型を示すCOCの合計の割合は、GVBD卵率よりも低い値を示した(図4-2)。ⅢおよびⅣ型を示すCOCの合計の割合が、GVBD卵率よりも低い値を示したことは、GVBDが起こった後に、ⅢおよびⅣ型を示すCOCが出現するということであるから、内側から2層以上の卵丘細胞間ギャップ結合の切断が、GVBDの引き金であるとは考えられない。

Ⅱ、ⅢおよびⅣ型を示すCOCの合計の割合は、いずれの時間培養した時にもGVBD卵率よりも高い値を示した(図4-2)。すなわち、GVBDが誘起される前に、Ⅱ、ⅢおよびⅣ型を示すCOCが出現した。また、GVBD卵率とⅡ、ⅢおよびⅣ型を示すCOCの合計割合との間には有意で高い相関が認められた。これらのことから、GVBDの引き金は、最外層の卵丘細胞間ギャップ結合の切断と推察された。

実験2においても、GVBD卵率とⅡ、ⅢおよびⅣ型を示すCOCの合計割合との相関およびGVBD卵率とⅢおよびⅣ型を示すCOCの合計割合との相関はいずれも有意であった(図4-

3). また, 10 μ l液滴にいずれの数のCOCを培養した時にも, IIIおよびIV型を示すCOCの合計の割合は, GVBD卵率よりも常に低い値を示した(図4-3). IIIおよびIV型を示すCOCの合計の割合が, GVBD卵率よりも低い値を示したことは, GVBDが起こった後に, IIIおよびIV型を示すCOCが出現するということであるから, 内側から2層以上の卵丘細胞間ギャップ結合の切断が, GVBDの引き金とは考えられない. しかし, 1, 3, 6, 10および20個区においては, II, IIIおよびIV型を示すCOCの合計の割合が, GVBD卵率よりも高い値を示した(図4-3). つまり, GVBDが誘起される前に, II, IIIおよびIV型を示すCOCが出現した. また, GVBD卵率とII, IIIおよびIV型を示すCOCの合計の割合との間には有意で高い相関が認められたことから, GVBDの引き金は, 最外層の卵丘細胞間ギャップ結合の切断と推察された.

ラットのCOCをフリーズ・フラクチャー法で検討したLarsen *et al.*(1986)も, 卵丘細胞間ギャップ結合がhCG投与後2~3時間で消失するとともに, 90%以上の卵子がGVBDを誘起したことから, ラット卵胞卵子におけるGVBDの引き金は, 卵丘細胞間ギャップ結合の切断であると結論している.

マウスやラットにおいては, 顆粒層細胞および卵丘細胞から, ギャップ結合を通して卵子へ移行していると考えられているGVBDを抑制する因子として, cAMPおよびヒポキサンチン(hypoxanthine)が知られている(Dekel *et al.*, 1981; Dekel & Beer, 1980; Salustri & Siracusa, 1983; Schultz *et al.*, 1983; Shim *et al.*, 1992).

一方、ブタにおいては、Racowsky(1985)がアデニルサイクラーゼ活性物質であるフォルスコリン(forskolin)添加培地でCOCを48時間培養し、卵子内cAMP濃度は著しく上昇したが、GVBDは誘起されたことを認め、cAMPはGVBDに関与していない、すなわちGVBDを抑制する因子はcAMPではないと結論した。

したがって、本実験において、卵丘細胞で合成され、ギャップ結合を通じて卵子へ移行すると考えられるGVBDを抑制する因子は、ヒポキサンチンの可能性もあるが、十分な証拠はない。したがって今後検討する必要がある。

実験1において、COCを40および48時間培養した時、IV型COC(ルシファーイエローが全く卵丘細胞へ移行しないCOC)の割合(92.1, 100.0%)がGVBD卵率(89.0, 93.5%)に比べて高い値を示した(図4-2)。このことは、全ての卵丘細胞間および卵丘細胞-卵子間ギャップ結合が切断されている卵子でも、GVを示す卵子が存在したことを示す。これらの卵子は、GVBDの引き金を引かれてもGVBDを起こす能力がなかった未発育卵子と考えられる。

Motlik *et al.* (1984)も直径0.3~0.7mmのブタ小卵胞から採取した卵子を48時間培養し、59%の卵子がGVBDを起こさなかったことを認め、このGVBDを起こさなかった卵子をGVBDを起こす能力のない未発育卵子と呼んでいる。

Petr *et al.* (1989)は、10 μ l液滴で1, 5および10個のCOCを培養した時、80%以上のGVBD卵率を示したが、20および40個のCOCを培養した時、GVBD卵率は61および20%と徐々

に減少したことを認めた。しかし、本実験では、1, 3および6個区のGVBD卵率は76.1, 81.3, 72.5%であったが、10個区においてすでに49.0%という低いGVBD卵率を示し、20および40個区では、20.6および12.8%という非常に低いGVBD卵率を示した(表4-4)。このように、本実験の結果とPetr *et al.*(1989)の結果との間に差が認められたのは、本実験(ホルモン添加培地)とPetr *et al.*(ホルモン無添加培地)の実験で用いた培地が異なるためだと考えられた。

さらに、Petr *et al.*(1989)は、10 μ l液滴で40個のCOCを24時間培養した後、そのコンディション培地で、新しい10個のCOCを培養した時、それらの卵子のGVBD卵率は11%と著しく低下したことから、卵丘細胞から培地中へ、GVBD抑制因子が放出されていると結論した。

本実験において、10 μ l液滴で20個以上のCOCを培養した時、卵子のGVBD卵率が低下した(表4-4)。上述したPetr *et al.*(1989)の報告から考察すると、本実験においても卵丘細胞から培地内にGVBD抑制因子が放出されたと考えられた。

また、10 μ l液滴で20個および40個のCOCを24時間培養し、ルシファーイエローを注入して、ギャップ結合の切断を調べた結果、卵丘細胞間および卵丘細胞-卵子間ギャップ結合の切断が有意に抑制された(表4-3)。このことから、卵丘細胞から培地中へ放出されるGVBD抑制因子は卵子のGVBDを抑制するとともに、ギャップ結合の切断も抑制すると推察された。

要 約

- (1) 100 μ l液滴に20個のCOCを入れ0, 8, 16, 24, 32, 40および48時間培養した後, 一部のCOCの卵子内にルシファーイエローを注入し, ギャップ結合の切断状態をI型(ルシファーイエローがすべての卵丘細胞に移行しているCOC), II型(ルシファーイエローがすべての卵丘細胞には移行していないが, 内側から2層以上の卵丘細胞には移行しているCOC), III型(ルシファーイエローが内側から1層の卵丘細胞にのみ移行しているCOC)およびIV型(ルシファーイエローが全く卵丘細胞に移行していないCOC)に分類した. 残りのCOCは核相の判定に使用された. その結果, 培養時間が長くなるにつれて, I型COCの割合は減少し, IV型COCの割合は増加した.
- (2) 培養8時間後まではGVBDは誘起されていなかった(3.1, 0.8%). 培養16時間後から32時間後までGVBD卵率は急激に増加し, その後も徐々に増加した.
- (3) 経時的にギャップ結合の切断状態を調べた結果と経時的にGVBD卵率を調べた結果とを比較すると, 培養0, 8, 16, 24, 32時間後の卵丘細胞-卵子間ギャップ結合の切断を意味するIV型COCの割合は, GVBD卵率よりも低い値を示した. 少なくとも最外層の卵丘細胞間ギャップ結合が切断されていることを示すII型, III型およびIV型COCの合計の割合は, COCをいずれの時間培養した時においても, GVBD卵率よりやや高い値を示し, これらの間には有意な高い相関が認められた($r=0.96$, $P<0.01$). これらの結果から, ブタ卵子のGVBDの引き金は卵丘細胞-卵子間ギャップ結合の切断では

なく，卵丘細胞間ギャップ結合の切断と推察された。

(4) 10 μ l液滴で様々な数のCOCを24時間培養した後，一部のCOCの卵子内にルシファーイエローを注入し，ギャップ結合切断状態を調べ，残りのCOCはGVBDの判定に用いた。その結果，10 μ l液滴に入れるCOCの数が増加するにつれて，I型COCの割合は増加し，II型COCの割合は減少した。

(5) 10 μ l液滴に1，3および6個のCOCを培養した時はGVBDが誘起されたが，10個以上のCOCを培養すると，GVBD卵率は著しく減少した。

(6) 10 μ l液滴で様々な数のCOCを培養した時のギャップ結合切断状態を調べた結果とGVBD卵率を調べた結果とを比較すると，IV型COCの割合は，常にGVBD卵率よりも低い値を示した。また，10 μ l液滴で1，3，6，10および20個のCOCを培養した時，II型，III型およびIV型COCの合計の割合は，GVBD卵率よりやや高い値を示し，これらの間には有意な高い相関が認められた($r=0.98$ ， $P<0.01$)。これらの結果から，ブタ卵子のGVBDの引き金は卵丘細胞-卵子間ギャップ結合の切断ではなく，卵丘細胞間ギャップ結合の切断と推察された。

(7) 以上の結果から，ブタCOCを体外で培養した時のGVBDの引き金は，卵丘細胞間ギャップ結合の切断と結論された。

第五章 卵核胞崩壊(GVBD)抑制因子について

第一節 序 論

Tsafriiri & Channing (1975)は、小卵胞(直径1~2mm)、中卵胞(直径3~5mm)および大卵胞(直径6~12mm)から採取した卵胞液を50%添加したTCM-199でブタ卵丘細胞卵子複合体(COC)を48時間培養し、卵胞液無添加の対照区に比べて卵核胞崩壊(GVBD)卵率および成熟卵率が有意に抑制されたこと、および小卵胞の顆粒層細胞とCOCを共培養すると、卵子のGVBD卵率および成熟卵率が有意に抑制されたことを報告した。

したがって、顆粒層細胞から卵子の成熟を抑制する因子が放出され、卵胞液中にこの物質が蓄積されていると考えられる。この因子は、卵母細胞成熟抑制因子(oocyte maturation inhibitor, OMI)と呼ばれ、種特異性がなく、ヒト卵胞液のOMIはブタ(Hillensjo *et al.*, 1979)およびラット卵子(Chari *et al.*, 1983)の成熟を、ウシ卵胞液のOMIは、ハムスター卵子(Gwatkin & Andersen, 1976)の成熟を、さらに、ブタ卵胞液のOMIはマウスおよびラット卵子(Tsafriiri *et al.*, 1977)の成熟を抑制する。また、OMIは熱に強く(佐藤ら, 1978b)、分子量2,000以下のペプチドであろうと推定されている(Stone *et al.*, 1978)。しかし、未だにOMIは同定されていない。

一方、佐藤・石橋(1978)は、直径2~5mmのブタ卵胞から得たCOCをグルコースおよびピルビン酸を含むKrebs

Ringer Bicarbonate液で培養した時、卵子のGVBDが速やかに誘起されたことから、ブタ卵丘細胞は、OMIを放出しないと結論した。

しかし、第四章の実験2において、微小液滴(10 μ l)で、1, 3および6個のCOCを培養した時、80%前後の卵子はGVBDを誘起したが、微小液滴で20個以上のブタCOCを培養すると、GVBD卵率(12~20%)は有意に減少した。このことから、卵丘細胞から卵子のGVBDを抑制する因子が放出されていると考えられる。また、微小液滴で20個以上のブタCOCを培養すると、GVBDと同時にギャップ結合の切断も抑制されたことから、卵丘細胞から放出されるGVBD抑制因子はギャップ結合の切断も抑制していると推察された。

本章では、ブタ卵丘細胞が卵子のGVBDを抑制する因子を生産し、培地に放出するか否か、またその因子は卵丘細胞の膨潤をも抑制するか否かを調べ、さらに、この因子の同定を試みた。

第二節 材料および方法

卵巢の採取および搬送，卵子の検卵は，第二章の方法と同様に行なったが，卵子の採取には卵胞卵子の回収率の高い切開法を用いた．その方法は次の通りである．

約35℃に設定したウォーマープレート上のシャーレに2～5mlのダルベッコリン酸緩衝生理食塩水(D-PBS)を入れ，生理食塩水をキムタオルで拭った卵巢をその中に浸し，ピンセットで卵巢を固定し，剃刀で直径3～8mmの卵胞を切開し，先を研磨した薬匙で，その卵胞の内容物を掻きだし，卵胞内容物の付着した薬匙をD-PBS中ですすいだ．次に，一つの卵巢内の卵胞を全て切開した後，D-PBSを入れた50mlビーカー内でその卵巢を洗浄し，卵巢表面に付着した卵胞内容物をD-PBS中に洗い落とす．この処理を6個の卵巢を用いて行なった後，卵胞内容物を含むD-PBSを網目の一辺が212 μm の振るい(日本理化学器械)にかけ，不要な顆粒層細胞塊を除去した．振るいを通過したD-PBSを，さらに網目の一辺が125 μm の振るいにかけて，血液および単離された顆粒層細胞等を除去した．網目の一辺が125 μm の振るいの上にあるCOCの乾燥を防ぐため，振るいは35℃に設定したウォーターバス内の200mlビーカー内のD-PBSに浸漬静置した．全ての卵巢の卵胞卵子を125 μm の振るいに集めた後，その振るいの裏側から，コマゴメピペットを用いてD-PBSを流し，振るい上のCOCを100mlビーカー内に回収した．このビーカーをウォーターバス内で約10分間静置し，COCを沈澱させた後，上澄を捨て，第二章の吸引法と同様にして沈殿物からコンパクトな卵丘細

胞に囲まれた卵子のみを回収した。

D-PBSは、264mlの超純水にPBS(-)粉末2.88gおよび10mg/mlカナマイシン溶液3mlを添加し、オートクレーブをかけたPBS(-)溶液に、使用直前あるいは前日に、30mlストック液(0.1mg/ml塩化カルシウム、0.1mg/ml六水塩化マグネシウム、1mg/mlグルコース、0.036mg/mlピルビン酸ナトリウムを添加しオートクレーブをかけたもの)と3mlウシ血清(BS)を混合して作成した。

コンディショニング培地の作成

以下の実験計画で述べる各々の培地10 μ l液滴で20個のCOCを24時間培養した。そのコンディショニング培地を10 μ l用マイクロピペットを用いて吸引し、乾熱滅菌済みのエッペンドルフチューブ(QUALITY SCIENTIFIC PLASTICS)に回収した。

実験計画

実験1 様々な数の卵丘細胞卵子複合体(COC)あるいは裸化卵子をホルモン無添加培地の10 μ l液滴で24時間培養した時の卵子の核相

第四章の実験2において、ホルモン添加培地の10 μ l液滴で20個以上のCOCを24時間培養した時、GVBDは有意に抑制された。

本実験では、GVBD抑制因子が、ホルモン無添加培地で培

養したCOCによって生産されるか否かについて検討した。

1, 3, 6, 10, 20および40個のCOCあるいは20および40個の裸化卵子(DO)を, 35mmディッシュ内のミネラルオイルで覆ったホルモン無添加培地(10% FCS, 50 μ g/mlゲンタマイシン添加TCM-199)の10 μ l液滴で24時間培養した後, 第三章の方法にしたがって, 卵丘細胞を除去し, 卵子を固定, 染色して, 核相の判定を行なった。

実験2 ホルモン添加培地の10 μ l液滴で24時間培養した時の卵核胞崩壊(GVBD)抑制卵子を100 μ l液滴に移し, さらに24および48時間培養した時の卵子の核相

第四章の実験2および本章の実験1においてホルモン添加および無添加培地の10 μ l液滴で24時間培養した時, COCのGVBDは抑制されたが, これらの卵子を, 通常の培養条件で培養すると, 減数分裂を再開し, 正常にM IIにまで達するか否かを調べた。

ホルモン添加培地(10 IU/ml hCG, 10 IU/ml PMSG, 1 μ g/ml 17 β -エストラジオール, 10% FCS, 50 μ g/mlゲンタマイシン添加TCM-199)の10 μ l液滴で20および40個のCOCを24時間培養した後, これらのCOCを新しいホルモン添加培地で洗浄後, 各20個のCOCを100 μ lのホルモン添加培地に移し, さらに24あるいは48時間培養した。また, 対照区として, 培養開始時から, 100 μ l液滴に20個のCOCを入れ, 48時間培養した区を設けた。培養終了後, 第三章の方法にしたがって, 卵丘細胞を除去し, 卵子を固定, 染色して核相の判定を行なった。

実験3 コンディション培地で培養した卵丘細胞卵子複合体 (COC)および裸化卵子の卵核胞崩壊(GVBD)

回収した直後のコンディション培地で10 μ l液滴を作成し、その中に各6個のCOCおよび裸化卵子を入れ、24時間培養した。1液滴のCOCの数を6個とした理由は、第四章の実験2および第五章の実験1で、6個のCOCを新しい培地で作成した10 μ l液滴で24時間培養してもGVBDは抑制されなかったからである。培地には10 IU/ml hCG, 10 IU/ml PMSG, 1 μ g/ml 17 β -エストラジオール, 10%FCS, 50 μ g/mlゲンタマイシンを添加したTCM-199を用いた。培養終了後、第三章の方法にしたがって、卵丘細胞を除去し、卵子を固定、染色して、核相の判定を行なった。

実験4 凍結処理および加温処理したコンディション培地で 培養した卵丘細胞卵子複合体(COC)の卵核胞崩壊 (GVBD)

試験1.凍結処理したコンディション培地での培養

回収したコンディション培地を-30 $^{\circ}$ Cで1~5日間凍結した。培地作成直前に融解し、10 μ l液滴を作成して各6個のCOCを入れ、24時間培養した。培地には10 IU/ml hCG, 10 IU/ml PMSG, 1 μ g/ml 17 β -エストラジオール, 10%FCS, 50 μ g/mlゲンタマイシンを添加したTCM-199を用いた。

培養終了後、第三章の方法にしたがって卵丘細胞を除去し、卵子を固定染色して、核相を判定した。

試験2. 加温処理(56℃, 30分間)したコンディショニング培地での培養

ディッシュ内に回収したコンディショニング培地の10 μ l液滴を作成し、ミネラルオイルで覆った。このディッシュをサラップ(日立ボーデン)で包み、56℃に加温したウォーターバス内で30分間加温処理を行った。さらに、2時間以上、39℃、5%CO₂、100%湿度の条件のインキュベーター内に静置した後、10 μ l液滴に各6個のCOCを入れ24時間培養した。培地には10 IU/ml hCG, 10 IU/ml PMSG, 1 μ g/ml 17 β -エストラジオール, 10% FCS, 50 μ g/ml ゲンタマイシンを添加したTCM-199を用いた。

培養終了後、第三章の方法にしたがって卵丘細胞を除去し、卵子を固定、染色して核相を判定した。

試験3. 加温処理(70℃, 1時間)したコンディショニング培地での培養

56℃で30分間加温処理を行なったコンディショニング培地でCOCを培養した試験2において、培養COCのGVBDは抑制された。そこで、さらに高い加温処理でGVBD抑制因子が破壊されるか否か検討した。

56℃以上の温度で処理すると、培地中のFCSの蛋白質が変成する可能性がある。そこで、FCSの代わりにポリビニルピロリドン(polyvinylpyrrolidone, PVP, MW=40,000, SIGMA)を用いてコンディショニング培地を作成し、加温処理(70℃, 1時間)したコンディショニング培地のGVBDに及ぼす影響を調べた。

まず、PVP添加培地の10 μ l液滴で20個のCOCを24時間培養した時、FCS添加培地での培養と同様に、GVBDが抑制されるか否かを調べるために次の予備試験を行った。

0.3% PVPを添加したホルモン添加培地 (10 IU/ml hCG, 10 IU/ml PMSG, 1 μ g/ml 17 β -エストラジオール, 50 μ g/ml ゲンタマイシンを添加したTCM-199)の10 μ l液滴に20個のCOCを入れ、24時間培養した。

その結果、GVBDは抑制されたので、この0.3% PVPを添加したホルモン添加培地の10 μ l液滴に20個のCOCを入れ24時間培養し、コンディション培地を作成した。ディッシュ内に回収したコンディション培地の10 μ l液滴を作成し、オイルで覆った。このディッシュをサランラップで包み、70 $^{\circ}$ Cに加熱したウォーターバス内で1時間加熱処理を行った。さらに、39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 100%湿度の条件のインキュベーター内に2時間静置した後、10 μ l液滴に各6個のCOCを入れ24時間培養した。

培養終了後、第三章の方法にしたがって卵丘細胞を除去し、卵子を固定、染色して核相を判定した。

実験5 コンディション培地が卵丘細胞の膨潤および核相の進行に及ぼす影響

FCSおよびホルモン添加培地 (10 IU/ml hCG, 10 IU/ml PMSG, 1 μ g/ml 17 β -エストラジオール, 50 μ g/ml ゲンタマイシン, 10% FCSを添加したTCM-199)を用いてコンディション培地を作成した。このコンディション培地を0, 50および

100%含むFCSおよびホルモン添加培地で10 μ l液滴を作成し、この中に各6個のCOCを入れ、24および48時間培養した。24および48時間後に卵丘細胞の膨潤を観察し、COCは、第三章の方法にしたがって卵丘細胞を除去し、卵子を固定染色して核相を判定した。卵丘細胞の膨潤は、以下の分類にしたがって判定した。

±型 ; 全く膨潤が認められず、コンパクトな卵丘細胞を有するCOC (図5-1)

+型 ; ±に比較して全体的に膨潤はしているが、個々の卵丘細胞は分離していないCOC (図5-2)

++型 ; 外層の卵丘細胞は膨潤が進行し、個々の卵丘細胞が分離しているCOC (図5-3)

さらに、100%コンディション培地の10 μ l液滴で48時間培養した一部のCOCは、第四章の方法にしたがってギャップ結合の切断状態の観察に使用した。

実験6 卵核胞崩壊(GVBD)抑制因子の分子量の推定

試験1. PVP添加ホルモン無添加培地の10 μ l液滴で卵丘細胞卵子複合体(COC)を培養した時の卵子の核相

GVBD抑制因子の分子量の推定は、限外濾過膜(MILLI-PORE)を用いて行なった。限外濾過を行なう場合、コンディション培地にGVBD抑制因子以外の未知物質が含まれていると、それらの物質が除去されるので、可能な限り単純な組成

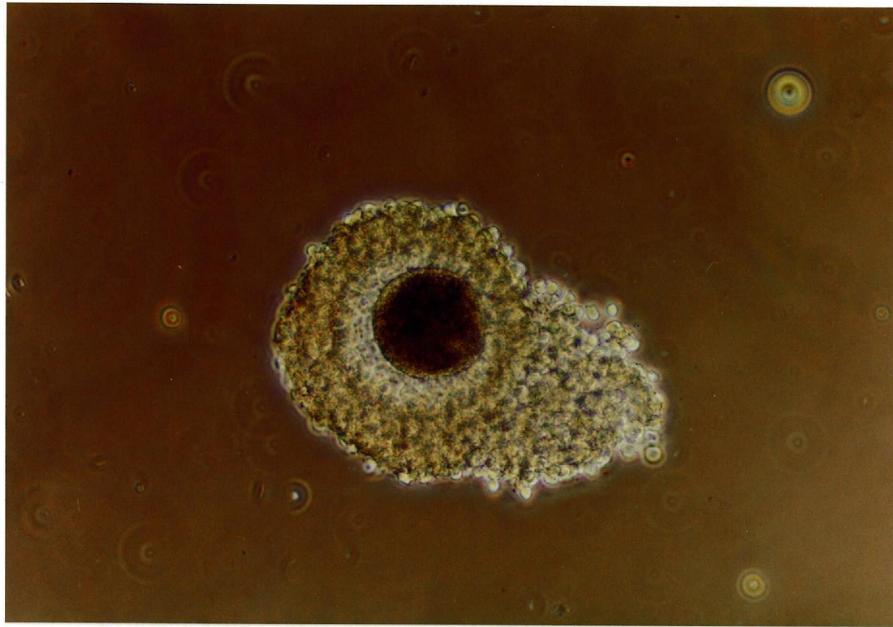


図5-1 土型を示すCOC

100%コンディション培地で24時間培養したCOC
卵丘細胞はコンパクトなままであり，全く膨潤して
いない. (×206)

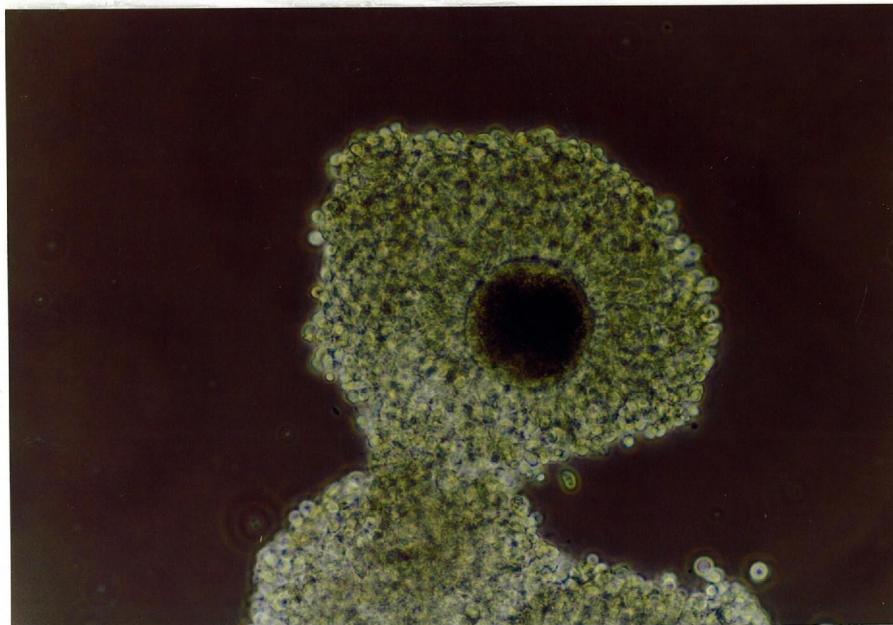


図5-2 +型を示すCOC

50%コンディション培地で24時間培養したCOC
卵丘細胞は，図5-1に比較して全体的に膨潤はして
いるが，個々の卵丘細胞は分離していない. (×206)

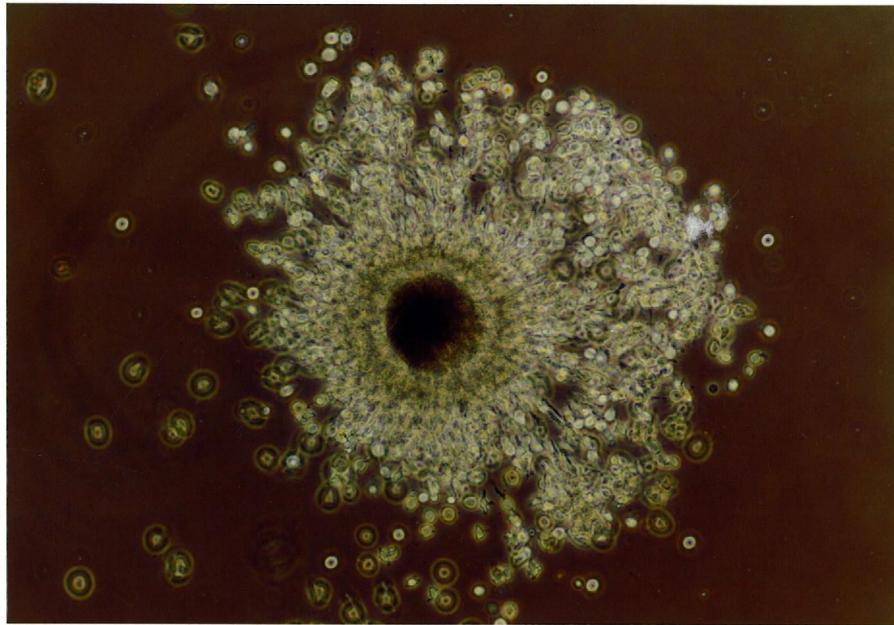


図5-3 ++型を示すCOC
0%コンディション培地で24時間培養したCOC
卵丘細胞は膨潤が進行し，個々の卵丘細胞が分離
している. (×206)

の培地を使用することが必要である。そこで、FCS添加培地の代りにPVP添加ホルモン無添加培地を用いた。まず、PVP添加ホルモン無添加培地の10 μ l液滴で20個のCOCを24時間培養した時に、GVBDが抑制されるのか否かを以下の通り予備試験として検討した。

0.3% PVP, 50 μ g/mlゲンタマイシンを添加したTCM-199の10 μ l液滴に6あるいは20個のCOCを入れ、24時間培養した。培養後、第三章の方法にしたがって卵丘細胞を除去し、卵子を固定、染色して核相を判定した。

試験2. 限外濾過を行なったコンディション培地が卵丘細胞の膨潤および卵核胞崩壊(GVBD)卵率に及ぼす影響

0.3% PVP, 50 μ g/mlゲンタマイシンを添加したTCM-199の10 μ l液滴に20個あるいは、50 μ l液滴に100個のCOCを入れ、24時間培養し、このコンディション培地を作成し、使用するまで-30 $^{\circ}$ Cで保存した。

限外濾過用チューブのフィルターは乾燥防止のため、グリセリンおよびアジ化ナトリウムでコーティングされている。このグリセリンおよびアジ化ナトリウムを除去するために超純水でフィルターを洗浄した。すなわち、限外濾過用チューブのフィルターカップに超純水400 μ lを添加し、全ての超純水がフィルターを通過するまで3500 \times gで遠心分離した。この処理を2~3回繰り返した後、クリーンベンチ内に限外濾過用チューブを静置し、約30分間紫外線照射して滅菌した。限外濾過用チューブのフィルターカップに、凍結保存し、融解したコンディション培地400 μ lを入れ、全ての培地がフィル

ターを通過するまで、 $3500 \times g$ 、 5°C で遠心分離した。使用した限外濾過膜は $<3,000$ (ウルトラフリーC3-LBC, MILLIPORE), $<10,000$ (ウルトラフリーC3-TGC), $<100,000$ (ウルトラフリーC3-THK)の3種類であった。

回収されたコンディション培地をエッペンドルフチューブに入れて再び -30°C で、使用するまで保存した。

分子量 $100,000$ 以上の物質を除去したコンディション培地、FCSおよび新しい培地(100 IU/ml hCG , 100 IU/ml PMSG , $10 \mu\text{g/ml } 17\beta\text{-エストラジオール}$, $50 \mu\text{g/ml}$ ゲンタマイシンを添加したTCM-199)を $8:1:1$ の割合で混合した培地を用いた(分子量 $100,000$ 以下区)。

分子量 $10,000$ 以上の物質を除去したコンディション培地あるいは分子量 $3,000$ 以上の物質を除去したコンディション培地、FCSおよび新しい培地($2.4\% \text{ PVP}$, 100 IU/ml hCG , 100 IU/ml PMSG , $10 \mu\text{g/ml } 17\beta\text{-エストラジオール}$, $50 \mu\text{g/ml}$ ゲンタマイシンを添加したTCM-199)を $8:1:1$ の割合で混合した培地を用いた(分子量 $10,000$ 以下区, 分子量 $3,000$ 以下区)。

コンディション対照区の培地には、限外濾過前のコンディション培地、FCSおよび新しい培地(100 IU/ml hCG , 100 IU/ml PMSG , $10 \mu\text{g/ml } 17\beta\text{-エストラジオール}$, $50 \mu\text{g/ml}$ ゲンタマイシンを添加したTCM-199)を $8:1:1$ の割合で混合して用いた。

なお、対照区の培地には、 $10\% \text{ FCS}$, $0.24\% \text{ PVP}$, 10 IU/ml hCG , 10 IU/ml PMSG , $1 \mu\text{g/ml } 17\beta\text{-エストラジオール}$ およ

び50 μ g/mlゲンタマイシンを添加したTCM-199を使用した。

以上のように調整した培地の10 μ l液滴に各6個のCOCを入れ、24時間培養した。培養終了後、実験5と同様に卵丘細胞の膨潤状態を観察した後、第三章の方法にしたがって卵丘細胞を除去し、卵子を固定、染色して核相の判定を行なった。

第三節 結 果

実験1 様々な数の卵丘細胞卵子複合体(COC)あるいは裸化卵子をホルモン無添加培地の10 μ l液滴で24時間培養した時の卵子の核相

ホルモン無添加培地の10 μ l液滴で20個以上のCOCを培養した時もGVBDが抑制されるのか否かを検討する目的で、ホルモン無添加培地の10 μ l液滴で1, 3, 6, 10, 20および40個のCOCを24時間培養した時の卵子の核相を調べ、その結果を表5-1に示した。

1個区(1個のCOCを培養した区)、3個区(3個のCOCを培養した区)および6個区(6個のCOCを培養した区)のGV卵子の割合は、27.3~38.1%で各区間に有意差は認められなかったが、10個区(10個のCOCを培養した区)のそれは、1, 3および6個区より有意に高い(57.8%)値を示した。20個区(20個のCOCを培養した区)および40個区(40個のCOCを培養した区)のGV卵子の割合は著しく高く、80%以上の値を示した。また、GVBD卵率は、逆に10 μ l液滴で培養するCOCの数が増加するにしたがって減少する傾向を示し、20および40個区のそれらの値は、それぞれ13.0および6.8%と極めて低い値を示した。ProMIおよびMIを示す卵子の割合においても、10 μ l液滴で培養するCOCの数が増加するにしたがって減少する傾向が認められた。しかし、退行卵子(Deg卵子)の割合は、1個区と6個区および1個区と40個区との間に有意差が認められた。

表5-1 様々な数のCOCをホルモン無添加培地の10μl液滴で
24時間培養した時の卵子の核相

COC数 (個/10μl)	供試 卵数	各核相卵数 (%)					Deg. (%)	
		GV	GVBD					
			総数	ProMI	MI	AI, TI		MII
1	97	37 (38.1) ^a	59 (60.8) ^a	18 (18.6) ^a	37 (38.1) ^a	2 (2.1) ^{ab}	2 (2.1) ^{ab}	1 (1.0) ^a
3	94	34 (36.2) ^a	58 (61.7) ^a	18 (19.1) ^a	33 (35.1) ^{ab}	2 (2.1) ^{ab}	5 (5.3) ^a	2 (2.1) ^{ab}
6	77	21 (27.3) ^a	50 (64.9) ^a	11 (14.3) ^{ab}	30 (39.0) ^a	4 (5.2) ^a	5 (6.5) ^a	6 (7.8) ^b
10	128	74 (57.8) ^b	50 (39.1) ^b	11 (8.6) ^{bc}	30 (23.4) ^b	5 (3.9) ^{ac}	4 (3.1) ^{ac}	4 (3.1) ^{ab}
20	138	113 (81.9) ^c	18 (13.0) ^c	8 (5.8) ^c	9 (6.5) ^c	1 (0.7) ^{bc}	0 (0.0) ^b	7 (5.1) ^{ab}
40	118	102 (86.4) ^c	8 (6.8) ^c	4 (3.4) ^c	4 (3.4) ^c	0 (0.0) ^b	0 (0.0) ^{bc}	8 (6.8) ^b

GV : Germinal Vesicle GVBD : Germinal Vesicle Breakdown ProMI : Prometaphase I
MI : Metaphase I AI : Anaphase I TI : Telophase I MII : Metaphase II Deg. : Degenerated
a, b, c : 各縦列の異文字間に有意差あり (P<0.05)

表5-2 様々な数の裸化卵子(DO)をホルモン無添加培地の10μl液滴で
24時間培養した時の卵子の核相

DO数 (個/10μl)	供試 卵数	各核相卵数 (%)					Deg. (%)	
		GV	GVBD					
			総数	ProMI	MI	AI, TI		MII
20	100	17 (17.0) ^a	73 (73.0) ^a	11 (11.0) ^a	43 (43.0) ^a	14 (14.0) ^a	5 (5.0) ^a	10 (10.0) ^a
40	100	23 (23.0) ^a	61 (61.0) ^a	12 (12.0) ^a	41 (41.0) ^a	5 (5.0) ^b	3 (3.0) ^a	16 (16.0) ^a

GV : Germinal Vesicle GVBD : Germinal Vesicle Breakdown ProMI : Prometaphase I
MI : Metaphase I AI : Anaphase I TI : Telophase I MII : Metaphase II Deg. : Degenerated
a, b : 各縦列の異文字間に有意差あり (P<0.05)

培地中に放出されるGVBD抑制因子が卵丘細胞自体で合成されているのか否かを検討する目的で、10 μ l液滴で20および40個の裸化卵子を24時間培養した時の卵子の核相を調べ、表5-2に示した。いずれの数の裸化卵子を培養した時においても、かなり高いGVBD卵率を示し、この値は、10 μ l液滴で1,3および6個のCOCを培養した時の値とほぼ同じであった。

実験2 ホルモン添加培地の10 μ l液滴で24時間培養した時の卵核胞崩壊(GVBD)抑制卵子を100 μ l液滴に移し、さらに24および48時間培養した卵子の核相

10 μ l液滴で20個以上のCOCを24時間培養した時のGVBD抑制卵子が減数分裂を完了する能力を保持しているか否かを検討するために、ホルモン添加培地の10 μ l液滴で24時間培養した時のGVBD抑制卵子を100 μ l液滴に移し、さらに48時間培養した時の卵子の核相を表5-3に示した。GV卵子の割合はいずれの区においても著しく低い値を示し、40個区(10 μ l液滴で40個のCOCを培養した区)においては、全くGV卵子は認められなかった。ProMIを示す卵子の割合も、いずれの区においても極めて低い値を示した。MIを示す卵子の割合は、対照区(100 μ l液滴で20個のCOCを培養した区)に比べて、20個区(10 μ l液滴で20個のCOCを培養した区)および40個区が高い値を示し、これらの間の差は有意であった。成熟卵率は、対照区に比べて、20個区および40個区において、わずかに低い値を示したが、いずれの区間の差も有意ではなかった。20個区および40個区のDeg卵子の割合は、対照区に比べて、わ

表5-3 COCを10 μ l液滴で24時間培養した後, 100 μ lの培地に移し,
さらに48時間培養した時の卵子の核相

処理	供試 卵数	各核相卵数 (%)					Deg. (%)
		GV	ProMI	MI	AI, TI	MII	
20COC/100 μ l, 48h	73	4 (5.5) ^a	0 (0.0) ^a	12 (16.4) ^a	0 (0.0) ^a	49 (67.1) ^a	8 (11.0) ^a
20COC/10 μ l, 24h - 20COC/100 μ l, 48h	97	5 (5.2) ^a	3 (3.1) ^a	31 (32.0) ^b	0 (0.0) ^a	52 (53.6) ^a	6 (6.2) ^a
40COC/10 μ l, 24h - 20COC/100 μ l, 48h	117	0 (0.0) ^b	1 (0.9) ^a	37 (31.6) ^b	1 (0.9) ^a	71 (60.7) ^a	7 (6.0) ^a

GV : Germinal Vesicle ProMI : Prometaphase I MI : Metaphase I AI : Anaphase I
TI : Telophase I MII : Metaphase II Deg. : Degenerated

a, b : 各縦列の異文字間に有意差あり (P<0.05)

表5-4 COCを10 μ l液滴で24時間培養した後, 100 μ lの培地に移し,
さらに24時間培養した時の卵子の核相

処理	供試 卵数	各核相卵数 (%)					Deg. (%)
		GV	ProMI	MI	AI, TI	MII	
20COC/100 μ l, 48h	61	5 (8.2) ^a	4 (6.6) ^a	4 (6.6) ^a	0 (0.0) ^a	45 (73.8) ^a	3 (4.9) ^a
20COC/10 μ l, 24h - 20COC/100 μ l, 24h	98	5 (5.1) ^a	3 (3.1) ^a	23 (23.5) ^b	1 (1.0) ^a	55 (56.1) ^b	11 (11.2) ^a
40COC/10 μ l, 24h - 20COC/100 μ l, 24h	116	11 (9.5) ^a	3 (2.6) ^a	19 (16.4) ^{ab}	3 (2.6) ^a	69 (59.5) ^{ab}	11 (9.5) ^a

GV : Germinal Vesicle ProMI : Prometaphase I MI : Metaphase I AI : Anaphase I
TI : Telophase I MII : Metaphase II Deg. : Degenerated

a, b : 各縦列の異文字間に有意差あり (P<0.05)

ずかに低い値を示したが、各区間の差は有意ではなかった。

次に、ホルモン添加培地の10 μ l液滴で24時間培養したGVBD抑制卵子を100 μ l液滴に移し、さらに24時間培養した時の卵子の核相を表5-4に示した。GV卵子およびProMI卵子の割合は、いずれの区においても10%以下と著しく低い値を示した。しかし、20個区および40個区のMI卵子の割合は、対照区に比べて、比較的高い値を示し、対照区の値と20個区の値との間には有意な差が認められた。対照区の成熟卵率は、最も高い値を示したが、20個区および40個区においても50%以上と高い値を示した。対照区の成熟卵率と、40個区その値との差は有意ではなかった。また、20個区および40個区のDeg卵子の割合は、対照区に比べて、かなり高い値を示したが、各区間には有意差は認められなかった。

実験3 コンディション培地で培養した卵丘細胞卵子複合体(COC)および裸化卵子の卵核胞崩壊(GVBD)

卵丘細胞から培地中へGVBD抑制因子が放出されているのか否か、またその因子は卵丘細胞を介して卵子のGVBDを抑制しているのか否かを検討するために、コンディション培地の10 μ l液滴で6個のCOCあるいは裸化卵子(DO)を24時間培養した時の卵子の核相を調べ、表5-5に示した。COC区(コンディション培地の10 μ l液滴で6個のCOCを培養した区)のGV卵子の割合は74.7%と著しく高い値を示したが、DO区(6個の裸化卵子を培養した区)では、21.1%と低いGV卵子の割合を示し、COC区とDO区との間には有意な差が認められた。

表5-5 COCおよび裸化卵子(DO)をコンディション培地の10μl液滴で
24時間培養した時の卵子の核相

処理	供試 卵数	各核相卵数 (%)						Deg. (%)
		GV	GVBD					
			総数	ProMI	MI	AI, TI	MII	
COC	83	62 ^a (74.7)	20 ^a (24.1)	12 ^a (14.5)	8 ^a (9.6)	0 ^a (0.0)	0 ^a (0.0)	1 ^a (1.2)
DO	90	19 ^b (21.1)	60 ^b (66.7)	8 ^a (8.9)	32 ^b (35.6)	5 ^b (5.6)	15 ^b (16.7)	11 ^b (12.2)

GV : Germinal Vesicle GVBD : Germinal Vesicle Breakdown ProMI : Prometaphase I
MI : Metaphase I AI : Anaphase I TI : Telophase I MII : Metaphase II Deg. : Degenerated
a, b : 各縦列の異文字間に有意差あり (P<0.05)

表5-6 COCを熱処理および凍結処理したコンディション培地の10μl液滴で
24時間培養した時の卵子の核相

処理	供試 卵数	各核相卵数 (%)						Deg. (%)
		GV	GVBD					
			総数	ProMI	MI	AI, TI	MII	
対照	83	62 ^a (74.7)	20 ^a (24.1)	12 ^a (14.5)	8 ^a (9.6)	0 ^a (0.0)	0 ^a (0.0)	1 ^a (1.2)
-30°C	178	123 ^a (69.1)	40 ^a (22.5)	20 ^a (11.2)	20 ^a (11.2)	0 ^a (0.0)	0 ^a (0.0)	15 ^b (8.4)
56°C30分	87	64 ^a (73.6)	17 ^a (19.5)	10 ^a (11.5)	7 ^a (8.0)	0 ^a (0.0)	0 ^a (0.0)	6 ^{ab} (6.9)

GV : Germinal Vesicle GVBD : Germinal Vesicle Breakdown ProMI : Prometaphase I
MI : Metaphase I AI : Anaphase I TI : Telophase I MII : Metaphase II Deg. : Degenerated
a, b : 各縦列の異文字間に有意差あり (P<0.05)

COC区のGVBD卵率は、DO区に比べて、有意に低い値を示した。ProMIの卵子の割合においては、COC区とDO区との間に有意な差は認められなかったが、COC区のMIおよびAI, TIの卵子の割合は、DO区のそれらの値に比べて有意に低い値を示した。また、COC区には成熟卵子は全く認められなかったが、DO区においては、16.7%観察され、両区間の差は有意であった。DO区のDeg卵子の割合は、著しく高い値を示し、COC区のそれとの差は有意であった。

実験4 凍結処理および加温処理したコンディション培地で培養した卵丘細胞卵子複合体(COC)の卵核胞崩壊(GVBD)

試験1.

卵丘細胞から放出されるGVBD抑制因子が -30°C の凍結処理で破壊されるか否かを検討するために、コンディション培地を -30°C で凍結し、融解した培地の $10\mu\text{l}$ 液滴で6個のCOCを24時間培養し、卵子の核相を調べた結果を表5-6に示した。 -30°C 区(凍結・融解したコンディション培地の $10\mu\text{l}$ 液滴で6個のCOCを培養した区)のGV卵子の割合は、69.1%で、対照区(新しいコンディション培地)との間に有意差は認められなかった。また、GVBD卵子、ProMI卵子およびMI卵子の割合においても、 -30°C 区と対照区との間に有意差は認められなかった。 -30°C 区において、AI, TIおよびMIIの卵子は全く認められなかった。 -30°C 区のDeg卵子は比較的高い割合(8.4%)を示し、この値は対照区のそれに比べて有意に高か

った。

試験2.

卵丘細胞から放出されるGVBD抑制因子が56℃30分間の加温処理で破壊されるか否かを検討するために、コンディション培地を56℃で30分間加温処理した培地の10 μ l液滴で6個のCOCを24時間培養し、卵子の核相を調べた結果を表5-6に示した。56℃区(56℃, 30分間加温処理したコンディション培地の10 μ l液滴で6個のCOCを培養した区)のGV卵子の割合は73.6%とかなり高い値を示し、この値と対照区の値との間には有意差はなかった。また、GVBD卵子, ProMI卵子, MI卵子およびDeg卵子の割合においても、56℃区と対照区との間に有意な差は認められなかった。56℃区には、AI, TIおよびMIIの卵子は全く認められなかった。

試験3.

PVPおよびホルモン添加培地の10 μ l液滴で20個のCOCを培養した時も卵子のGVBDが抑制されるか否かを検討するために、PVPおよびホルモン添加培地の10 μ l液滴で、6個(6個区)および20個(20個区)のCOCを24時間培養した卵子の核相を調べ、その結果を表5-7に示した。20個区のGV卵子の割合は、6個区のその値に比べて、著しく高い値を示した。20個区のGVBD卵率は、6個区に比べて、極めて低い値を示した。これらのGV卵子の割合およびGVBD卵率は、いずれの場合においても、両区間に有意な差が認められた。MIを示す卵子の割合は、20個区に比べて、6個区において、有意に高い

表5-7 COCをPVPおよびホルモン添加コンディション培地の10μl液滴で
24時間培養した時の卵子の核相

COC数 (個/10μl)	供試 卵数	各核相卵数 (%)					Deg. (%)	
		GV	GVBD					
			総数	ProMI	MI	AI, TI		MII
6	72	11 (15.3) ^a	56 (77.8) ^a	6 (8.3) ^a	47 (65.3) ^a	2 (2.8) ^a	1 (1.4) ^a	5 (6.9) ^a
20	55	26 (47.3) ^b	25 (45.5) ^b	6 (10.9) ^a	18 (32.7) ^b	1 (1.8) ^a	0 (0.0) ^a	4 (7.3) ^a

GV : Germinal Vesicle GVBD : Germinal Vesicle Breakdown ProMI : Prometaphase I
MI : Metaphase I AI : Anaphase I TI : Telophase I MII : Metaphase II Deg. : Degenerated
a, b : 各縦列の異文字間に有意差あり (P<0.05)

表5-8 COCを熱処理 (70°C1時間) したコンディション培地の10μl液滴で
24時間培養した時の卵子の核相

処理	供試 卵数	各核相卵数 (%)					Deg. (%)	
		GV	GVBD					
			総数	ProMI	MI	AI, TI		MII
対照	83	62 (74.7)	20 (24.1)	12 (14.5)	8 (9.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.2)
70°C1時間	101	75 (74.3)	23 (22.8)	9 (8.9)	13 (12.9)	0 (0.0)	1 (1.0)	3 (3.0)

GV : Germinal Vesicle GVBD : Germinal Vesicle Breakdown ProMI : Prometaphase I
MI : Metaphase I AI : Anaphase I TI : Telophase I MII : Metaphase II Deg. : Degenerated
各縦列の両区間に有意差なし

値を示した。しかし，ProMI，AI，TI，MIIおよびDeg
卵子の割合においては両区間(6個区，20個区)に有意差は認められなかった。

次に，卵丘細胞から放出されるGVBD抑制因子が70℃1時間の加温処理で破壊されるか否かを検討するために，コンディション培地を70℃で1時間加温処理した培地の10 μ l液滴で6個のCOCを24時間培養し，卵子の核相を調べた結果を表5-8に示した。70℃区(70℃で1時間加温処理したコンディション培地の10 μ l液滴で6個のCOCを培養した区)のGV卵子の割合は，74.3%で，対照区のものに比べて有意差は認められなかった。また，GVBD，ProMI，MI，AI，TI，MIIおよびDeg卵子の割合においては，両区間(70℃区，対照区)に有意な差は認められなかった。

実験5 コンディション培地が卵丘細胞の膨潤および核相の進行に及ぼす影響

培地に放出されたGVBD抑制因子が卵丘細胞の膨潤に及ぼす影響を検討するために，コンディション培地を0，50および100%含む培地の10 μ l液滴で6個のCOCを24および48時間培養し，卵丘細胞の膨潤状態を調べ，その結果を表5-9に示した。

24時間培養した時の0%区(COCを0%コンディション培地で培養した区)では，ほとんどのCOCが++型(外層の卵丘細胞は膨潤が進行し，個々の卵丘細胞が分離しているCOC)を示した。しかし，24時間培養した時の50%区(COCを50%コ

表5-9 コンディション培地で24および48時間培養したCOCにおける
卵丘細胞の膨潤状態

培養 時間 (hr)	コンディション 培地濃度 (%)	供試 卵数	卵丘細胞の膨潤状態 (%)		
			±	+	++
24	0	104	3 (2.9) ^a	8 (7.7) ^a	93 (89.4) ^a
24	50	91	1 (1.1) ^a	41 (45.1) ^b	49 (53.8) ^b
24	100	102	101 (99.0) ^b	0 (0.0) ^c	1 (1.0) ^c
48	0	104	1 (1.0) ^a	7 (6.7) ^a	96 (92.3) ^a
48	50	91	0 (0.0) ^a	30 (33.0) ^b	61 (67.0) ^b
48	100	102	99 (97.1) ^b	3 (2.9) ^a	0 (0.0) ^c

a, b, c: 各培養時間の各縦列の異文字間に有意差あり (P<0.05)

ンディション培地で培養した区)では，約半分(45.1%)のCOCが+型(±型に比較して全体的に膨潤しているが，個々の卵丘細胞は分離していないCOC)を示し，残りの約半分(53.8%)のCOCが++型を示した．24時間培養した時の100%区(COCを100%コンディション培地で培養した区)では，99%のCOCが±型(全く膨潤が認められないCOC)を示し，この値は，他の区(0%区，50%区)に比べて，有意に高い値であった．また，24時間培養した時の++型COCの割合は，コンディション培地の濃度が高くなるにしたがって有意に低下した．

COCを0，50および100%含む培地で48時間培養した時の0%区(COCを0%コンディション培地で培養した区)では++型COCの割合が，100%区(COCを100%コンディション培地で培養した区)では±型COCの割合が著しく高い値を示した．50%区(COCを50%コンディション培地で培養した区)では，++型COCの割合が，かなり高い値(67.0%)を示した．

コンディション培地を0，50および100%含む培地の10 μ l液滴で6個のCOCを48時間培養した時の，卵子の核相を調べ，表5-10に示した．GV卵子の割合はいずれの区においても5%以下の低い値を示し，各区間に有意差は認められなかった．MI卵子の割合は，コンディション培地の濃度が高くなるにつれて増加し，0および50%区と100%区との間には有意な差が認められた．逆に，成熟卵率は，コンディション培地の濃度が上昇するにつれて，徐々に低下する傾向であったが，いずれの区間にも有意差は認められなかった．50%区および

表5-10 COCをコンディション培地で48時間培養した時の卵子の核相

コンディション 培地濃度 (%)	供試 卵数	各核相卵数 (%)					Deg. (%)
		GV	ProMI	MI	AI, TI	MII	
0	100	4 ^a (4.0)	0 ^a (0.0)	9 ^a (9.0)	1 ^a (1.0)	74 ^a (74.0)	12 ^a (12.0)
50	91	1 ^a (1.1)	0 ^a (0.0)	17 ^a (18.7)	1 ^a (1.1)	65 ^a (71.4)	7 ^{ab} (7.7)
100	88	1 ^a (1.1)	0 ^a (0.0)	28 ^b (31.8)	2 ^a (2.3)	54 ^a (61.4)	3 ^b (3.4)

GV : Germinal Vesicle ProMI : Prometaphase I MI : Metaphase I AI : Anaphase I
TI : Telophase I MII : Metaphase II Deg. : Degenerated

a, b : 各縦列の異文字間に有意差あり (P<0.05)

表5-11 COCをPVP添加ホルモン無添加培地の10μl液滴で24時間培養した時の
卵子の核相

COC数 (個/10μl)	供試 卵数	各核相卵数 (%)					Deg. (%)	
		GV	GVBD					
			総数	ProMI	MI	AI, TI		MII
6	58	33 ^a (56.9)	23 ^a (39.7)	4 ^a (6.9)	13 ^a (22.4)	3 ^a (5.2)	3 ^a (5.2)	2 ^a (3.4)
20	181	150 ^b (82.9)	20 ^b (11.0)	2 ^b (1.1)	17 ^b (9.4)	1 ^b (0.6)	0 ^b (0.0)	11 ^a (6.1)

GV : Germinal Vesicle GVBD : Germinal Vesicle Breakdown ProMI : Prometaphase I
MI : Metaphase I AI : Anaphase I TI : Telophase I MII : Metaphase II Deg. : Degenerated

a, b : 各縦列の異文字間に有意差あり (P<0.05)

100%区のDeg卵子の割合は，0%区に比べて，かなり低い値を示し，0%区と100%区との間には有意差が認められた。

100%のコンディション培地で48時間培養したCOCの卵子内にルシファーイエローを注入し，ギャップ結合の切断状態を観察した。その結果，すべてのCOCの卵丘細胞間および卵丘細胞－卵子間ギャップ結合は切断されていた(図5-4)。

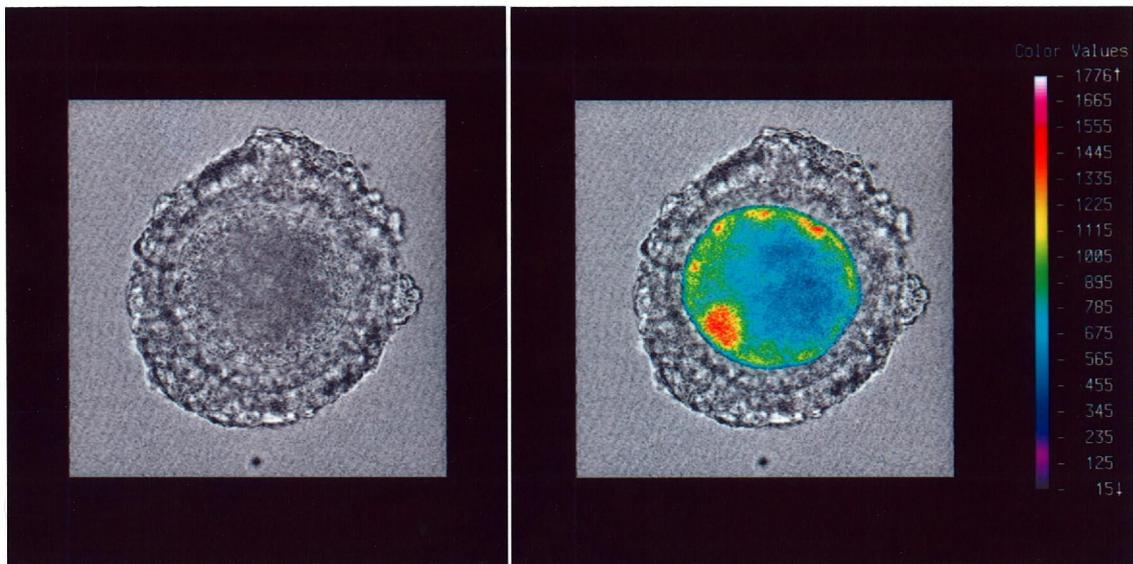
実験6 卵核胞崩壊(GVBD)抑制因子の分子量の推定

試験1.

PVP添加ホルモン無添加培地の10 μ l液滴で20個以上のCOCを24時間培養した時，卵子のGVBDが抑制されるか否かを検討する目的で，COCをPVP添加ホルモン無添加培地の10 μ l液滴で24時間培養した時の卵子の核相を調べ，その結果を表5-11に示した。20個区(20個のCOCを培養した区)のGV卵子の割合は，6個区(6個のCOCを培養した区)に比べ，有意に高かった。6個区のGVBD卵率は，有意に高い値を示した。6個区のProMI，MI，AI，TIおよびMIIを示す卵子の割合は，20個区に比べて有意に高い値を示した。両区(6個区および20個区)のDeg卵子の割合は，いずれも，著しく低く，それらの差は有意ではなかった。

試験2.

分子量3,000以上の物質を除去したコンディション培地(<3,000画分区)，分子量10,000以上の物質を除去したコンディション培地(<10,000画分区)および分子量100,000以上



a

b

図5-4 100%コンディション培地で48時間培養したCOC
 aは光学顕微鏡像で、bは蛍光像を示す。ギャップ
 結合の切断状態はIV型(ルシファーイエローが全く
 卵丘細胞へ移行していない)を示す。(×200)

の物質を除去したコンディション培地 (<100,000画分区) が卵丘細胞の膨潤および卵子の核相に及ぼす影響を調べ、表5-12に示した。±型を示すCOCは、<10,000画分区にのみ観察されたが、その割合は著しく低かった。+型COCは、対照区(新しい培地の10 μ l液滴で6個のCOCを培養した区)においては、6.1%とわずかに観察されたのみであったが、コンディション対照区(限外濾過していないコンディション培地の10 μ l液滴で6個のCOCを培養した区)、<3,000画分区、<10,000画分区および<100,000画分区においては、40%以上と著しく高い値を示した。+型COCにおいては、対照区と他のすべての区(コンディション対照区、<3,000画分区、<10,000画分区および<100,000画分区)との間に有意差が認められた。対照区の++型COCの割合は極めて高く、その他のコンディション培地を含む各区においては、かなり低い値を示した。また、++型COCにおいては、対照区と他のすべての区(コンディション対照区、<3,000画分区、<10,000画分区および<100,000画分区)との間に有意差が認められた。

表5-12に示す通り、対照区のGV卵子の割合は、最も低い値を示し、この値と他の各区(コンディション対照区、<3,000画分区、<10,000画分区および<100,000画分区)との間に有意差が認められた。また、<3,000画分区で、最も高いGV卵子の割合を示し、この値はコンディション対照区および<100,000画分区のその値に比べて、有意に高かった。対照区のGVBD卵率は、最も高い値を示し、この値と他のいずれの区(コンディション対照区、<3,000画分区、<10,000

表5-12 COCを限外濾過したコンデンション培地で24時間培養した時の卵丘細胞の膨潤状態および卵子の核相

処理	供試 卵数	各核相卵数 (%)										卵丘細胞の膨潤状態 (%)			
		GV					GVBD					Deg. (%)	±	+	++
		GV	ProMI	MI	AI, TI	MII	GVBD	MI	AI, TI	MII					
対照	228	41 ^a (18.0)	178 ^a (78.1)	20 ^a (8.8)	157 ^a (68.9)	1 ^a (0.4)	0 ^a (0.0)	0 ^a (0.0)	9 ^{ab} (3.9)	0 ^a (0.0)	14 ^a (6.1)	214 ^a (93.9)			
コンデンション 対照	205	88 ^b (42.9)	104 ^{bc} (50.7)	35 ^b (17.1)	67 ^{bc} (32.7)	2 ^a (1.0)	0 ^a (0.0)	0 ^a (0.0)	13 ^a (6.3)	0 ^a (0.0)	128 ^{bc} (62.4)	77 ^b (37.6)			
<3,000	105	61 ^c (58.1)	43 ^b (41.0)	14 ^{ab} (13.3)	29 ^b (27.6)	0 ^a (0.0)	0 ^a (0.0)	0 ^a (0.0)	1 ^b (1.0)	0 ^a (0.0)	48 ^d (45.7)	57 ^c (54.3)			
<10,000	146	73 ^{bc} (50.0)	67 ^{bc} (45.9)	12 ^a (8.2)	54 ^{bc} (37.0)	0 ^a (0.0)	1 ^a (0.7)	1 ^a (0.7)	6 ^{ab} (4.1)	9 ^b (6.2)	76 ^{cd} (52.1)	61 ^{bc} (41.8)			
<100,000	125	48 ^b (38.4)	70 ^c (56.0)	18 ^{ab} (14.4)	51 ^c (40.8)	1 ^a (0.8)	0 ^a (0.0)	0 ^a (0.0)	7 ^{ab} (5.6)	0 ^a (0.0)	81 ^b (64.8)	44 ^b (35.2)			

GV : Germinal Vesicle GVBD : Germinal Vesicle Breakdown ProMI : Prometaphase I
 MI : Metaphase I AI : Anaphase I TI : Telophase I MII : Metaphase II Deg. : Degenerated
 a, b, c : 各縦列の異文字間に有意差あり (P<0.05)

画分区および<100,000画分区)との間にも有意な差が認められた。また、<3,000画分区において、最も低いGVBD卵率を示し、この値は<100,000画分区のそれに比べて、有意に低かった。ProMIの卵子の割合は、いずれの区においても非常に低い値を示し、コンディション対照区と、対照区および<10,000画分区との間には有意差が認められた。対照区のMIの卵子の割合は、他の各区(コンディション対照区、<3,000画分区、<10,000画分区および<100,000画分区)に比べて有意に高い値を示した。Deg卵子の割合は、いずれの区においても極めて低い値を示したが、コンディション対照区と<3,000画分区との間には有意差が認められた。

第四節 考察

実験1において、10 μ l液滴で1, 3, 6個のCOCを培養した時のGVBD卵率は60.8, 61.7および64.9%となったが、20個および40個のCOCを培養した時のそれらは13.0および6.8%と著しく低い値を示した(表5-1)。このことから、10 μ l液滴で20個以上のCOCを培養すると、卵子のGVBDは抑制されることが明確にされた。

また、実験3において、20個のCOCを10 μ l液滴で24時間培養したコンディション培地の10 μ l液滴で、6個のCOCを24時間培養したところ、GVBD卵率は、24.1%を示した。この値は、新しい培地の10 μ l液滴で6個のCOCを培養した時の値(72.5%)に比べて有意に低い値であった(表4-4, 5-5)。これらのことは、COCから培地中へ卵子のGVBDを抑制する因子が放出されることを示す。

さらに、10 μ l液滴に20個以上の裸化卵子を培養した時は、GVBDは抑制されなかった(表5-2)。このことから、卵子自体はGVBD抑制因子を培地中へ放出しないことが明らかにされた。したがって、10 μ l液滴で20個以上のCOCを培養した時に培地中に放出されるGVBD抑制因子は、卵丘細胞由来のものと推定された。

一方、コンディション培地の10 μ l液滴で6個の裸化卵子を24時間培養した時のGVBD卵率は66.7%であった(表5-5)。この値は、6個のCOCをコンディション培地で培養した時のその値(24.1%)に比べて有意に高い値であった(表5-5)。さらに、その裸化卵子のGVBD卵率(66.7%)は100 μ l液滴で20

個のCOCを24時間培養した時の値(66.7%)と一致した(表4-2)。したがって、コンディション培地中のGVBD抑制因子は裸化卵子には何ら影響を及ぼさないと考えられる。すなわち、GVBD抑制因子は卵丘細胞を介して、卵子のGVBDを抑制しているものと推察された。

第四章の実験2において、ホルモンおよび血清添加培地の10 μ l液滴で20個以上のCOCを24時間培養すると、GVBDが抑制され(表4-4)、本章の実験4において、ホルモンを添加し、血清の代わりにPVPを添加した培地の10 μ l液滴で20個のCOCを培養した時も、GVBDは抑制された(表5-7)。これらのことは、ホルモン添加培地で20個以上のCOCを培養すると、血清を添加するか否かに関わらず、卵丘細胞は培地中にGVBD抑制因子を放出することを示している。

さらに、本章の実験1において、ホルモン無添加で血清添加の培地を使用した場合(表5-1)、および実験6のホルモン無添加でPVPを添加した培地の場合にも(表5-11)、10 μ l液滴で20個以上のCOCを24時間培養すると、GVBDは抑制された。これらのことから、卵丘細胞から培地中へ放出されるGVBD抑制因子の生産は、ホルモン(LHあるいはhCG)には依存しないと考えられる。さらに、LHあるいはhCGは卵丘細胞および卵子内cAMP濃度を上昇させること(Bauminger *et al.*, 1978)から、卵丘細胞のGVBD抑制因子の合成には、cAMP系の代謝調節機構は関与しないと推察される。

第四章の実験2における血清とホルモンの添加培地(表4-4)および本章の実験1における血清添加でホルモン無添加培地

(表5-1)の10 μ l液滴に20個のCOCを入れて培養した場合、GVBDは抑制された。また、本章の実験4における、PVPとホルモンの添加培地(表5-7)および実験6におけるPVP添加でホルモン無添加培地(表5-11)の場合にも、10 μ l液滴に20個のCOCを入れて培養した場合、GVBDは抑制された。これらのことから、卵丘細胞から培地中へのGVBD抑制因子の放出は、血清にも依存しないことが明らかとなった。

実験2において、ホルモン添加培地の10 μ l液滴に20個あるいは40個のCOCを24時間培養した後、それらのCOCを100 μ l液滴に移し、さらに24あるいは48時間培養した時、GVBDは正常に誘起され、減数分裂は正常にM IIにまで進行した(表5-3,4)。これらのことは、10 μ l液滴で培養してGV期で休止しているCOCは、明らかに正常に減数分裂を進行させる能力を保持している、すなわち生存COCであることを示す。

通常、ブタ卵子が体外で成熟するためには48時間を要する(Nagai & Moor, 1990)が、本実験において、10 μ l液滴から100 μ l液滴に移し、24時間培養したのみで50%以上の卵子が、M IIにまで進行した(表5-4)。このことは、20あるいは40個のCOCを10 μ l液滴で培養し、GV期で休止していたCOCの減数分裂は、GVBD抑制因子を除くと著しく加速され、通常の減数分裂の進行に要する約半分の時間でM IIに達することを示している。

これに類似した現象として、ブタCOCを蛋白合成阻害剤であるシクロヘキシミド(cycloheximide)を添加した培地で20時間培養してGVBDの抑制されたCOCが、シクロヘキシミド

無添加培地に移され、さらに培養されると、通常の3分の1の4～6時間でGVBDが完了することが報告されている(Kubelka *et al.*, 1988).

COCを10 μ l液滴で24時間培養した後、100 μ l液滴に移し、さらに24時間培養した時、MIを示す卵子の割合が比較的高く、10 μ l液滴に20個のCOCを培養した時のその値は、対照区の値に比べて有意に高い値であった(表5-4)。また、100 μ l液滴に移してから48時間培養した時も同様の結果であった(表5-3)。このように、COCを10 μ l液滴で24時間培養した後、100 μ l液滴に移しさらに培養した時、MIを示す卵子の割合が高くなる理由は不明である。

10 μ l液滴に20個のCOCを培養して作成したコンディション培地を-30 $^{\circ}$ Cで凍結処理あるいは56 $^{\circ}$ C30分間の条件で加温処理した後、これらの培地で10 μ lの液滴を作成し、その中で6個のCOCを24時間培養し、核相を調べた。その結果、凍結処理区および56 $^{\circ}$ C加温処理区のGVBD卵率は、対照区(新鮮なコンディション培地でCOCを培養した区)のそれとほとんど変らなかった(表5-6)。これらのことから、GVBD抑制因子は、-30 $^{\circ}$ Cでの凍結処理、56 $^{\circ}$ Cでの30分間加温処理でも、破壊されない物質と考えられた。

さらに、PVPとホルモンを添加した培地で10 μ lの液滴を作成し、その中で、20個のCOCを24時間培養した時のコンディション培地を70 $^{\circ}$ Cで1時間加温処理し、その培地の10 μ l液滴で6個のCOCを24時間培養して、卵子の核相を調べた。その結果、加温処理したコンディション培地で培養した時のGVBD

卵率は、対照区(新鮮なコンディション培地の10 μ l液滴で6個のCOCを24時間培養した区)のそれとほぼ同じ値を示した(表5-8)。このことから、コンディション培地中のGVBD抑制因子は、70 $^{\circ}$ C、1時間の加温処理によっても破壊されない物質であることが明らかになった。

分子量<3,000,<10,000,<100,000で限外濾過を行ない、これらの濾液を80%添加した培地の10 μ l液滴でCOCを培養した時の卵子の核相を調べたところ、対照区(新しい培地でCOCを培養した区)のGVBD卵率は、コンディション対照区(限外濾過していないコンディション培地でCOCを培養した区)およびいずれのコンディション培地画分区(<3,000画分区,<10,000画分区および<100,000画分区)のそれらの値に比べても、有意に高い値を示した(表5-12)。このことは、GVBD抑制因子は分子量3,000以下の物質であることを示す。

実験5において、コンディション培地を0,50,100%含む培地の10 μ l液滴で、6個のCOCを24および48時間培養し、卵丘細胞の膨潤状態を調べた。その結果、全くコンディション培地を含まない培地で培養した時(0%区)には、ほとんどのCOCが++型(外側の個々の卵丘細胞は分離している)を示したが、その割合は、コンディション培地の濃度が上昇するにつれて、低下し、100%コンディション培地で培養した時には、ほとんど観察されなかった。逆に、±型(全く卵丘細胞が膨潤していない)COCの割合は、コンディション培地濃度が上昇するにつれて増加し、100%コンディション培地で培養した時にはほとんどのCOCが、±型を示した(表5-9)。

また、10 μ l液滴に20個のCOCを培養して作成したコンディション培地を分子量3,000, 10,000および100,000以上を除去する限外濾過膜で濾過し、それらの濾液を80%添加した培地(<3,000画分区, <10,000画分区および<100,000画分区)の10 μ l液滴に各6個のCOCを入れ、24時間培養し、COCの卵丘細胞の膨潤状態を観察した。+型COCの割合は、対照区(新しい培地)において6.1%と著しく低い値を示したが、コンディション対照区および、いずれのコンディション培地画分区(<3,000画分区, <10,000画分区および<100,000画分区)においても、50%前後のかなり高い値を示し、これらの値は、対照区のその値に比べて有意に高かった。また、逆に、++型COCの割合は、対照区に比べて、コンディション対照区および、いずれのコンディション培地画分区(<3,000画分区, <10,000画分区および<100,000画分区)においても、有意に低い値を示した(表5-12)。これらの結果から、卵丘細胞はGVBD抑制因子と同時に、卵丘細胞の膨潤を抑制する因子も放出していると推察された。

10 μ l液滴に20個のCOCを培養して作成したコンディション培地が、卵丘細胞の膨潤および核相の進行に及ぼす影響を調べた実験5の結果より、コンディション培地濃度が上昇するにつれて、卵丘細胞の膨潤は抑制され、同時に、GVBDも抑制された(表4-4, 5-5, 9)。また、限外濾過を行なったコンディション培地が卵丘細胞の膨潤およびGVBD卵率に及ぼす影響を調べた実験6においても、各コンディション培地添加区では、対照区に比べて卵丘細胞の膨潤は抑制され、GVBD

も抑制された(表5-12). これらのことから, GVBD抑制因子と卵丘細胞の膨潤を抑制する因子とは同一の物質と推定された.

このように, GVBD抑制因子は卵丘細胞の膨潤を抑制する作用を有すること, 第四章の実験2で, 10 μ l液滴で20個以上のCOCを24時間培養すると, GVBDとともに卵丘細胞間ギャップ結合の切断も抑制されたこと, およびラット (Chen *et al.*, 1990) およびマウス (Eppig, 1982) 卵子において卵丘細胞の膨潤が抑制されることによって卵丘細胞間ギャップ結合の切断が阻止されると報告されていることとを合わせて考察すると, GVBD抑制因子は卵丘細胞の膨潤を抑制することによって, ギャップ結合の切断を阻止し, GVBDを抑制していると推察された.

卵丘細胞が膨潤するためには, ヒアルロン酸(Hyaluronic acid)の合成が必要である (Salustri *et al.*, 1989). そこで, Chen *et al.* (1990) はヒアルロン酸合成阻害剤であるヘパリン (heparin), 6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン (6-diazo-5-oxo-L-norleucine) およびウリジンモノフォスフェイト (uridine monophosphate) を添加した培地でマウスCOCを培養し, 卵丘細胞の膨潤が著しく抑制されることを示した. したがって, ブタ卵丘細胞で生産され, 培地に放出されるGVBD抑制因子は, ヒアルロン酸合成抑制物質様物質である可能性がある.

さらに, ヒアルロン酸を含む細胞外マトリックス (extracellular matrix) の合成に卵丘細胞内アクチンが密接に関与

している(Sutovsky *et al.*, 1995). また, 卵子の核相がGV期で維持されるためには, 透明帯を通過し, 卵子の原形質膜へ達する卵丘細胞の突起中のアクチンが豊富でなければならない(Allworth & Albertini, 1993). これらのことから, ブタ卵丘細胞で生産されるGVBD抑制因子は卵丘細胞内アクチンの合成および分布に関与し, 卵丘細胞の膨潤およびギャップ結合の切断が誘起されないように, アクチンを制御している可能性がある.

COCをコンディショニング培地で48時間培養した時, 卵丘細胞の膨潤は抑制されたが, 卵子はGVBDを誘起し, 正常にMIIにまで進行した(表5-10). また, コンディショニング培地中で48時間培養したCOCの卵細胞質内にルシファーイエローを注入し, ギャップ結合の切断状態を調べた結果, 全ての卵丘細胞間および卵丘細胞-卵子間ギャップ結合は切断されていた(図5-4). したがって, コンディショニング培地で48時間培養したCOCにおいては, 卵丘細胞間および卵丘細胞-卵子間ギャップ結合は切断され, GVBDが誘起され, 減数分裂が正常に進行したものと考えられる. さらに, 卵丘細胞から培地中へ放出されたGVBD抑制因子は, 卵丘細胞の膨潤は抑制するが, ギャップ結合の維持作用はないと推考された.

ギャップ結合はコネクシン(connexin)の6量体から構成されており(Beyer *et al.*, 1987; Risek *et al.*, 1990), 閉鎖卵胞におけるギャップ結合消失時には, コネクシンRNAおよびコネクシン蛋白が減少することが報告されている(Wiesen & Midgley, 1994). したがって, コンディショニング培地で48時

間培養した時，卵丘細胞の膨潤は誘起されずにほとんどの卵子がMⅡに達した(表5-10)のは，コネクシンRNAの転写あるいはコネクシン蛋白の合成がGVBD抑制因子によって抑制され，ギャップ結合の維持ができなくなり切断された可能性がある。

要 約

(1) 10 μ l液滴で1, 3, 6個のCOCを24時間培養した時のGVBD卵率は60.8, 61.7および64.9%であったが, 20個および40個のCOCを培養した時のそれはそれぞれ13.0および6.8%であった. このことから, 10 μ l液滴で20個以上のCOCを培養すると, 卵子のGVBDは抑制されることが明確にされた.

(2) 培地の10 μ l液滴に20個あるいは40個のCOCを24時間培養した後, それらのCOCを100 μ l液滴に移し, さらに24あるいは48時間培養した時, GVBDは正常に誘起され, 減数分裂は正常にMIIにまで進行した. これらのことから, 10 μ l液滴で培養して, GV期で停止しているCOCは, 明らかに正常に減数分裂を進行させる能力を保持している, すなわち生存COCであることが明らかにされた.

(3) 20個のCOCを10 μ l液滴で24時間培養したコンディション培地の10 μ l液滴で, 6個のCOCを24時間培養したところ, GVBD卵率は, 24.1%を示した. この値は, 新しい培地の10 μ l液滴で6個のCOCを培養した時の値(72.5%)に比べて著しく低い値であった. これらのことから, COCから, 培地中へ卵子のGVBDを抑制する因子が放出されることが明確にされた.

(4) 10 μ l液滴で20および40個の裸化卵子を培養した時, GVBDは抑制されなかったことから, COCが産生し培地中に放出されるGVBD抑制因子は, 卵丘細胞由来の物質と推定さ

れた。

(5) 20個のCOCを24時間培養して作成したコンディション培地の10 μ l液滴で6個の裸化卵子を24時間培養した時のGVBD卵率(66.7%)は高く、この値は、COCをコンディション培地中で培養した時のその値(24.1%)に比べて有意に高いものであった。したがって、GVBD抑制因子は卵丘細胞を介して、卵子のGVBDを抑制していると考えられた。

(6) 20個のCOCを24時間培養して作成したコンディション培地を -30°C の凍結処理あるいは 56°C 30分間および 70°C 1時間の加温処理を施した後、これらの培地で10 μ lの液滴を作成し、その中で6個のCOCを24時間培養し、核相を調べた。その結果、凍結処理区(22.5%)、 56°C 加温処理区(19.5%)および 70°C 加温処理区(22.8%)のGVBD卵率は、対照区(新鮮なコンディション培地でCOCを培養した区)のその値(24.1%)とほとんど変らなかった。これらのことから、GVBD抑制因子は、 -30°C での凍結処理、 56°C 30分間および 70°C 1時間の加温処理で、破壊されない物質と考えられた。

(7) 20個のCOCを24時間培養して作成したコンディション培地を分子量 $<3,000$ 、 $<10,000$ 、 $<100,000$ の限外濾過膜で濾過した画分を80%添加した培地で10 μ l液滴を作成し、その液滴に各6個のCOCを24時間培養した時の卵子の核相を調べた。対照区(新しい培地でCOCを培養した区)のGVBD卵子の割合(78.1%)は、コンディション対照区(限外濾過していないコンディション培地でCOCを培養した区)、 $<3,000$ 画分区、 $<10,000$ 画分区および $<100,000$ 画分区のその値(50.7、

41.0, 45.9, 56.0%)に比べて, 有意に高い値を示した. このことから, GVBD抑制因子は分子量3,000以下の物質であると推定された.

(8) 20個のCOCを24時間培養して作成したコンディション培地を0, 50, 100%含む培地の10 μ l液滴で, 6個のCOCを24および48時間培養し, 卵丘細胞の膨潤状態を調べた. 土型(全く卵丘細胞が膨潤しない)COCの割合は, コンディション培地濃度が上昇するにつれて増加し, 100%コンディション培地で培養した時には, ほとんどのCOCが土型を示した(24時間: 99.0%; 48時間: 97.1%). これらのことから, 卵丘細胞で合成されるGVBD抑制因子は, 卵丘細胞の膨潤をも抑制するものと考えられた.

(9) 以上の結果から, GVBD抑制因子は, 卵丘細胞で合成され, 培地中へ放出されることが明確にされた. また, この因子は凍結および加温処理に対して安定であり, 分子量3,000以下の物質と推定された. さらに, この因子は卵丘細胞の膨潤をも抑制することが明らかにされた.

第六章 卵核胞崩壊(GVBD)を抑制して培養したブタ卵胞卵 子の体外受精

第一節 序 論

Funahashi *et al.* (1994b)は、様々な濃度にNaClを添加した成熟培地でブタ卵丘細胞卵子複合体(COC)を通常に成熟培養し(卵核胞崩壊[GVBD]を抑制せずに48時間継続して培養する方法)、体外受精に供した。その結果、NaCl濃度が減少するにつれて精子侵入卵率および雄性前核形成率は上昇し、逆に多精子侵入卵率は低下する傾向を示したが、最も低い多精子侵入卵率の得られた区においても、50%とかなり高い値であったことを報告した。

Suzuki *et al.* (1994)は、通常に成熟培養したブタCOCを用いて、受精培地に添加する緩衝剤が精子侵入卵率に及ぼす影響を検討し、受精培地に緩衝剤であるヘペス(Hepes)を用いた場合、0.7%であった精子侵入卵率は緩衝剤として H_2CO_3 を添加することによって69.0%にまで上昇したが、この時の多精子侵入卵率は89.7%と非常に高い値であったことを報告した。

さらに、Wang *et al.* (1995)は、通常に成熟培養したブタCOCを用いて、完全合成培地での卵子の体外受精を試み、ポリビニルアルコール(polyvinylalcohol)添加mBO培地を受精培地として用い、約80%という高い精子侵入卵率と高い多精子侵入卵率(41%)を報告した。

このように、通常に成熟培養したブタCOCを用いて体外受

精を行うと、精子侵入卵率および多精子侵入卵率とも高く、正常受精卵子はほとんど得られない。したがって、より多くの正常受精卵子が得られるブタ卵子の体外成熟系を確立することは極めて重要である。

一方、Fulka *et al.* (1986) は未成熟ブタ卵子を培養開始時から、蛋白合成阻害剤であるシクロヘキシミド(cycloheximide)添加培地で培養すると、GVBDは完全に抑制されるが、培養開始12時間後までシクロヘキシミド無添加培地で培養した後、24時間後までシクロヘキシミド添加培地で培養すると、46%の卵子がGVBDを誘起することを報告した。このことは、通常の培養条件で培養され、GVBDを誘起するブタ卵子は、培養開始12時間後までに合成される蛋白しか有していないことを示す。上述した通り、通常の方法で成熟させた卵子を体外受精に供しても、正常受精卵率が極めて低い理由はこの蛋白合成が関係していることも考えられる。したがって、GVBDが誘起されるまでに通常の成熟培養で合成される以上の蛋白を合成させると卵子の成熟は十分に行われ、高い正常受精卵率が得られる可能性がある。

前章の実験において、10 μ l液滴で20個以上のCOCを24時間培養したところ、卵子のGVBDが抑制された。その後これらのCOCを100 μ l液滴に移し、さらに24時間培養すると、正常にMIIにまで進行した。すなわち、10 μ l液滴で20個以上のCOCを培養すると、核相はGV期で停止した状態で卵子の蛋白合成が24時間行なわれ、その後、GVBDは誘起され、MIIに達したと考えられる。したがって、10 μ l液滴でGVBDを抑

制し，その後成熟させる方法は，卵子を十分に成熟させ，より多くの正常受精卵子を生産出来る可能性がある。

本章では，10 μ l液滴で培養し，GVBDを抑制させたCOCをさらに培養して成熟させ，体外受精させた時，高い正常受精卵率が得られるか否かを調べる目的で行った。

実験1では10 μ l液滴で培養し，さらに100 μ l液滴で培養したCOCを用いて，受精培地に添加するウシ大卵胞液が精子侵入卵率および正常受精卵率に及ぼす影響を，実験2では10 μ l液滴で培養し，さらに100 μ l液滴で培養したCOCを用いて，精子回収時の遠心力が精子侵入卵率および正常受精卵率に及ぼす影響を検討した。さらに，実験3では10 μ l液滴で培養したCOCを100 μ l液滴に移す時に用いる成熟培地に添加したウシ大卵胞液が，精子侵入卵率および正常受精卵率に及ぼす影響を調べた。最後に，実験4として，10 μ l液滴で培養し，さらに100 μ l液滴で培養したCOCに様々な精子濃度で媒精し，媒精濃度が正常受精卵率に及ぼす影響を調べた。

第二節 材料および方法

卵巢の採取と運搬および卵胞卵子の検卵は第二章の方法に準じて行なった。また、卵胞卵子の採取は、第五章の方法と同様に行った。

ウシ大卵胞液の採取

食肉処理場で採取したウシ卵巢を0.85%生理食塩水(0.1mg/mlカナマイシンを添加し、オートクレーブをかけたもの)に浸漬して、約30℃で研究室に持ち帰った。その卵巢の直径15mm以上の正常な卵胞から10mlシリンジおよび21G注射針を用いて、卵胞の内容物を吸引し、50mlプラスチック遠沈管に入れ、 $2,200 \times g$ 、5℃で15分間、遠心分離して、顆粒層細胞および卵子を沈澱させた。上澄を56℃、30分間の非働化処理を行った後、使用時まで-80℃で保存した。

精子侵入卵率、雄性前核形成率および正常受精卵率の判定

未膨化精子頭部、膨化精子頭部あるいは雄性前核のいずれかが、精子尾部とともに観察された卵子を、精子侵入卵子と判定した。また、前核の周辺に、尾部が確認された前核を雄性前核とし、円形の第2極体とともに2つ以上の前核が確認された時、少なくとも1つの前核は雄性前核と判定した。さらに、雌性前核と雄性前核を1つずつ有する卵子を正常受精卵と判定した。

実験計画

実験1 受精培地に添加するウシ大卵胞液がブタ卵胞卵子への精子侵入卵率および正常受精卵率に及ぼす影響

10 μ l液滴に20個のCOCを入れ，24時間培養した後，それらのCOCを100 μ lの液滴に各20個入れ，さらに24時間培養した．成熟培地は，第三章と同じ組成の培地を用いた．

精液はゲッチングン系雄ミニブタから手圧法により3重ガーゼで覆った100mlビーカー内に採取した．その精液を直ちに研究室に持ち帰り，一部の精液で運動性を確認した．残り全ての精液は50mlプラスチック遠沈管に移し，20℃で18時間放置した．その後，400 \times g，37℃で10分間遠心分離して，膠様物を沈澱させ，上澄を再度700 \times g，37℃で5分間遠心分離し，運動精子を沈澱させた．上澄みを捨て，1mg/mlウシ血清アルブミン(bovine serum albumin, BSA, ナカライ)添加PBSを3ml添加し，700 \times g，37℃で5分間の遠心分離を2回繰り返して，精子を洗浄した．さらに，受精培地を1ml添加し，700 \times g，37℃で5分間遠心分離し，精子運動機能解析装置(HTM IVOS Motility Analyzer, HAMILTON THORN RESEARCH)を用いて精子濃度を測定した．その後，受精培地を用いて希釈して，最終精子濃度が 1×10^5 および 10^6 sperm/mlとなるように，成熟培養されたCOCを含む受精培地に導入して媒精した．媒精6時間後，卵子を発生培地に移し，さらに18時間培養した．受精培地には，3.05 mMグルコース，2.92 mM乳酸カルシウム，0.91 mMピルビン酸ナト

リウム, 5mMカフェイン, 50 μ g/mlゲンタマイシンを添加したTCM-199に, さらに0%, 10%, 20%, 50%および70%ウシ大卵胞液を加えて用いた. ウシ大卵胞液を添加しない区(大卵胞液0%区)の成熟培地には, 10% FCSを添加し対照区とした. 発生培地には, 50 μ g/mlゲンタマイシンおよび10%FCSを添加したTCM-199を用いた. 培養終了後, ピペッティングにより卵丘細胞を除去し, 第三章の方法に準じて卵子を固定・染色して, 精子侵入卵率, 雄性前核形成率, 多精子侵入卵率および正常受精卵率を調べた.

実験2 精子回収時の遠心力がブタ卵胞卵子の精子侵入卵率 および正常受精卵率に及ぼす影響

成熟培養および精液の採取は, 実験1と同様に行なった. 採取した精子を20 $^{\circ}$ Cで約18時間放置した後, 3等分した. 最初の精液は400 \times gで10分間遠心分離して, 膠様物を沈澱させ, その上澄みを700 \times gで5分間遠心分離し, 運動精子を沈澱させた. この区を700 \times g区とした. 2番目の精液は700 \times gで10分間遠心分離して, 膠様物を沈澱させ, その上澄みを1200 \times gで5分間遠心分離し, 運動精子を沈澱させた. この区を1200 \times g区とした. 3番目の精液は1200 \times gで10分間遠心分離して, 膠様物を沈澱させ, その上澄みを1700 \times gで5分間遠心分離し, 運動精子を沈澱させた. この区を, 1700 \times g区とした.

次に, 上澄みを捨て, BSA添加PBSを3ml添加し1700 \times g, 5分間の条件で遠心分離を2回繰り返す, 精子を洗浄した. さ

らに、受精培地を1ml添加し、 $1700 \times g$ で5分間遠心分離した。遠心分離は、全て 37°C の条件で行った。その後、精子運動機能解析装置を用いて精子濃度を測定し、受精培地を用いて希釈して、 1×10^5 および 10^6 sperm/mlの精子濃度で媒精した。媒精6時間後、卵子を発生培地に移し、さらに18時間培養した。受精培地には、 3.05 mM グルコース、 2.92 mM 乳酸カルシウム、 0.91 mM ピルビン酸ナトリウム、 5 mM カフェイン、 $50 \mu\text{g/ml}$ ゲンタマイシンおよび 10% FCSを添加したTCM-199を用いた。発生培地には、実験1と同じ組成の培地を用いた。培養終了後、ピペッティングにより卵丘細胞を除去し、固定・染色して、精子侵入卵率、雄性前核形成率、多精子侵入卵率および正常受精卵率を調べた。

実験3 成熟培地に添加するウシ大卵胞液がブタ卵胞卵子の精子侵入卵率および正常受精卵率に及ぼす影響

第三章と同じ成熟培地の $10 \mu\text{l}$ 液滴に20個のCOCを入れ24時間培養した。そして、 10 IU/ml hCG、 10 IU/ml PMSG、 $1 \mu\text{g/ml}$ 17β エストラジオール、 0.75 mM システイン(片山化学工業)を添加したTCM-199に0、10、20%ウシ大卵胞液を加えた培地の $100 \mu\text{l}$ の液滴にCOCを移し、さらに24時間培養した。ウシ大卵胞液を添加しなかった培地(大卵胞液0%区)には、 10% FCSを添加して用いた。

精液の採取、回収、洗浄および卵子の発生培養は実験1の方法で、媒精は実験2の方法と同様に行なった。培養終了後、ピペッティングにより卵丘細胞を除去し、固定・染色して、

精子侵入卵率，雄性前核形成率，多精子侵入卵率および正常受精卵率を調べた。

実験4 媒精時の精子濃度が精子侵入卵率および正常受精卵率に及ぼす影響

成熟培養の方法は実験3と同様に行ない，成熟培地に添加するウシ大卵胞液の濃度は，10%とした。精液は，2頭の異なる雄ミニブタ(18ヶ月齢の雄ブタAおよびB)から採取し，実験1と同様に精子の洗浄を行った。ウシ大卵胞液を10%添加した受精培地を用いて，雄ブタAにおいては最終精子濃度 1×10^6 ， 5×10^5 ， 1×10^5 ， 5×10^4 および 1×10^4 sperm/mlで，雄ブタBにおいては最終精子濃度 5×10^6 ， 1×10^6 ， 5×10^5 ， 1×10^5 および 5×10^4 sperm/mlでそれぞれ成熟培養卵子に媒精した。発生培養は実験1と同様に行った。培養終了後，ピペティングにより卵丘細胞を除去し，固定・染色して，精子侵入卵率，雄性前核形成率，多精子侵入卵率および正常受精卵率を調べた。

第3節 結 果

実験1 受精培地に添加するウシ大卵胞液がブタ卵胞卵子への精子侵入卵率および正常受精卵率に及ぼす影響

1×10^6 sperm/mlの精子濃度で媒精した場合，いずれの区(卵胞液0, 10, 20, 50, 70%区)においても，90%以上の著しく高い精子侵入卵率を示した．特に，卵胞液20および50%区の精子侵入卵率は100%を示した(表6-1)．しかし，卵胞液0%区の精子侵入卵率と20および50%区のものとの間，70%区の精子侵入卵率と10, 20および50%区のものとの間には有意差が認められた．

1×10^6 sperm/mlの精子濃度で媒精した時の雄性前核形成率においては，卵胞液20および50%区でかなり低い値を示し，これらの値と他の区(卵胞液0, 10, 70%区)の値との間には有意差が認められた．

また， 1×10^6 sperm/mlの精子濃度で媒精した時の多精子侵入卵率は全ての区で著しく高い値を示し，特に0, 10, 20および50%区が多精子侵入卵率は100%であった． 1×10^6 sperm/mlの精子濃度で媒精した時の正常受精卵率はいずれの区においても0%であった．

1×10^5 sperm/mlの精子濃度で媒精した場合，卵胞液0%区の精子侵入卵率に比べ，10%区の値は有意に高かった．また，卵胞液添加濃度が高くなるにつれて，精子侵入卵率は次第に減少した．

1×10^5 sperm/mlの精子濃度で媒精した時の雄性前核形成

表6-1 受精培地に添加するウシ大卵胞液が精子侵入卵率および正常受精卵率に及ぼす影響

精子濃度 (sperm/ml)	卵胞液濃度 (%)	供試卵数	精子侵入卵率 [%] (%)			
			総数	雄性前核形成卵数	多精子侵入卵数	正常受精卵数
1×10^6	0	67	63 ^{ab} [94.0]	17 ^a (27.0)	63 ^a (100.0)	0
	10	69	68 ^{bc} [98.6]	27 ^a (39.7)	68 ^a (100.0)	0
	20	69	69 ^c [100.0]	9 ^b (13.0)	69 ^a (100.0)	0
	50	70	70 ^c [100.0]	9 ^b (12.9)	70 ^a (100.0)	0
	70	63	57 ^a [90.5]	16 ^a (28.1)	55 ^a (96.5)	0
1×10^5	0	66	43 ^a [65.2]	20 ^{ab} (46.5)	33 ^{ab} (76.7)	5 ^{ab} [7.6] (11.6)
	10	62	51 ^b [82.3]	26 ^{ab} (51.0)	42 ^a (82.4)	3 ^a [4.8] (5.9)
	20	75	56 ^{ab} [74.7]	24 ^a (42.9)	44 ^{ab} (78.6)	5 ^{ab} [6.7] (8.9)
	50	75	48 ^a [64.0]	31 ^b (64.6)	31 ^b (64.6)	12 ^b [16.0] (25.0)
	70	61	21 ^c [34.4]	7 ^a (33.3)	13 ^{ab} (61.9)	2 ^a [3.3] (9.5)

[] 供試卵数に対する割合

() 精子侵入卵数に対する割合

a, b, c : 各精子濃度で媒精した時の各縦列内の異文字間に有意差あり (P<0.05)

率は，卵胞液50%区で，最高値を示した． 1×10^5 sperm/mlの精子濃度で媒精した時の多精子侵入卵率は，最も高い精子侵入卵率を示した卵胞液10%区において最高値を示した．また， 1×10^5 sperm/mlの精子濃度で媒精した時の正常受精卵率は，供試卵数に対する割合では卵胞液50%区において比較的高い値を示し，その値と10%区および70%区の値との差は有意であり，精子侵入卵数に対する割合で示した正常受精卵率では，卵胞液50%区の値が10%区および20%区の値より有意に高かった．

実験2 精子回収時の遠心力がブタ卵胞卵子の精子侵入卵率 および正常受精卵率に及ぼす影響

1×10^6 sperm/mlの精子濃度で媒精した場合，いずれの遠心力区間においても精子侵入卵率に有意差は認められなかった(表6-2)．雄性前核形成率は，遠心力が強くなるにつれて減少し，遠心力700×g区および1700×g区との間に有意差が認められた．多精子侵入卵率および正常受精卵率においては，いずれの区間にも有意差は認められなかったが，正常受精卵率は全ての区において，10%以上の高い値を示した．

1×10^5 sperm/mlの精子濃度で媒精した場合，精子侵入卵率は精子回収時の遠心力が強くなるにつれて有意に減少した．雄性前核形成率も，同じ傾向を示したが，いずれの区間(700×g区，1200×g区，1700×g区)にも有意差は認められなかった．さらに，多精子侵入卵率においても，精子回収時の遠心力1700×g区において，700および1200×g区に比べて有

表6-2 精子回収時の遠心力が精子侵入卵率および正常受精卵率に及ぼす影響

精子濃度 (sperm/ml)	精子回収時の 遠心力 (×g)	供試 卵数	精子侵入卵子 [%] (%)			
			総数	雄性前核 形成卵数	多精子 侵入卵数	正常受精 卵数
1×10 ⁶	700	108	69 ^a [63.9]	47 ^a (68.1)	42 ^a (60.9)	14 ^a [13.0] ^a (20.3) ^a
	1200	106	71 ^a [67.0]	39 ^{ab} (54.9)	50 ^a (70.4)	10 ^a [9.4] ^a (14.1) ^a
	1700	107	74 ^a [69.2]	29 ^b (39.2)	47 ^a (63.5)	11 ^a [10.3] ^a (14.9) ^a
1×10 ⁵	700	112	67 ^a [59.8]	41 ^a (61.2)	40 ^a (59.7)	18 ^a [16.1] ^a (26.9) ^a
	1200	109	48 ^b [44.0]	27 ^a (56.3)	27 ^a (56.3)	11 ^{ab} [10.1] ^{ab} (22.9) ^a
	1700	96	18 ^c [18.8]	9 ^a (50.0)	4 ^b (22.2)	6 ^b [6.3] ^b (33.3) ^a

[] 供試卵数に対する割合

() 精子侵入卵数に対する割合

a, b, c : 各精子濃度で媒精した時の各縦列内の異文字間に有意差あり (P<0.05)

意に低い値を示した。正常受精卵率は、いずれの区も23～33%とかなり高い値を示したが、有意な差は認められなかった。

実験3 成熟培地に添加するウシ大卵胞液がブタ卵胞卵子の精子侵入卵率および正常受精卵率に及ぼす影響

1×10^6 sperm/mlの精子濃度で媒精した場合、精子侵入卵率は卵胞液濃度が高くなるにつれて、徐々に低下したが、有意な差は認められなかった(表6-3)。また、 1×10^6 sperm/mlの精子濃度で媒精した時の雄性前核形成率においても、いずれの区間にも有意な差は認められなかったが、卵胞液10%区がかなり高い値を示し、この区が多精子侵入卵率は最も低かった。この値と、0%区が多精子侵入卵率との差は有意であった。

1×10^6 sperm/mlの精子濃度で媒精した時の、正常受精卵率は、供試卵数に対する割合においても、精子侵入卵数に対する割合においても、卵胞液10%区で、最高値を示し、これらの値は0%区のそれらの値に比べて有意に高かった。

1×10^5 sperm/mlの精子濃度で媒精した場合、卵胞液10%区において、最も高い精子侵入卵率を示し、この値は、20%区のその値に比べて有意に高かった。 1×10^5 sperm/mlの精子濃度で媒精した時の雄性前核形成率は、卵胞液10%および20%区が、0%区に比べて著しく高く、卵胞液10%区と0%区との差は有意であった。また、 1×10^5 sperm/mlの精子濃度で媒精した時の多精子侵入卵率は卵胞液10%および20%区が、

表6-3 成熟培地に添加するウシ大卵胞液が精子侵入卵率および正常受精卵率に及ぼす影響

精子濃度 (sperm/ml)	卵胞液濃度 (%)	供試卵数	精子侵入卵率 [%] (%)			
			総数	雄性前核形成卵数	多精子侵入卵数	正常受精卵数
1×10^6	0	114	82 ^a [71.9]	62 ^a (75.6)	63 ^a (76.8)	13 ^a [11.4] (15.9) ^a
	10	112	74 ^a [66.1]	60 ^a (81.1)	43 ^b (58.1)	24 ^b [21.4] (32.4) ^b
	20	108	70 ^a [64.8]	55 ^a (78.6)	47 ^{ab} (67.1)	18 ^{ab} [16.7] (25.7) ^{ab}

1×10^5	0	102	59 ^a [57.8]	40 ^a (67.8)	45 ^a (76.3)	9 ^a [8.8] (15.3) ^a
	10	109	71 ^a [65.1]	60 ^b (84.5)	37 ^b (52.1)	27 ^b [24.8] (38.0) ^b
	20	120	52 ^b [43.3]	43 ^{ab} (82.7)	22 ^b (42.3)	27 ^b [22.5] (51.9) ^b

[] 供試卵数に対する割合

() 精子侵入卵数に対する割合

a,b : 各精子濃度で媒精した時の各縦列内の異文字間に有意差あり (P<0.05)

0%区に比べて著しく低い値を示し、これらの差は有意であった。

1×10^5 sperm/mlの精子濃度で媒精した場合、供試卵数に対する正常受精卵子の割合においては、10%添加区が最高値を示し、この値は0%区に比べて有意に高かった。精子侵入卵数に対する正常受精卵子の割合においては、卵胞液濃度が上昇するにつれて増加し、卵胞液10および20%区の正常受精卵率と0%区との間には有意な差が認められた。

実験4 媒精時の精子濃度が精子侵入卵率および正常受精卵率に及ぼす影響

雄豚Aの精子を様々な濃度で、10%卵胞液添加受精培地を用いて、媒精した時の卵子の精子侵入卵率および正常受精卵率を調べ、表6-4に示した。 1×10^6 および 5×10^5 sperm/mlの精子濃度で媒精した時、ほぼ全ての卵子に精子が侵入していたが、精子濃度が減少するにつれて、精子侵入卵率は有意に低下した。

雄豚Aの精液を用いた時の、雄性前核形成率は、比較的低い精子濃度区(1×10^5 , 5×10^4 , 1×10^4 sperm/ml区)において、高い値を示し、これらの値は、 5×10^5 sperm/ml区の値に比べて有意に高かった。精子侵入卵率が著しく高かった精子濃度 1×10^6 および 5×10^5 sperm/ml区においては、全ての卵子が多精子侵入卵子であり、精子濃度が減少するにつれて、多精子侵入卵率も有意に低下した。

雄豚Aの精液を用いた場合、精子濃度 1×10^6 および 5×10^5

表6-4 雄ブタAおよびBの精子を用いて様々な精子濃度で媒精した時の精子侵入卵率および正常受精卵率

精子濃度 (sperm/ml)	供試 卵数	精子侵入卵子 [%] (%)			
		総数	雄性前核 形成卵数	多精子 侵入卵数	正常受精 卵数
雄 ブ タ A の 精 子	1×10^6	120 [100.0] ^a	66 (55.0) ^{ab}	120 (100.0) ^a	0 [0.0] ^a (0.0) ^a
	5×10^5	111 [99.1] ^a	49 (44.5) ^a	110 (100.0) ^a	0 [0.0] ^a (0.0) ^a
	1×10^5	137 [81.8] ^b	79 (70.5) ^c	89 (79.5) ^b	19 [13.9] ^b (17.0) ^b
	5×10^4	136 [56.6] ^c	52 (67.5) ^{bc}	47 (61.0) ^c	24 [17.6] ^b (31.2) ^c
	1×10^4	130 [18.5] ^d	24 (87.5) ^c	7 (29.2) ^d	16 [12.3] ^b (66.7) ^d
雄 ブ タ B の 精 子	5×10^6	90 [95.6] ^a	58 (67.4) ^a	69 (80.2) ^a	10 [11.1] ^{ab} (11.6) ^{ab}
	1×10^6	95 [100.0] ^b	69 (72.6) ^a	88 (92.6) ^b	5 [5.3] ^{ac} (5.3) ^a
	5×10^5	101 [100.0] ^b	86 (85.1) ^b	79 (78.2) ^a	19 [18.8] ^b (18.8) ^b
	1×10^5	91 [26.4] ^c	24 (75.0) ^{ab}	18 (16.7) ^c	4 [16.5] ^b (62.5) ^c
	5×10^4	88 [3.4] ^d	3 (100.0) ^{ab}	3 (33.3) ^{ac}	1 [2.3] ^c (66.7) ^c

[] 供試卵数に対する割合

() 精子侵入卵数に対する割合

a, b, c, d : 各雄ブタの精子で媒精した時の各縦列内の異文字間に有意差あり (P<0.05)

sperm/ml区では、正常受精卵子は全く観察されなかったが、それ以外の区(1×10^5 sperm/ml区, 5×10^4 sperm/ml区, 1×10^4 sperm/ml区)ではかなり高い割合で観察された。特に、供試卵数に対する割合では、精子濃度 5×10^4 sperm/ml区で最高値を示した。しかし、精子侵入卵数に対する正常受精卵率では、精子濃度が低下するにつれて、有意に上昇し、精子濃度 1×10^4 sperm/ml区では、著しく高い値(66.7%)を示した。

雄豚Bの精子を用いて媒精した時の精子侵入卵率、雄性前核形成率、多精子侵入卵率および正常受精卵率を表6-4に示した。精子濃度 5×10^6 , 1×10^6 , 5×10^5 sperm/ml区の精子侵入卵率は、いずれも、95%以上の値を示したが、それ以下の精子濃度区(1×10^5 sperm/ml区, 5×10^4 sperm/ml区)の精子侵入卵率は著しく減少した。

雄豚Bの精子を用いた時の雄性前核形成率は、すべての区で、65%以上の値を示した。特に、精子濃度 5×10^5 sperm/ml区の雄性前核形成率は高く、この値は、 5×10^6 および 1×10^6 sperm/ml区の値に比べて有意に高かった。

雄豚Bの精子を用いた時の多精子侵入卵率は精子濃度 1×10^6 sperm/ml区において最高値を示し、この値と 5×10^6 および 5×10^5 sperm/ml区の値の間には有意差が認められた。また、精子侵入卵率の低かった 1×10^5 および 5×10^4 sperm/ml区が多精子侵入卵率は低かった。

雄豚Bの精子を用いた時の供試卵数に対する正常受精卵率では、精子濃度 5×10^5 および 1×10^5 sperm/ml区が比較的高

い値を示し，これらの値と 1×10^6 sperm/ml区の正常受精卵率との間には有意差が認められた．精子侵入卵数に対する正常受精卵子の割合においては，精子侵入卵率の低かった精子濃度 1×10^5 および 5×10^4 sperm/ml区で極めて高い値(62.5%，66.7%)を示し，これらの値は，他の区のものに比べて有意であった．

第四節 考 察

受精培地に添加するウシ大卵胞液がブタ卵子の精子侵入卵率に及ぼす影響を検討した実験1において、 1×10^5 sperm/mlの精子濃度で媒精した時の卵胞液10%区の精子侵入卵率は0%区に比べて有意に高く、それ以上添加卵胞液濃度が高くなると、精子侵入卵率は徐々に減少した(表6-1)。このことから、ブタ卵子の体外受精において、受精培地に添加するウシ大卵胞液の濃度は10%が適当と考えられた。

Ghetler *et al.* (1990) は、ヒト卵胞液を50%添加した前培養培地で15分間培養したヒト精子を卵子に媒精すると、卵胞液無添加培地で前培養した対照区の精子に比べて、有意に高い精子侵入卵率を示したことを報告した。本実験では精子の前培養は行なわずウシ大卵胞液を添加した受精培地を用いて、 1×10^5 sperm/mlの精子濃度で受精させた。卵胞液10%区の精子侵入卵率は、0%区に比べて有意に高い値を示した(表6-1)。このことは、受精培地に添加したウシ大卵胞液が、卵子への精子侵入を即効的に促進させたことを示す。すなわち、ウシ大卵胞液がブタ精子の侵入能を向上させる作用は即効性であるものと考えられた。

受精培地に添加した卵胞液がブタ卵子への精子侵入卵率に及ぼす影響を検討した実験では(実験1)、卵胞液としてウシ卵胞由来のものを使用した。したがって、卵子および精子の種と異なる種の卵胞液を受精培地に添加したことになる。しかし、 1×10^5 sperm/mlの精子濃度で媒精した時、卵胞液10%添加区では、対照区に比べて精子侵入卵率は著しく上昇

した(表6-1)。このことは、ウシ大卵胞液が、ブタ精子の侵入卵率を上昇させることを示す。Siegel & Graczykowski (1991)も、8mm以上のブタ卵胞から採取した卵胞液を前培養培地に25および50%となるように添加し、その培地でヒト精子を前培養し、ヒト卵子に媒精すると、卵胞液無添加区に比べて有意に高い精子侵入卵率を示したことを報告した。したがって、体外受精に用いる卵子および精子と、受精培地に添加すると精子の侵入能を上昇させる卵胞液の因子には種特異性はないものと推察される。

モルモットおよびウサギにおいては、完全に先体反応を起こした精子でも、卵子の透明帯と接着できる(Fleming & Yanagimachi, 1982; Kuzan *et al.*, 1984)が、ブタ、マウスおよびハムスターにおいては、完全に先体反応を起こした精子は卵子の透明帯に接着できない(Saling & Storey, 1979; Bleil *et al.*, 1988)ことから、Funahashi & Day (1993)は、高濃度のブタ卵胞液はブタ精子の先体反応を著しく促進させるため、精子の透明帯への接着が抑制され、その結果として、精子侵入卵率を低下させると結論した。

実験1の 1×10^5 sperm/mlの精子濃度で媒精した時、受精培地に添加するウシ大卵胞液10%添加区では、対照区に比べて精子侵入卵率は有意に上昇したが、それ以上卵胞液濃度が高くなると、徐々に精子侵入卵率は低下した(表6-1)。この精子侵入卵率に及ぼす卵胞液濃度の影響を上述のFunahashi & Day (1993)の結論をもとに考察すると、受精培地に添加するウシ大卵胞液は低濃度で用いるとブタ精子の受精能獲得を誘

起させる程度の作用で精子侵入卵率を上昇させるが、高濃度ではブタ精子の完全な先体反応を短時間に誘起するため、精子侵入卵率が低下したものと推察される。

一般に、体外受精に用いるブタ精子洗浄時の遠心力は、 $250 \times g$ (Zheng & Sirard, 1992), $400 \times g$ (Nagai *et al.*, 1984; 加野ら, 1993), $500 \times g$ (Ocampo *et al.*, 1994), $800 \times g$ (Behalova *et al.*, 1993), $1000 \times g$ (Mattioli *et al.*, 1989), $1200 \times g$ (Coy *et al.*, 1993; Martinez *et al.*, 1993; Funahashi *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 1994)等が使用されている。

実験2において、精子回収時の遠心力 $700 \times g$ 区は、まず $400 \times g$ で膠様物を取り除き、その上澄みを $700 \times g$ で遠心して精子を回収し、 $1700 \times g$ で精子を洗浄した区である。精子回収時の遠心力 $1200 \times g$ 区は、まず $700 \times g$ で膠様物を取り除き、その上澄みを $1200 \times g$ で遠心して精子を回収し、 $1700 \times g$ で精子を洗浄した区である。さらに、精子回収時の遠心力 $1700 \times g$ 区は、まず $1200 \times g$ で膠様物を取り除き、その上澄みを $1700 \times g$ で遠心して精子を回収し、 $1700 \times g$ で精子を洗浄した区である。つまり、遠心力 $700 \times g$ 区の精子は、 $400 \times g$ から $700 \times g$ までの遠心力で沈殿する精子であり、遠心力 $1200 \times g$ 区の精子は、 $700 \times g$ から $1200 \times g$ までの遠心力で沈殿する精子であり、遠心力 $1700 \times g$ 区の精子は、 $1200 \times g$ から $1700 \times g$ までの遠心力で沈殿する精子である。

精子回収時の遠心力が精子侵入卵率に及ぼす影響を調べた実験2において、 1×10^6 sperm/mlの精子濃度で媒精した時は、

いずれの区(700×g区, 1200×g区および1700×g区)においても60%以上の高い精子侵入卵率を示し, 各区間に有意差は認められなかったが, 1×10^5 sperm/mlで媒精した時は, 遠心力が強くなるにつれて, 精子侵入卵率は有意に低下した(表6-2). したがって, より強い遠心力で沈澱される精子ほど, 卵子へ侵入する能力が劣ると推察された.

実験3における 1×10^6 sperm/mlの精子濃度で媒精した場合, 成熟培地に添加する卵胞液の濃度が上昇するにつれて, 精子侵入卵率は徐々に低下した. また, 1×10^5 sperm/mlで媒精した時の卵胞液20%区の精子侵入卵率は著しく低かった. この値は他の区(卵胞液0および10%区)のそれに比べて有意に低い値であった(表6-3). このことは, 比較的高い濃度のウシ大卵胞液(20%)を添加した成熟培地で卵子を成熟培養した後, 媒精すると, 精子侵入卵率が低下することを示しているが, この理由は明らかでない.

1×10^6 sperm/mlの精子濃度で媒精した実験3の雄性前核形成率は, 卵胞液10および20%区が0%区に比べてかなり高い値を示し, 1×10^5 sperm/mlの精子濃度で媒精した時も, 卵胞液10および20%区の雄性前核形成率は, 0%区に比べてかなり高い値を示し, 卵胞液0%区と10%区との間には有意差が認められた(表6-3). これらのことから, 成熟培地に添加するウシ大卵胞液は, 雄性前核形成を促進する, すなわち卵子の細胞質の成熟を促進すると考えられた.

精子濃度が卵子への精子の侵入に及ぼす影響を調べた実験4において, 雄ブタAおよび雄ブタBのいずれの精液を用いた

場合においても精子侵入卵率が上昇するにつれて，多精子侵入卵率も増加した(表6-4)．このように，精子侵入卵率が上昇すれば，多精子侵入卵率も増加するので，多精子侵入が抑制されたか否かを調べる場合，精子侵入卵率がほぼ同じ値を示す区間で比較しなくてはならない．

成熟培地に添加するウシ大卵胞液が卵子の精子侵入卵率および正常受精卵率に及ぼす影響を調べた実験3における 1×10^6 sperm/mlの精子濃度で媒精した場合，精子侵入卵率はいずれの区(卵胞液0%区，10%区および20%区)もほぼ同じ値を示したが，その時の多精子侵入卵率は，対照区(卵胞液0%区)に比べて，卵胞液10%区および20%区でかなり低い値を示し，対照区と10%区の間には有意差が認められた．また， 1×10^5 sperm/mlの精子濃度で媒精した時の精子侵入卵率は対照区に比べて，卵胞液10%区でかなり高い値を示したにもかかわらず，多精子侵入卵率は，対照区(76.3%)に比べて，卵胞液10%区(52.1%)で有意に低い値を示した(表6-3)．これらの結果から，成熟培地に添加するウシ大卵胞液は，卵子の多精子拒否反応を誘起する能力を上昇させる，すなわち，成熟培地に添加するウシ大卵胞液は，卵子の細胞質の成熟を促進すると推察された．

雄ブタAおよびBの精液を用いて体外受精を行い媒精時の精子濃度が精子侵入卵率に及ぼす影響を調べた実験4において， 1×10^5 sperm/mlの精子濃度で媒精した時の雄ブタAの精子侵入卵率は81.8%，雄ブタBのそれは26.4%であった．また， 5×10^4 sperm/mlの精子濃度で媒精した時も，雄ブタAの精

子侵入卵率は56.6%，雄ブタBのそれは3.4%であり，雄ブタBを用いた時が著しく低い精子侵入卵率を示した(表6-4)．これらのことから，精液を採取するブタ个体によって，体外受精時の精子侵入卵率は異なることが明らかにされた．

ブタ体外受精において，精液を採取する雄ブタによって，精子侵入卵率が異なることは Nagai *et al.*(1988)，Wang *et al.*(1991)，Vazquez *et al.*(1993)，Wang *et al.*(1995) によっても報告されている．

前述した通り，多精子侵入が抑制されたか否かを調べる場合，精子侵入卵率がほぼ同じ値を示す区間で比較しなくてはならない．そこで，実験4の精子侵入卵率が90%以上の区が多精子侵入卵率を雄ブタAを用いた場合と雄ブタBを用いた場合とで比較した．雄ブタAでは，精子侵入卵率が100%および99.1%を示した精子濃度 1×10^6 および 5×10^5 sperm/ml区において，多精子侵入卵率はそれぞれ100および100%であった．雄ブタBを用いた場合，精子侵入卵率が95.6%，100%および100%を示した精子濃度 5×10^6 ， 1×10^6 および 5×10^5 sperm/ml区が多精子侵入卵率はそれぞれ80.2，92.6，78.2%であった(表6-4)．これらの結果は雄ブタAの精子より雄ブタBの精子が，多精子侵入の起こり難い精子であることを示している，すなわち，雄ブタBの精子が，卵子の多精子拒否反応を起こし易い精子であることを示す．このようにブタ个体によって媒精後の多精子侵入卵率に違いがあることを明らかにした報告は他には見当たらない．

多精子拒否反応は精子と卵原形質膜との融合により，精子

内の細胞質因子が，卵細胞質内に放出され， Ca^{2+} オスシレーション(oscillation)が起こり，それによって表層顆粒が放出されることによって誘起される (Cuthbertson & Cobbold, 1985 ; Fissore *et al.*, 1992 ; Sun *et al.*, 1992 ; Ben-Yosef *et al.*, 1993 ; Kline & Kline, 1992). さらに，精子の細胞質因子を成熟卵子にマイクロインジェクションすることにより， Ca^{2+} オスシレーションが誘起されることが，マウス，ハムスター (Swann, 1990, 1992, 1994) およびヒト (Homa & Swann, 1994) で報告されている。

本実験において，雄ブタAの精子より雄ブタBの精子が，多精子侵入の起こし難い精子，すなわち，多精子拒否反応能の高い精子であったことは，精子を採取する個体によって，精子の Ca^{2+} オスシレーションを誘起させる細胞質因子が量的あるいは質的に多いことによって， Ca^{2+} オスシレーション，表層顆粒の放出，さらに多精子拒否反応が強く現われた可能性がある。

一般的にブタの体外受精においては，精子侵入卵率が高くなると，多精子侵入卵率も高くなるので，供試卵数に対する正常受精卵率は減少する。逆に，精子侵入卵率が低いと多精子侵入卵率は低くなるが，精子侵入卵数自体が少数になるので正常受精卵数も減少する。すなわち供試卵数に対する正常受精卵率は低下する。したがって，より多くの正常受精卵子を得るためには，供試卵数に対する正常受精卵率が最高値となるような媒精時の精子濃度を決定しなくてはならない。

実験4では，雄ブタAの精液を用いた場合，精子濃度 $5 \times$

10^4 sperm/ml区において、最も高い供試卵数に対する正常受精卵率を示した。また、雄ブタBの精液を用いた場合、 5×10^5 sperm/ml区において、最も高い供試卵数に対する正常受精卵率を示した(表6-4)。このことから、個体によって、最も高い供試卵数に対する正常受精卵率の得られる精子濃度が異なることが明らかとなった。したがって、ブタ体外受精でより多くの正常受精卵子を得るためには、精子を採取する個体毎に、最も高い正常受精卵率の得られる精子濃度を確認する必要がある。

成熟培地に添加するウシ大卵胞液が正常受精卵率に及ぼす影響を調べた実験3において、精子濃度 1×10^6 sperm/mlで媒精した時の卵胞液10%区において、21.4%の供試卵数に対する正常受精卵率を示した。また、精子濃度 1×10^5 sperm/mlで媒精した時の卵胞液10%および20%区において、24.8および22.5%の供試卵数に対する正常受精卵率を示した(表6-3)。

Yoshida *et al.*(1992b) は、GVBDを抑制しない通常の成熟培養法で36時間成熟培養した卵子を用いて体外受精を行い、20%の供試卵数に対する正常受精卵率を得た。本実験で得られた供試卵数に対する正常受精卵率は、20%以上の値であった。したがって、 $10 \mu\text{l}$ 液滴で培養したGVBD抑制卵子をさらに培養する成熟培養法は、今までの報告と同等かそれ以上の正常受精卵率の得られる方法である可能性が示唆された。

要 約

(1) 10 μ l液滴で24時間培養した後、さらに100 μ l液滴で24時間培養したブタ卵子に、ウシ大卵胞液を0, 10, 20, 50, 70%となるように添加した受精培地を用いて、精子濃度 10^5 sperm/mlで媒精した。卵胞液10%添加区の精子侵入卵率(82.3%)は0%区(65.2%)に比べて有意に高く、それ以上卵胞液濃度が高くなると、精子侵入卵率は徐々に減少した(74.7, 64.0, 34.4%)。このことから、ブタ卵子の体外受精において、受精培地に添加するウシ大卵胞液の濃度は10%が適当と考えられた。

(2) 700, 1200, 1700 \times gで回収した後、1700 \times gで洗浄した精子を用いて、10 μ l液滴で24時間培養した後、さらに100 μ l液滴で24時間培養したブタ卵子に、精子濃度 1×10^5 sperm/mlで媒精した時、遠心力が強くなるにつれて、精子侵入卵率は有意に低下した(59.8, 44.0, 18.8%)。したがって、より強い遠心力で沈澱される精子ほど、卵子へ侵入する能力が劣ると推定された。

(3) 10 μ l液滴で24時間培養した後、ウシ大卵胞液を0, 10, 20%添加した成熟培地の100 μ l液滴でさらに24時間培養して成熟させた卵子に精子濃度 1×10^6 sperm/mlおよび 1×10^5 sperm/mlで媒精した。精子濃度 1×10^6 sperm/mlで媒精した時の卵胞液10および20%区(81.1, 78.6%)の雄性前核形成率は、0%区(75.6%)に比べてかなり高く、精子濃度 1×10^5 sperm/mlで媒精した時の卵胞液10%区(84.5%)の雄性前

核形成率は、0%区(67.8%)より有意に高かった。これらのことから、成熟培地に添加するウシ大卵胞液は、雄性前核形成を促進する、すなわち卵子の細胞質の成熟を促進すると考えられた。

(4) 10 μ l液滴でCOCを24時間培養した後、ウシ大卵胞液を0, 10, 20%添加した成熟培地の100 μ l液滴でさらに24時間培養して成熟させた卵子に精子濃度 1×10^6 sperm/mlおよび 1×10^5 sperm/mlで媒精した。精子濃度 1×10^6 sperm/mlで媒精した時の精子侵入卵率はいずれの区もほぼ同じ値を示した(64.8~71.9%)が、卵胞液10%区(58.1%)および20%区(67.1%)の多精子侵入卵率は、0%区(76.8%)に比べて、かなり低い値を示し、0%区と10%区の間には有意差が認められた。また、精子濃度 1×10^5 sperm/mlで媒精した時の卵胞液10%区(65.1%)の精子侵入卵率は0%区(57.8%)に比べて高い値を示したが、卵胞液10%区(52.1%)の多精子侵入卵率は、0%区(76.3%)に比べて、有意に低い値を示した。これらの結果から、成熟培地に添加するウシ大卵胞液は卵子の多精子拒否反応を誘起する能力を上昇させると推察された。

(5) 10 μ l液滴で24時間培養した後、さらに100 μ l液滴で24時間培養したブタ卵子に、雄ブタAおよびBの精液を用いて、種々の精子濃度で媒精した。精子濃度 1×10^5 sperm/mlで媒精した時の雄ブタAの精子侵入卵率は81.8%、雄ブタBのそれは26.4%であった。また、精子濃度 5×10^4 sperm/mlで媒精した時も、雄ブタAの精子侵入卵率は56.6%、雄ブタBのそれは3.4%であった。これらのことから、精液を採取する

ブタ個体によって体外受精時の精子侵入卵率は異なることが明らかにされた。

(6) 10 μ l液滴で24時間培養した後，さらに100 μ l液滴で24時間培養したブタ卵子に，雄ブタAおよびBの精液を用いて種々の精子濃度で媒精し，精子侵入卵率が90%以上を示す区が多精子侵入卵率を雄ブタAを用いた場合と雄ブタBを用いた場合とで比較した。雄ブタAでは，精子侵入卵率が100%および99.1%を示した精子濃度 1×10^6 sperm/mlおよび 5×10^5 sperm/ml区において，多精子侵入卵率はそれぞれ100%であったが，雄ブタBを用いた場合の精子侵入卵率が95.6%，100%および100%を示した精子濃度 5×10^6 sperm/ml， 1×10^6 sperm/mlおよび 5×10^5 sperm/ml区が多精子侵入卵率はそれぞれ80.2，92.6，78.2%であった。これらの結果は雄ブタAの精子より雄ブタBの精子が，多精子侵入し難い精子であることを示している，すなわち，雄ブタBの精子が，卵子の多精子拒否反応を起こし易い精子と考えられた。

(7) 10 μ l液滴で24時間培養した後，さらに100 μ l液滴で24時間培養したブタ卵子に，雄ブタAおよびBの精液を用いて，種々の精子濃度で媒精した。雄ブタAの精液を用いた場合，精子濃度 5×10^4 sperm/ml区において，最も高い供試卵数に対する正常受精卵率を示した(17.6%)。また，雄ブタBの精液を用いた場合， 5×10^5 sperm/ml区において，最も高い供試卵数に対する正常受精卵率を示した(18.8%)。このことから，個体によって，高い供試卵数に対する正常受精卵率の得

られる精子濃度は異なることが明らかにされた。

(8) 10 μ l液滴で24時間培養した後，100 μ l液滴でさらに24時間培養したCOCを用いた体外受精でかなり高い供試卵数に対する正常受精卵率(21.4%，24.8および22.5%)の得られることが明らかとなった。このことから，10 μ l液滴で培養したGVBD抑制卵子をさらに培養して成熟させる方法は，多数の正常受精卵子を生産する有効な手法である可能性が示唆された。

第七章 総合論議

核移植によるクローン動物や形質転換動物の作成に関する研究あるいは優良家畜の配偶子保存に関する研究には、非常に多くの卵子が必要であるから、卵巣内に多数存在する未発育卵子の利用を可能にすることが必要である。しかし、未発育卵子は卵核胞崩壊(GVBD)を誘起する能力さえ有していない。したがって、発育卵子を用いてブタ卵子GVBD誘起機序を解明することが必要である。

発育卵子のGVBDは、卵子内の成熟促進因子(maturation promoting factor, MPF)の活性化によって誘起される(Naito & Toyoda, 1991)。このMPFを活性化させるGVBDの引き金は、卵丘細胞-卵子間ギャップ結合の切断 (Dekel & Beer, 1980; Dekel *et al.*, 1981) あるいは卵丘細胞間ギャップ結合の切断(Eppig, 1982; Salustri & Siracusa, 1983; Larsen *et al.*, 1986, 1987; Wert & Larsen, 1989) であることが、齧歯類卵子で報告されている。しかし、ブタ卵子におけるGVBDと卵丘細胞間ギャップ結合の切断との関係はほとんど検討されていない。そこで本論文では、ブタ卵子に付着する卵丘細胞のGVBDあるいはその後の減数分裂進行に対する役割を検討した。

まず、卵丘細胞が卵子の減数分裂の進行に及ぼす影響を調べるために、培養開始0, 8, 16, 20, 24, 28および32時間後に卵子から卵丘細胞を除去し、それらの裸化卵子をさらに培養して、卵子の核相を調べた。

培養開始0, 8, 16, 20, 24, 28および32時間後に卵丘細

胞を除去し、その裸化卵子を培養開始48時間後まで培養した時のGV卵子の割合は、卵丘細胞を除去しなかった卵子に比べて有意に低い値を示した(第三章, 表3-2, 4, 6, 7, 8, 9, 10). また, 培養開始20および24時間後に卵丘細胞を除去し、さらに48時間後まで培養した時, 卵丘細胞を除去しなかった卵子に比べて, GVBD卵率は有意に上昇し, ProMIからTIまでの卵子の合計の割合は有意に低下し, 成熟卵率は有意に増加した(第三章, 表3-7, 8). これらのことから, 卵子の減数分裂の進行(GVBDおよびProMIからTIまでの進行)は卵子に付着した卵丘細胞によって抑制されていると考えられた.

また, 24時間培養したCOCの一部から卵丘細胞を除去し, その裸化卵子と残りのCOCとを共培養したところ, 裸化卵子の成熟卵率はCOCに比べて有意に高かった(第三章, 表3-11). このことから, 卵丘細胞が生産し, ギャップ結合を介して卵子へ移行する因子が卵子のGVBDとProMIからTIまでの減数分裂の進行を抑制していると推測された.

さらに, ブタCOCを0, 8, 16, 24, 32, 40および48時間培養し, 経時的にGVBD卵率とギャップ結合の切断状態を調べ, 両者の関係を比較検討した. 培養0, 8, 16, 24, 32時間後の卵丘細胞-卵子間ギャップ結合の切断を意味するIV型COCの割合は, GVBD卵率よりも常に低い値を示した(第四章, 図4-2). また, 少なくとも最外層の卵丘細胞間ギャップ結合が切断されていることを示すII型, III型およびIV型COCの合計の割合は, COCをいずれの時間培養した時においても, GVBD卵率よりやや高い値を示し, 両者の間には有意な高い

相関が認められた($r=0.96$, $P<0.01$). これらのことから、卵丘細胞で生産されたGVBDを抑制する因子の移行が、卵丘細胞間ギャップ結合の切断によって遮断され、ブタ卵子のGVBDが誘起されると推察された。

また、 $10\mu\text{l}$ 液滴で20個以上のCOCを24時間培養すると、卵子のGVBDが抑制されると報告(Petr *et al.*, 1989)されている。そこで、 $10\mu\text{l}$ 液滴で培養したCOCにおいても卵丘細胞間ギャップ結合の切断がGVBDの引き金か否かを検討するために、 $10\mu\text{l}$ 液滴で1, 3, 6, 10, 20および40個のCOCを培養した時のCOCのギャップ結合の切断状態とGVBD卵率を調べた。IV型COC(卵丘細胞-卵子間ギャップ結合が切断されているCOC)の割合は、常にGVBD卵率よりも低い値を示した(第四章, 図4-3)。また、 $10\mu\text{l}$ 液滴で1, 3, 6, 10, 20個のCOCを培養した時、II型, III型およびIV型COCの合計の割合(少なくとも最外層の卵丘細胞間ギャップ結合が切断されているCOCの割合)は、GVBD卵率よりやや高い値を示し、両者間には有意な高い相関が認められた($r=0.98$, $P<0.01$)。これらの結果から、 $10\mu\text{l}$ 液滴で培養したCOCにおいても、卵丘細胞間ギャップ結合の切断によって、卵丘細胞で生産されるGVBDを抑制する因子の移行が遮断され、ブタ卵子のGVBDが誘起されると推察された。

$10\mu\text{l}$ 液滴で20個以上のCOCを培養した時、ほとんどの卵子のGVBDが抑制されたことから、その培地は卵子のGVBDを抑制する因子を含む可能性が考えられた。そこで、 $10\mu\text{l}$ 液滴で20個のCOCを培養した培地(コンディション培地)で6個

のCOCを24時間培養した。その卵子のGVBD卵率は、対照区(新しい培地で6個のCOCを培養した区)に比べて有意に低かった(第五章, 表5-5)。このことから、卵丘細胞あるいは卵子でGVBD抑制因子が生産され、培地へ放出されていると考えられた。

このGVBD抑制因子の生産場所を明らかにする目的で、10 μ l液滴で20個および40個の裸化卵子を培養した。20個(73.0%)および40個(61.0%)を培養した裸化卵子のGVBD卵率は、10 μ l液滴で20(20.6%)および40個(12.8%)のCOCを培養した時のGVBD卵率に比べて有意に高かった(第五章, 表5-2)。このことから、COCから培地中へ放出されるGVBD抑制因子は卵丘細胞由来のものと考えられた。

次に、10 μ l液滴で20個のCOCを培養したコンディション培地で6個のCOCおよび裸化卵子を24時間培養したところ、COCのGVBD卵率(24.1%)は、裸化卵子(66.7%)のそれに比べて有意に低かった(第五章, 表5-5)。したがって、卵丘細胞から培地に放出されるGVBD抑制因子は、卵丘細胞を介して卵子のGVBDを抑制していると考えられた。

さらに、10 μ l液滴で20個のCOCを培養したコンディション培地を-30 $^{\circ}$ Cの凍結処理および56 $^{\circ}$ C30分間あるいは70 $^{\circ}$ C1時間の加温処理を行い、それらのコンディション培地の10 μ l液滴に各6個のCOCを入れ24時間培養したところ、いずれの処理を行ったコンディション培地でも19.5~22.8%の低いGVBD卵率を示し、対照区(新鮮なコンディション培地で培養したCOC)のその値(24.1%)との間に有意差は認められな

った(第五章, 表5-6, 8). このことから, GVBD抑制因子は -30°C の凍結処理および 56°C 30分間あるいは 70°C 1時間の加温処理でも破壊されない物質であることが明らかにされた.

また, 20個のCOCを24時間培養して作成したコンディション培地を0, 50, 100%含む培地の $10\mu\text{l}$ 液滴で, 6個のCOCを24および48時間培養し, 卵丘細胞の膨潤状態を調べた. \pm 型(全く卵丘細胞が膨潤しない)COCの割合は, コンディション培地濃度が上昇するにつれて増加し, 100%コンディション培地で培養した時にはほとんどのCOCが, \pm 型を示した. 逆に, $++$ 型COC(外層の卵丘細胞は膨潤が進行し, 個々の卵丘細胞が分離しているCOC)の割合は, コンディション培地濃度が上昇するにつれて減少し, 100%コンディション培地で培養した時には $++$ 型COCは全く観察されなかった(第五章, 表5-9). これらのことから, GVBD抑制因子は, 卵丘細胞の膨潤をも抑制すると考えられた.

さらに, $<3,000$ の限外濾過膜で濾過した濾液を用いて $10\mu\text{l}$ 液滴を作成し, その液滴に各6個のCOCを入れ24時間培養したところ, $<3,000$ 画分区のGVBD卵率(41.0%)と限外濾過を行わなかった培地を用いた時のGVBD卵率(50.7%)との間の差は有意ではなかった(表5-12). このことから, GVBD抑制因子は, 分子量 $3,000$ 以下の物質であることが明確にされた.

以上のように, 未成熟ブタ卵巢の $3\sim 8\text{mm}$ 卵胞から採取したブタ卵胞卵子(ほとんどが発育卵子である)を用いた本研究において, GVBDおよびProM IからT Iへの進行は, 卵丘細

胞で合成され、ギャップ結合を通じて卵子へ移行する因子によって抑制されることが明らかとなった。また、卵丘細胞間ギャップ結合の切断によって、卵丘細胞で生産される成熟抑制因子の移行が遮断されブタ卵子のGVBDが誘起されること、卵丘細胞から培地へ放出されるGVBD抑制因子は、凍結処理および加温処理で破壊されない分子量3,000以下の物質であることおよびGVBD抑制因子が卵丘細胞の膨潤を抑制することによって、卵丘細胞間ギャップ結合の切断が抑制され、GVBDが抑制されることが明らかにされた。

一方、Motlik *et al.* (1984) は、直径0.3~0.7, 0.8~1.6, 1.7~2.2および3~5mmのブタ卵胞から採取した卵子を体外で24時間培養した時のGVBD卵率はそれぞれ15, 72, 94および100%であったことから、卵胞から取り出し体外で培養してもGVBDを誘起しない卵子が存在すること、および0.8~1.6mmの卵胞から採取した卵子を48時間培養すると、GV卵子の割合は17%と低かったが、41%の卵子はProMIおよびMIの核相を示したことから、体外で培養するとブタ卵胞卵子のGVBDは誘起されるがMIまでで減数分裂が停止する卵胞卵子も存在することを明確にした。このような体外で培養してもGVBDを誘起しない卵子およびGVBDは誘起するがMIで減数分裂を停止する卵子は未発育卵子と呼ばれている。

本研究において培養開始前に卵丘細胞を除去することが卵子の成熟に及ぼす影響を調べた時の対照区(卵丘細胞を除去せずに48時間培養した区)におけるGV卵子の割合は6.2%であった(第三章, 表3-2)。また、培養8時間後に卵丘細胞を除去

することが卵子の成熟に及ぼす影響を調べた時の卵丘細胞を除去せずに48時間同じ培地で培養した区および培養8時間後に培地の交換をし、卵丘細胞を除去せずにさらに40時間培養した区におけるGV卵子の割合は2.5および8.0%であった(第三章, 表3-4).

同様に, 培養16, 20, 24, 28, 32時間後に卵丘細胞を除去することが卵子の成熟に及ぼす影響をそれぞれ調べた時の対照区である卵丘細胞を除去せずに48時間同じ培地で培養した区およびもう一つの対照区である卵丘細胞を除去せずに培地の交換をして48時間まで培養した区におけるGV卵子の割合はそれぞれ5.8および4.3%(16時間, 第三章, 表3-6), 2.8および10.5%(20時間, 第三章, 表3-7), 10.6および3.1%(24時間, 第三章, 表3-8), 7.6および4.0%(28時間, 第三章, 表3-9), 6.5および7.8%(32時間, 第三章, 表3-10)であった. これらの値から, 本研究に用いた卵子(3~8mmの卵胞から採取した卵子)の中には, 48時間培養してもGVBDを誘起しない未発育卵子が平均6.1%(2.8~10.6%)存在していたことになる.

これに関連した本研究の第三章の実験で, 培養開始前にCOCから卵丘細胞を除去し, その裸化卵子を48時間培養した時のGV卵子の割合(0.9%)は卵丘細胞を除去しなかった区(6.2%)に比べて有意に低かったが, 卵丘細胞を除去した区のDeg卵子の割合(20.8%)は卵丘細胞を除去しなかった区(6.2%)に比べて有意に高い値を示した(表3-2). これらのことは, 培養開始前に卵丘細胞を除去された未発育卵子(通常の

培養ではGVBDを誘起しない未発育卵子)は退行することを示す。

しかし、COCを8時間培養した後卵丘細胞を除去し、さらに40時間培養した時のGV卵子の割合(0.0%)は卵丘細胞を除去しなかった区(8.0%)に比べて有意に低かったが、Deg卵子の割合はほぼ同じ値を示した(9.6および8.0%、表3-4)。

同様に、16、20、24、28、32時間培養したCOCから卵丘細胞を除去し、その裸化卵子をさらに培養開始48時間後まで培養した時のGV卵子の割合(0.9%、0.0%、0.8%、0.8%、0.0%)は卵丘細胞を除去しなかった区(5.8%、10.5%、10.6%、7.6%、7.8%)に比べて有意に低かったが、Deg卵子の割合における両区間(16時間、21.5および16.7%、表3-6；20時間、3.5および5.7%、表3-7；24時間、8.8および9.6%、表3-8；28時間、10.9および5.1%、表3-9；32時間、7.1および2.6%、表3-10)には有意差はなかった。

このように、培養開始前に卵丘細胞を除去し、48時間培養すると、卵丘細胞を除去しない卵子に比べて、GV卵子の割合は著しく低くなり、Deg卵子の割合は有意に高くなったこと、および8時間以上培養した後卵丘細胞を除去し、その裸化卵子をさらに培養開始48時間後まで培養すると、GV卵子の割合は極めて低くなったが、Deg卵子の割合は卵丘細胞を除去しなかった区とほぼ同じであったことから、卵丘細胞の付着した状態で8時間以上培養した未発育卵子のGVBDは、卵丘細胞を除去されることによって、誘起出来ると推察された。

さらに、32時間培養したすべてのCOCにおける最外層の卵丘細胞間ギャップ結合は切断されていたが、すべての卵丘細胞間と卵丘細胞-卵子間ギャップ結合とが切断されていたCOCの割合は69.4%であり、GVBD卵率は84.0%であった(第四章, 表4-1, 表4-2)。しかし、培養32時間後に卵丘細胞を機械的に除去(卵丘細胞間および卵丘細胞-卵子間ギャップ結合を切断)した時のGVBD卵率は92.9%であった(第三章, 表3-10)。したがって、未発育卵子のGVBDの引き金は卵丘細胞-卵子間ギャップ結合の切断であり、その引き金が弾かれるとGVBDは誘起されるものと推定された。

ブタの発育卵子内には不活性型のMPF(pre-MPF)存在し、これが活性化されることによってGVBDが誘起される(Naito & Toyoda, 1991)。また、ブタ未発育卵子のMPFについて検討したChristmann *et al.* (1994)は、0から48時間培養した未発育卵子と発育卵子のヒストンH1キナーゼ(histone H1 kinase)活性とイムノブロッティングによるp34^{cdc2}およびcyclin B量を測定した。いずれの培養時間においても未発育卵子のヒストンH1キナーゼ活性は低かったが、培養前の発育卵子と未発育卵子のp34^{cdc2}およびcyclin B蛋白量はほぼ同量だったことから、未発育卵子にもGV期の発育卵子と同じ量のpre-MPFが存在すると結論した。

前述の通り、本研究の第三章の実験2, 3, 4, 5, 6において卵丘細胞の付着した状態で8時間以上培養した未発育卵子は、卵丘細胞を除去されることによって、GVBDを誘起すると推察された。この結果とChristmann *et al.* (1994)の報告

とを考え合わせると、体外で8時間培養する間に卵丘細胞が未発育卵子中のpre-MPFの活性化に参与する因子の供給に関係していると推論される。

さらに、培養開始前に卵丘細胞を除去し、その裸化卵子を48時間培養した時のGV卵子の割合(0.9%)は、卵丘細胞を除去せずに48時間培養した卵子(6.2%)に比べて有意に低かったが、Deg卵子の割合は有意に高い値を示した(20.8および6.2%、表3-2)。このことは、培養開始前に卵丘細胞を除去された未発育卵子は48時間以内に退行することを示す。

しかし、8、16、20、24、28、32時間培養したCOCから卵丘細胞を除去し、さらに培養開始48時間後まで培養した時のDeg卵子の割合(9.6%、21.5%、3.5%、8.8%、10.9%、7.1%)は、卵丘細胞を除去せずに同じ培地で48時間まで継続して培養した区および卵丘細胞を除去せずに新しい培地で48時間まで培養した区(6.7および8.0%、16.7%、6.4および5.7%、9.6および11.2%、5.1および4.0%、4.3および2.6%)とほぼ同じ値を示した(表3-4、6、7、8、9、10)。このように、体外で8時間以上培養した後、卵丘細胞を除去し、さらに48時間後まで培養しても、Deg卵子の割合は卵丘細胞を除去しなかった区とほぼ同じ値を示したことから、培養開始8時間までに、卵丘細胞は未発育卵子を退行しないよう変化させていると推考された。

一方、前述のMotlik *et al.*(1984)の論文に述べられている通り、体外で培養してもGVBDを誘起しない卵子と同様に、GVBDは誘起するがMIで減数分裂を停止する卵子も未発育

卵子である。

このGVBDは誘起するがMIで減数分裂を停止する未発育卵子の本研究における割合は、培養開始前に卵丘細胞を除去することが卵子の成熟に及ぼす影響を調べた時の対照区(卵丘細胞を除去せずに48時間培養した区)におけるProMIおよびMIを示す卵子の合計の割合(25.7%)である(第三章,表3-2)。

また、培養8時間後に卵丘細胞を除去することが卵子の成熟に及ぼす影響を調べた時の卵丘細胞を除去せずに48時間同じ培地で培養した区および培養8時間後に培地の交換をし、卵丘細胞を除去せずにさらに40時間培養した区におけるProMIおよびMIを示す卵子の合計の割合は19.2および28.3%であった(第三章,表3-4)。

さらに、培養16, 20, 24, 28, 32時間後に卵丘細胞を除去することが卵子の成熟に及ぼす影響をそれぞれ調べた時、卵丘細胞を除去せずに48時間まで同じ培地で培養した区およびそれぞれの時間培養した後、卵丘細胞を除去せずに培地の交換をして48時間まで培養した区のProMIおよびMIを示す卵子の合計の割合は、それぞれ6.7および13.8%(16時間後卵丘細胞を除去した区の対照区, 第三章, 表3-6), 19.2および18.1%(20時間後卵丘細胞を除去した区の対照区, 第三章, 表3-7), 25.0および25.5%(24時間後卵丘細胞を除去した区の対照区, 第三章, 表3-8), 16.1および19.8%(28時間後卵丘細胞を除去した区の対照区, 第三章, 表3-9), 15.2および17.2%(32時間後卵丘細胞を除去した区の対照区, 第三章, 表3-10)であった。これらのことから、本研究に用いた卵子

の中には、48時間培養してもGVBDは誘起するがMIまでで減数分裂が停止する未発育卵子が平均19.2%(6.7~28.3%)存在していたことが明らかとなった。

この体外で培養するとGVBDは誘起するがMIまでで減数分裂が停止する未発育卵子に関連して、培養開始20時間後にCOCから卵丘細胞を除去し、その裸化卵子をさらに28時間培養した区のProMIおよびMI卵子の合計の割合(12.2%)は、卵丘細胞を除去せずに48時間培養した卵子(19.2および18.1%)に比べて低く、20時間後に卵丘細胞を除去した区の成熟卵率(83.5%)は卵丘細胞を除去しなかった区(70.6および65.7%)に比べて有意に高かった(表3-7)。同様に、培養開始24時間後にCOCから卵丘細胞を除去し、その裸化卵子をさらに24時間培養した時のProMIおよびMI卵子の合計の割合(14.4%)は卵丘細胞を除去せずに48時間培養した卵子(25.0および25.5%)に比べて有意に低く、成熟卵率においては有意に高かった(表3-8)。

これらのことは、少なくとも、培養してもMIで停止する未発育卵子は、卵丘細胞除去によって減数分裂を再開し、MIIまで進行することを示す。

以上のように、体外で培養されたブタ発育卵子において、GVBDおよびProMIからTIへの進行は、卵丘細胞で合成され、ギャップ結合を通じて卵子へ移行する因子によって抑制されることが明らかとなった。また、卵丘細胞間ギャップ結合の切断によって、卵丘細胞で生産される成熟抑制因子の移

行が遮断されブタ卵子のGVBDが誘起されること、卵丘細胞から培地へ放出されるGVBD抑制因子は、凍結処理および加温処理で破壊されない分子量3,000以下の物質であること、GVBD抑制因子は卵丘細胞で生産され培地に放出されること、およびこのGVBD抑制因子は卵丘細胞の膨潤を抑制することによって卵丘細胞間ギャップ結合の切断を抑制し、GVBDを抑制することが明らかにされた。一方、培養してもGVBDを誘起しない未発育卵子は3~8mmの卵胞から採取しコンパクトな卵丘細胞を有する卵子の内、平均6.1%を占めること、この未発育卵子は培養開始前に卵丘細胞を除去すると退行すること、および培養開始8時間までに卵丘細胞は未発育卵子を退行させないように変化させていること、さらに、8時間培養する間に卵丘細胞が未発育卵子のPre-MPFの活性化に関与する因子を供給していること、および未発育卵子のGVBDの引き金は卵丘細胞-卵子間ギャップ結合の切断であることが推考された。また、培養してもGVBDは誘起するがM Iで停止する未発育卵子は、3~8mmの卵胞から採取しコンパクトな卵丘細胞を有する卵子の内、平均19.2%を占めていること、およびこれらの卵子は卵丘細胞除去によって減数分裂を再開しM IIまで進行することが明らかにされた。

特に、体外で培養された発育卵子は、内側から2層以上の卵丘細胞間ギャップ結合の切断により、卵丘細胞で合成された成熟抑制因子が卵子へ移行しなくなりGVBDを誘起するが、GVで停止する未発育卵子は8時間以上培養した後に卵丘細胞-卵子間ギャップ結合の切断によってのみ、GVBDを誘起し

得ること、M Iで停止する未発育卵子は、少なくとも20および24時間培養された後に卵丘細胞を除去されると、減数分裂を再開し、M IIまで進行すること、さらに、8時間以上培養した未発育卵子は、培養8時間以内に卵丘細胞から卵子へ退行抑制因子が放出されていることが明確にされた。したがって、今後、未発育卵子を利用していくためにはGVBDを誘起しない未発育卵子のGVBDを内側から1層の卵丘細胞が抑制する機序、およびGVBDを誘起しない未発育卵子のGVBD後における減数分裂を抑制している要因、さらに、M Iで停止する未発育卵子のM IIまでの進行を内側から1層の卵丘細胞が停止させている機序を明確にすることが必要である。

総 括

核移植によるクローン動物や形質転換動物の作成に関する研究あるいは優良家畜の配偶子保存に関する研究には、非常に多くの卵子が必要である。しかし、食肉処理場で採取する卵巣に存在する発育完了卵子(発育卵子)の数は少ない。そこで、卵巣内に多数存在する未発育卵子の利用を可能にすることが必要である。しかし、未発育卵子は卵核胞崩壊(GVBD)を誘起する能力さえ有していない。したがって、未発育卵子を利用するためには、まず、未発育卵子のGVBDを誘起させる方法を明らかにする必要がある。そのためには、発育卵子を用いてブタ卵子GVBD誘起機序を解明する必要がある。本研究は、ブタ卵子に付着する卵丘細胞の減数分裂進行(GVBDおよび成熟)に対する役割を検討するとともに、GVBDを抑制して体外培養した後に成熟培養を行う新成熟培養法で成熟させた卵胞卵子の有効性を追究した。

1. GVBD誘起機序を解明するためには、正常な卵胞卵子を用いる必要がある。そこで、いずれの大きさの卵胞から採取すれば、多くの正常卵胞卵子が得られるかを検討するために、大きさの異なる卵胞から採取したブタ卵胞卵子における各核相(GV I, GV II, GV III, GV IV, ProM I, M I, A I, M II)を示す卵子の割合を求めた。

直径2mm以下, 2~5mm, 5mm以上の卵胞から採取したブタ卵子を酢酸アルコールで固定し、プロピジウムアイオダイ

ドで染色して共焦点レーザー顕微鏡で核相を判定した。

卵子を採取する卵胞の直径が増大するにしたがって、採取した卵子に対するコンパクトな卵丘細胞を有する卵子(COC)の割合は有意に増加した。コンパクトな卵丘細胞を有する卵子の核相は全て卵核胞期(GV期)であった。また、GV期の内のGV Iを示す卵子の割合は卵子を採取する卵胞の大きさが増すにつれて有意に上昇した。さらに、コンパクトな卵丘細胞を有していない卵子においては、GVBD以降の核相を示す卵子もかなりの割合で認められ、M II卵子をも観察された。コンパクトな卵丘細胞を有さない卵胞卵子においてもGV Iを示す卵子の割合は、採取する卵胞の大きさが増大するにつれて有意に上昇した。

これらのことから、卵胞の大きさが増加するにつれて、正常卵胞の割合が上昇することが明らかにされた。したがって、GVBD誘起機序を検討するためには、通常体外成熟用に採取する2~6mmの卵胞より大きい卵胞から採取した卵子を用いる必要があるだろう。

2. 卵丘細胞が卵子の減数分裂の進行に及ぼす影響を明らかにする目的で、成熟培養開始後種々の時間に卵丘細胞卵子複合体(COC)から卵丘細胞を除去し、その裸化卵子を培養開始24および48時間後まで継続して培養し、卵子のGVBD卵率および成熟卵率等を調べた。

COCを0, 8および16時間培養した後、COCから卵丘細胞を除去し、さらに培養開始24時間後まで培養した時、対照区

の卵丘細胞を除去しないで培養した卵子に比べて有意に高いGVBD卵率を示した。また、COCを0, 8, 16, 20, 24, 28および32時間培養した後、COCから卵丘細胞を除去し、その後培養開始48時間後まで培養した時、卵丘細胞を除去しなかった区に比べて卵丘細胞を除去した区は、有意に低いGV卵子の割合を示した。これらのことは、卵丘細胞を除去することがGVBDを促進させることを示す。このことから、卵丘細胞からGVBDを抑制する因子が生産されていると推察された。

COCを20および24時間培養した後、COCから卵丘細胞を除去し、さらに28および24時間培養した時、卵丘細胞を除去しなかった卵子に比べて、卵丘細胞を除去した卵子において有意に高いGVBD卵率および有意に低いProMIからTIの卵子の合計の割合を示した。したがって、培養開始20および24時間後に卵丘細胞を除去することによる成熟卵率の上昇は、GVBD卵率の増加およびProMIからTIの卵子の合計割合の減少によるものと考えられた。さらに、このことから、卵丘細胞からGVBDを抑制する因子とともにProMIからTIへの減数分裂の進行を抑制する因子が放出されていると推察された。

卵丘細胞において生産される卵子成熟抑制因子が培地を介して卵子の成熟を抑制しているのか否かを調べる目的で、COCを24時間培養した後、COCから卵丘細胞を除去し、裸化卵子(DO)15個とCOC15個とを100 μ l液滴で24時間共培養した。共培養したDOの成熟卵率(77.1%)は、共培養したCOC(61.2%)に比べて有意に高かった。また、共培養したDO

の成熟卵率(77.1%)は、対照区の共培養しないDOの成熟卵率(73.6%)とほぼ同じ値を示した。したがって、卵丘細胞で合成される成熟抑制因子は、培地に放出されずギャップ結合を介して卵子に移行して作用しているものと考えられた。

3. 卵丘細胞で合成された成熟抑制因子がギャップ結合切断によって卵子へ移行しなくなり、GVBDが誘起されるが、卵丘細胞間あるいは卵丘細胞-卵子間のいずれのギャップ結合の切断がGVBDの引き金かを検討するために、ブタ卵子のGVBDとギャップ結合の切断との関係を検討した。

100 μ l液滴に20個のCOCを入れ0, 8, 16, 24, 32, 40および48時間培養した後、一部のCOCの卵子内にルシファーイエローを注入し、ギャップ結合の切断状態をI型(ルシファーイエローがすべての卵丘細胞に移行しているCOC)、II型(ルシファーイエローがすべての卵丘細胞には移行していないが、内側から2層以上の卵丘細胞には移行しているCOC)、III型(ルシファーイエローが内側から1層の卵丘細胞にのみ移行しているCOC)およびIV型(ルシファーイエローが全く卵丘細胞に移行していないCOC)に分類した。残りのCOCは核相の判定に使用した。

培養時間の経過にともなうギャップ結合の切断状態を調べた結果と同じく培養時間の経過にともなうGVBD卵率を調べた結果とを比較すると、培養0, 8, 16, 24および32時間後の卵丘細胞-卵子間ギャップ結合の切断を意味するIV型COCの割合は、GVBD卵率よりも低い値を示した。また、少なく

とも最外層の卵丘細胞間ギャップ結合が切断されていることを示すⅡ型,Ⅲ型およびⅣ型COCの合計の割合は,COCをいずれの時間培養した時においても,GVBD卵率よりやや高い値を示し,両者の間には有意な高い相関が認められた($r=0.96$, $P<0.01$). これらの結果から,ブタ卵子のGVBDの引き金は卵丘細胞-卵子間ギャップ結合の切断ではなく,卵丘細胞間ギャップ結合の切断と推察された.

10 μ l液滴で20個以上のCOCを培養すると,GVBDは誘起されないことが知られている.そこで,10 μ l液滴で培養したCOCにおいても卵丘細胞間ギャップ結合の切断がGVBDの引き金となるか否かを検討する目的で,10 μ l液滴で様々な数のCOCを培養した時のギャップ結合切断状態を調べた結果とGVBD卵率を調べた結果とを比較した.Ⅳ型COCの割合は,常にGVBD卵率よりも低い値を示した.また,10 μ l液滴で1,3,6,10および20個のCOCを培養した時,Ⅱ型,Ⅲ型およびⅣ型COCの合計の割合は,GVBD卵率よりやや高い値を示し,両者の間には有意な高い相関が認められた($r=0.98$, $P<0.01$). これらのことから,10 μ lの液滴中で培養されたブタ卵子のGVBDの引き金は卵丘細胞間ギャップ結合の切断と推定された.

4. ブタ卵丘細胞が卵子のGVBDを抑制する因子を生産し,培地に放出するか否か,またその因子は卵丘細胞の膨潤をも抑制するか否かを調べ,さらに,この因子の同定を試みた.

10 μ l液滴で1,3および6個のCOCを24時間培養した時の

GVBD卵率は60.8, 61.7および64.9%であったが, 20個および40個のCOCを培養した時のGVBD卵率はそれぞれ13.0および6.8%であった. このことから, 10 μ l液滴で20個以上のCOCを培養すると, 卵子のGVBDは抑制されることが明確にされた.

10 μ l液滴に20個あるいは40個のCOCを24時間培養した後, それらのCOCを100 μ l液滴に移し, さらに24あるいは48時間培養した時, GVBDは正常に誘起され, 減数分裂は正常にM IIにまで進行した. これらのことから, 10 μ l液滴で培養して, GV期で停止しているCOCは, 明らかに正常に減数分裂を進行させる能力を保持していることが明らかにされた.

20個のCOCを10 μ l液滴で24時間培養したコンディション培地の10 μ l液滴で, 6個のCOCを24時間培養したところ, GVBD卵率は, 24.1%を示した. この値は, 新しい培地の10 μ l液滴で6個のCOCを培養した時の値(72.5%)に比べて著しく低い値であった. これらのことから, COCから, 培地中へ卵子のGVBDを抑制する因子が放出されることが明確にされた. さらに, 10 μ l液滴で20および40個の裸化卵子を培養した時, GVBDは抑制されなかったことから, COCが産生し培地中に放出するGVBD抑制因子は, 卵丘細胞由来の物質と推定された.

コンディション培地(20個のCOCを24時間培養して作成)の10 μ l液滴で6個の裸化卵子を24時間培養した時のGVBD卵率(66.7%)はCOCをコンディション培地中で培養した時のその値(24.1%)に比べて有意に高いものであった. したがっ

て、GVBD抑制因子は卵丘細胞を介して、卵子のGVBDを抑制していると考えられた。

コンディション培地(20個のCOCを24時間培養して作成)を -30°C の凍結処理あるいは 56°C 30分間および 70°C 1時間の加温処理を施した後、これらの培地で $10\mu\text{l}$ の液滴を作成しその中で6個のCOCを24時間培養し、核相を調べた。その結果、凍結処理区(22.5%)、 56°C 加温処理区(19.5%)および 70°C 加温処理区(22.8%)のGVBD卵率は、対照区(新鮮なコンディション培地でCOCを培養した区)のその値(24.1%)とほとんど変らなかった。これらのことから、GVBD抑制因子は、 -30°C での凍結処理、 56°C 30分間および 70°C 1時間の加温処理で、破壊されない物質と考えられた。

コンディション培地(20個のCOCを24時間培養して作成)を分子量 $<3,000$ 、 $<10,000$ 、 $<100,000$ の限外濾過膜で濾過し、それらの各画分を80%添加した培地で $10\mu\text{l}$ 液滴を作成し、その液滴に各6個のCOCを24時間培養した時の卵子の核相を調べた。対照区(新しい培地でCOCを培養した区)のGVBD卵子の割合(78.1%)は、コンディション対照区(限外濾過していないコンディション培地でCOCを培養した区)、 $<3,000$ 画分区、 $<10,000$ 画分区および $<100,000$ 画分区のその値(50.7, 41.0, 45.9, 56.0%)に比べて、有意に高い値を示した。このことから、GVBD抑制因子は分子量3,000以下の物質と推定された。

コンディション培地(20個のCOCを24時間培養して作成)を0, 50および100%含む培地の $10\mu\text{l}$ 液滴で、6個のCOCを24

および48時間培養し、卵丘細胞の膨潤状態を調べた。±型(全く卵丘細胞が膨潤しない)COCの割合は、コンディション培地濃度が上昇するにつれて増加し、100%コンディション培地で培養した時にはほとんどのCOCが、±型を示した。逆に、++型COC(外層の卵丘細胞は膨潤が進行し、個々の卵丘細胞が分離しているCOC)の割合は、コンディション培地濃度が上昇するにつれて減少し、100%コンディション培地で培養した時には++型COCは全く観察されなかった。これらのことから、卵丘細胞で合成されるGVBD抑制因子は、卵丘細胞の膨潤をも抑制するものと考えられた。

5. 10 μ l液滴でGV期のままCOCを24時間培養し、その後さらに24時間培養すると、通常の成熟培養法で培養した卵子よりも卵細胞質の成熟は進むと考えられる。そこで、GVBDを抑制して体外培養した後、さらに成熟培養を行う新しい卵子成熟培養法で成熟させた卵子の有効性を追及した。

10 μ l液滴でGVBDを抑制して24時間培養した後、さらに100 μ l液滴で24時間成熟培養する方法(新卵成熟培養法)で成熟させたブタ卵子に、ウシ大卵胞液を0, 10, 20, 50および70%となるように添加した受精培地を用いて、精子濃度 1×10^5 sperm/mlで媒精した。卵胞液10%添加区の精子侵入卵率は0%区に比べて有意に高く、それ以上卵胞液濃度が高くなると、精子侵入卵率は徐々に減少した。このことから、新卵成熟培養法で成熟させたブタ卵子の体外受精において、受精培地に添加するウシ大卵胞液の濃度は10%が適当と考えられた。

新卵成熟培養法で用いる成熟培地にウシ大卵胞液を0, 10 および20%添加して成熟させた卵子に精子濃度 1×10^6 sperm/ml および 1×10^5 sperm/mlで媒精した。精子濃度 1×10^6 sperm/mlで媒精した時の卵胞液10および20%区(81.1, 78.6%)の雄性前核形成率は, 0%区(75.6%)に比べてかなり高く, 精子濃度 1×10^5 sperm/mlで媒精した時の卵胞液10%区(84.5%)の雄性前核形成率は, 0%区(67.8%)より有意に高かった。これらのことから, 新卵成熟培養法で用いる成熟培地に添加するウシ大卵胞液は, 雄性前核形成を促進する, すなわち, 卵子の細胞質の成熟を促進すると考えられた。

ウシ大卵胞液を0, 10 および20%添加した新卵成熟培養法の成熟培地で成熟させた卵子に精子濃度 1×10^6 sperm/mlで媒精した時の精子侵入卵率はいずれの区(0, 10 および20%区)もほぼ同じ値を示した(64.8~71.9%)。しかし, 卵胞液10%区(58.1%)および20%区(67.1%)の多精子侵入卵率は, 0%区(76.8%)に比べて, かなり低い値を示し, 0%区と10%区の間には有意差が認められた。また, 精子濃度 1×10^5 sperm/mlで媒精した時の卵胞液10%区(65.1%)の精子侵入卵率は0%区(57.8%)に比べて高い値を示したが, 卵胞液10%区(52.1%)の多精子侵入卵率は, 0%区(76.3%)に比べて有意に低い値を示した。これらのことから, 新卵成熟培養法で用いる成熟培地に添加するウシ大卵胞液は卵子の多精子拒否反応を誘起する能力を上昇させると推察された。

新卵成熟培養法で成熟させたブタ卵子に, 雄ブタAおよびBの精液を用いて種々の精子濃度で媒精し, 精子侵入卵率が

90%以上を示す区が多精子侵入卵率を雄ブタAを用いた場合と雄ブタBを用いた場合とで比較した。雄ブタAでは、精子侵入卵率が100%および99.1%を示した精子濃度 1×10^6 sperm/mlおよび 5×10^5 sperm/ml区において、多精子侵入卵率はそれぞれ100%であった。一方、雄ブタBを用いた場合の精子侵入卵率が95.6%, 100%および100%を示した精子濃度 5×10^6 sperm/ml, 1×10^6 sperm/mlおよび 5×10^5 sperm/ml区が多精子侵入卵率はそれぞれ80.2, 92.6および78.2%であった。これらの結果は雄ブタAの精子より雄ブタBの精子が多精子侵入し難い精子であることを示している。すなわち、雄ブタBの精子が、卵子の多精子拒否反応を起こし易い精子と考えられた。

新卵成熟培養法で成熟させたブタ卵子に、雄ブタAおよびBの精液を用いて種々の精子濃度で媒精した。雄ブタAの精液を用いた場合、精子濃度 5×10^4 sperm/ml区において、最も高い供試卵数に対する正常受精卵率を示した(17.6%)。また、雄ブタBの精液を用いた場合、 5×10^5 sperm/ml区において、最も高い供試卵数に対する正常受精卵率を示した(18.8%)。このことから、個体によって、供試卵数に対する正常受精卵率における高い値の得られる精子濃度が異なることが明らかにされた。

10 μ l液滴で24時間培養した後、100 μ l液滴でさらに24時間培養したCOCを用いた体外受精でかなり高い供試卵数に対する正常受精卵率(21.4%, 24.8および22.5%)の得られることが明らかとなった。このことから、10 μ l液滴で培養したGVBD

抑制卵子をさらに培養して成熟させる方法は、多数の正常受精卵子を生産する有効な手法である可能性が示唆された。

以上の本研究結果より、卵子を採取する卵胞の直径が減少するにつれて、GVIを示す卵子の割合が低下することが明らかとなった。また、卵丘細胞で合成され、ギャップ結合を介して卵子に影響を及ぼしている成熟抑制因子は、卵子のGVBD誘起およびProMIからTIまでの移行を抑制しており、内側から2層以上の卵丘細胞間ギャップ結合の切断によってこの因子が卵子に移行しなくなり、GVBDが誘起されることが考えられた。さらに、卵丘細胞で生産され、培地中に放出されるGVBD抑制因子の存在が確認された。この因子は卵丘細胞に作用することによって卵子のGVBDを抑制していることが明らかになった。また、このGVBD抑制因子は凍結および加温処理に対して安定であり、分子量3,000以下の物質と推定され、卵丘細胞の膨潤をも抑制していることが明確にされた。そして、10 μ l液滴でGVBDを抑制して24時間培養した後、さらに24時間成熟培養する新卵成熟培養法は、高い正常受精卵率を得る有効な手法と考えられた。

謝 辞

本研究を遂行しとりまとめるに際して、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜った広島大学生物生産学部家畜生殖学講座教授 寺田隆登 博士，および論文をとりまとめるにあたり有益な御助言をいただいた同学部教授 田村達堂 博士，山本義雄 博士に謹んで感謝の意を表します。

さらに、本研究遂行にあたり、種々貴重な御助言を賜った広島大学生物生産学部家畜生殖学講座助教授 前田照夫 博士に心からお礼申し上げます。

本研究に際しては広島県食肉衛生検査所東部支所，福山市食肉センター，広島市食肉センターならびに広島大学生物生産学部家畜生殖学講座の皆様にも多大な御協力をいただきました。ここにお礼申し上げます。

引用文献

- Albertini DF, Andersen E (1974) The appearance and structure of intercellular connections during the ontogeny of the rabbit ovarian follicle with particular reference to gap junction. *J Cell Biol* 63:234-250.
- Allworth AE, Albertini DF (1993) Meiotic maturation in cultured bovine oocytes is accompanied by remodeling of the cumulus cell cytoskeleton. *Dev Biol* 158:101-112.
- Bauminger S, Koch Y, Khan I, Hillensjo T, Willson L, Ahren K (1978) Preovulatory changes in ovarian cyclic AMP and prostaglandins in immature rats injected with PMSG. *J Reprod Fert* 52:21-23.
- Behalova E, Pavlok A, Motlik J, Fulka J (1993) In vitro fertilisation of pig ova: Effects of various factors on penetration, polyspermy and male pronucleus development. *Anim Reprod Sci* 32:127-133.
- Ben-Yosef D, Oron Y, Shalgi R (1993) Prolonged, repetitive calcium transients in rat oocytes fertilized in vitro and in vivo. *FEBS Lett* 331:239-242.
- Beyer EC, Paul DL, Goodenough DA (1987) Connexin 43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. *J Cell Biol* 105:2621-2629.
- Bleil JD, Greve JM, Wassarman PM (1988) Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida: role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm to eggs. *Dev Biol* 128:376-385.
- Braw RH, Tsafiriri A (1980) Effect of PMSG on follicular atresia in the immature rat ovary. *J Reprod Fert* 59:267-272.
- Chari S, Hillensjo T, Magnusson C, Sturm G, Daume E (1983) In vitro inhibition of rat oocyte meiosis by human follicular fluid fractions. *Arch Gynecol* 233:155-164.
- Chen L, Wert SE, Hendrix EM, Russell PT, Cannon M, Larsen WJ (1990) Hyaluronic acid synthesis and gap junction endocytosis are necessary for normal expansion of the cumulus mass. *Mol Reprod*

- Dev* 26:236-247.
- Christmann L, Jung T, Moor RM (1994) MPF components and meiotic competence in growing pig oocytes. *Mol Reprod Dev* 38:85-90.
- Coy P, Martinez E, Ruiz S, Vazquez JM, Roca J, Matas C, Pellicer MT (1993) In vitro fertilization of pig oocytes after different coincubation intervals. *Theriogenology* 39:1201-1208.
- Cross PC, Brinster RL (1970) In vitro development of mouse oocytes. *Biol Reprod* 3:298-307.
- Cuthbertson KSR, Cobbold PH (1985) Phorbol ester and sperm activate mouse oocytes by inducing sustained oscillations in cell Ca^{2+} . *Nature* 316:541-542.
- Dekel N, Beers WH (1980) Development of the rat oocyte in vitro: Inhibition and induction of maturation in presence or absence of the cumulus oophorus. *Dev Biol* 75:247-254.
- Dekel N, Lawrence TS, Gilula NB, Beers WH (1981) Modulation of cell-to-cell communication in the cumulus-oocyte complex and the regulation of oocyte maturation by LH. *Dev Biol* 86:356-362.
- Donahue RP (1968) Maturation of the mouse oocyte in vitro. I. Sequence and timing of nuclear progression. *J Exp Zool* 169:237-250.
- Edwards RG (1962) Meiosis in ovarian oocytes of adult mammals. *Nature* 196:446-450.
- Edwards RG (1965) Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* 208:349-351.
- Eppig JJ (1982) The relationship between cumulus cell-oocyte coupling, oocyte meiotic maturation, and cumulus expansion. *Dev Biol* 89:268-272.
- Fissore RA, Dobrinsky JR, Balise JJ, Duby RT, Robl JM (1992) Patterns of intracellular Ca^{2+} concentrations in fertilized bovine eggs. *Biol Reprod* 47:960-969.
- Fleming AD, Yanagimachi R (1982) Fertile life of acrosome-reacted

- guinea-pig spermatozoa. *J Exp Zool* 220:109-115.
- Fukui Y, Sakuma Y (1980) Maturation of bovine oocytes cultured in vitro: Relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells. *Biol Reprod* 22:669-673.
- Fulka JJr, Motlik J, Fulka J, Jilek F (1986) Effect of cycloheximide on nuclear maturation of pig and mouse oocytes. *J Reprod Fert* 77:281-285.
- Funahashi H, Stumpf TT, Terlouw SL, Day BN (1993) Effects of electrical stimulation before or after in vitro fertilization on sperm penetration and pronuclear formation of pig oocytes. *Mol Reprod Dev* 36:361-367.
- Funahashi H, Day BN (1993) Effects of follicular fluid at fertilization in vitro on sperm penetration in pig oocytes. *J Reprod Fert* 99:97-103.
- Funahashi H, Cantley TC, Stumpf TT, Terlouw SL, Day BN (1994a) In vitro development of in vitro matured porcine oocytes following chemical activation or in vitro fertilization. *Biol Reprod* 50:1072-1077.
- Funahashi H, Cantley TC, Stumpf TT, Terlouw SL, Day BN (1994b) Use of low-salt culture medium for in vitro maturation of porcine oocytes is associated with elevated oocyte glutathione levels and enhanced male pronuclear formation after in vitro fertilization. *Biol Reprod* 51:633-639.
- Ghetler Y, Jaffe R, Ben-nun I, Gruber A, Kaneti H, Fejgin M (1990) Effect of sperm preincubation with follicular fluid on the fertilization rate in human in vitro fertilization. *Fertil Steril* 54:944-946.
- Guoliang X, Byskov AG, Andersen CY (1994) Cumulus cells secrete a meiosis-inducing substance by stimulation with forskolin and dibutyric cyclic adenosine monophosphate. *Mol Reprod Dev* 39:17-24.

- Gwatkin RBL, Haidri AA (1973) Requirements for the maturation of hamster oocytes in vitro. *Exp Cell Res* 76:1-7.
- Gwatkin RBL, Anderson OF (1976) Hamster oocyte maturation in vitro: inhibition by follicular components. *Life Sciences* 19:527-536.
- Hillensjo T, Kripner A, Pomerantz SH, Channing CP (1979) Action of porcine follicular fluid oocyte maturation inhibitor in vitro: Possible role of cumulus cells. In *Ovarian follicular and corpus luteum function*, p283-290. Eds CP Channing, JM March & WJ Sadler, Plenum Press, New York.
- Homa ST, Swann K (1994) A cytosolic sperm factor triggers calcium oscillation and membrane hyperpolarizations in human oocytes. *Hum Reprod* 9:2356-2361.
- Hunter RHF, Polge C (1966) Maturation of follicular oocytes in the pig after injection of human chorionic gonadotrophin. *J Reprod Fert* 12:525-531.
- Iwamatsu T, Yanagimachi (1975) Maturation in vitro of ovarian oocytes of prepubertal and adult hamsters. *J Reprod Fert* 45:83-90.
- Kalous J, Sutovsky P, Rimkevicova Z, Shioya Y, Lie BL, Motlik J (1993) Pig membrana granulosa cells prevent resumption of meiosis in cattle oocytes. *Mol Reprod Dev* 34:58-64.
- 加野浩一郎・宮野隆・加藤征史郎 (1993) ブタ卵胞卵子の体外成熟および体外受精に及ぼすヒト閉経期性腺刺激ホルモン (hMG) の影響. *繁殖技術会誌* 15:29-34.
- Kennedy JF, Donahue RP (1969) Human oocytes: Maturation in chemically defined media. *Science* 164:1292-1293.
- Kline D, Kline JT (1992) Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev Biol* 149:80-89.
- Kubelka M, Motlik J, Fulka JJr, Prochazka R, Zora Rimkevicova, Fulka J (1988) Time sequence of germinal vesicle breakdown in pig oocytes after cycloheximide and p-aminobenzamidine block.

- Gamete Res* 19:423-431.
- Kuzan FB, Fleming AD, Seidel GE (1984) Successful fertilization in vitro of fresh intact oocytes by perivitelline (acrosome-reacted) spermatozoa of the rabbit. *Fertil Steril* 41:766-770.
- Larsen WJ, Wert SE, Brunner GD (1986) A dramatic loss of cumulus cell gap junctions is correlated with germinal vesicle breakdown in rat oocytes. *Dev Biol* 113:517-521.
- Larsen WJ, Wert SE, Brunner GD (1987) Differential modulation of rat follicle cell gap junction populations at ovulation. *Dev Biol* 122:61-71.
- Leibfried L, First NL (1979) Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J Anim Sci* 48:76-86.
- Martinez E, Vazquez JM, Matas C, Roca J, Coy P, Gadea J (1993) Evaluation of boar spermatozoa penetrating capacity using pig oocytes at the germinal vesicle stage. *Theriogenology* 40:547-557.
- Mattioli M, Galeati G, Seren E (1988) Effect of follicle somatic cells during pig oocyte maturation on egg penetrability and male pronuclear formation. *Gamete Res* 20:177-183.
- Mattioli M, Bacci ML, Galeati G, Seren E (1989) Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology* 31:1201-1207.
- Mattioli M, Barboni B, Bacci ML, Seren E (1990) Maturation of pig oocytes: Observations on membrane potential. *Biol Reprod* 43:318-322.
- Mattioli M, Bacci ML, Galeati G, Seren E (1991) Effects of LH and FSH on the maturation of pig oocytes in vitro. *Theriogenology* 36:95-105.
- 湊芳明・豊田裕 (1982) 体外培養によるブタ卵母細胞の成熟分裂誘起と卵丘細胞層の膨化に及ぼす同種血清および卵胞液の影響について. *日畜会報* 53:515-520.
- 宮野隆・平尾雄二・加野浩一郎・永井卓・三宅正史・加藤征史郎

- (1994) 卵胞卵子の体外発育—体外成熟. *産婦人科の世界* 46:221-228.
- Moor RM, Trounson AO (1977) Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent developmental capacity. *J Reprod Fert* 49:101-109.
- Motlik J, Fulka J (1976) Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes in vivo and in vitro. *J Exp Zool* 198:155-162.
- Motlik J, Nicole C, Fulka J (1984) Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J Reprod Fert* 72:323-328.
- Motlik J, Fulka J, Flechon J-E (1986) Changes in intercellular coupling between pig oocytes and cumulus cells during maturation in vivo and in vitro. *J Reprod Fert* 76:31-37.
- Motlik J, Nagai T, Kikuchi K (1991) Resumption of meiosis in pig oocytes cultured with cumulus and parietal granulosa cells: the effect of protein synthesis inhibition. *J Exp Zool* 259:386-391.
- Nagai T, Niwa K, Iritani A (1984) Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization in vitro of pig follicular oocytes. *J Reprod Fert* 70:271-275.
- Nagai T, Takahashi T, Masuda H, Shioya Y, Kuwayama M, Fukushima M, Iwasaki S, Hanada A (1988) In-vitro fertilization of pig oocytes by frozen boar spermatozoa. *J Reprod Fert* 84:585-591.
- Nagai T, Moor RM (1990) Effect of oviduct cells on the incidence of polyspermy in pig eggs fertilized in vitro. *Mol Reprod Dev* 26:377-382.
- Nagai T, Ding J, Moor RM (1993) Effect of follicle cells and steroidogenesis on maturation and fertilization in vitro of pig oocytes. *J Exp Zool* 266:146-151.
- Naito K, Fukuda Y, Toyoda Y (1988) Effects of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured in vitro. *Gamete Res* 21:289-295.

- Naito K, Toyoda Y (1991) Fluctuation of histone H1 kinase activity during meiotic maturation in porcine oocytes. *J Reprod Fert* 93:467-473.
- Ocampo MB, Ocampo LC, Ryu IS, Mori T, Ueda J, Kanagawa H (1993) Effects of culture time, ovarian activity, cumulus cells and sera on the nuclear and cytoplasmic maturation of pig oocytes in vitro. *Anim Reprod Sci* 34:135-146.
- Ocampo MB, Ocampo LC, Mori T, Ueda J, Kanagawa H (1994) Timing of sequential changes in chromosome configurations during the second meiotic division and cytoplasmic events of pig oocytes matured and fertilized in vitro. *Anim Reprod Sci* 34:281-288.
- Petr J, Zetova L, Fulka JJr, Jilek F (1989) Quantitative inhibitory influence of porcine cumulus cells upon the maturation of pig and cattle oocyte in vitro. *Reprod Nutr Dev* 29:541-550.
- Pincus G, Enzmann EV (1935) The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. I. The activation of ovarian eggs. *J Exp Med* 62:665-675.
- Pincus G, Saunders B (1939) The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. VI. The maturation of human ovarian ova. *Anat Rec* 75:537-545.
- Racowsky C (1985) Effect of forskolin on maintenance of meiotic arrest and stimulation of cumulus expansion, progesterone and cyclic AMP production by pig oocyte-cumulus complexes. *J Reprod Fert* 74:9-21.
- Reed ML, Estrada JL, Illera MJ, Petters RM (1993) Effects of epidermal growth factor, insulin-like growth factor-I, and dialyzed porcine follicular fluid on porcine oocyte maturation in vitro. *J Exp Zool* 266:74-78.
- Risek B, Guthrie S, Kumar N, Gilula NB (1990) Modulation of gap junction transcript and protein expression during pregnancy in the rat. *J Cell Biol* 110:269-282.

- Saling PM, Storey BT (1979) Mouse gamete interaction during fertilization in vitro: Chorfelracycline as a fluorescent probe for the mouse sperm acrosome reaction. *J Cell Biol* 83:544-555.
- Salustri A, Siracusa G (1983) Metabolic coupling, cumulus expansion and meiotic resumption in mouse cumuli oophori cultured in vitro in the presence of FSH or dcAMP, or stimulated in vivo by hCG. *J Reprod Fert* 68:335-341.
- Salustri A, Yanagishita M, Hascall VC (1989) Synthesis and accumulation of hyaluronic acid and proteoglycans in the mouse cumulus cell-oocyte complexes during follicle-stimulating hormone-induced mucification. *J Biol Chem* 264:13840-13847.
- 佐藤英明・石橋武彦 (1977) ブタ培養卵胞卵子の成熟に及ぼすpHおよびステロイドの影響. *日畜会報* 48:107-109.
- 佐藤英明・入谷明・西川義正 (1977) ブタ及びウシ卵胞卵の体外培養, とくに卵の成熟に影響する要因について. *家畜繁殖誌* 23:12-17.
- 佐藤英明・入谷明・西川義正 (1978a) ブタ卵胞卵の体外培養における成熟分裂速度について. *日畜会報* 49:400-405.
- 佐藤英明・古林亮介・石橋武彦 (1978b) ブタの顆粒膜細胞表層から分離された減数分裂休止物質の理化学的性状. *家畜繁殖誌* 24:59-62.
- 佐藤英明・石橋武彦 (1978) ウシ卵巢の顆粒膜細胞から分離された4種類の物質(減数分裂休止物質,ゴナドトロピン抑制物質,FSHおよびLH結合物質)について. *日本不妊学会誌* 27:506-513.
- 佐藤英明・入谷明・西川義正 (1980) ブタ顆粒膜細胞層の卵核胞崩壊抑制作用の発現機構について. *日本不妊学会誌* 25:229-233.
- Schultz RM, Montgomery RR, Ward-Bailey PF, Eppig JJ (1983) Regulation of oocyte maturation in the mouse: Possible roles of intercellular communication, cAMP, and Testosterone. *Dev Biol* 95:294-304.
- Shim C, Lee DK, Lee C, Cho WK, Kim KJ (1992) Inhibitory effect of purines in meiotic maturation of denuded mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 31:280-286.

- Siegel MS, Graczykowski JW (1991) Influence of porcine follicular fluid on the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Fertil Steril* 55:1204-1206.
- Singh B, Zhang X, Armstrong DT (1993) Porcine oocytes release cumulus expansion-enabling activity even though porcine cumulus expansion in vitro is independent of the oocyte. *Endocrinology* 132:1860-1862.
- Sirard MA, First NL (1988) In vitro inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. *Biol Reprod* 39:229-234.
- Sirard MA, Parrish JJ, Ware CB, Leibfried-Rutledge ML, First NL (1988) The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biol Reprod* 39:546-552.
- Stone SL, Pomerantz SH, Schwartz-Kripner A, Channing CP (1978) Inhibition of oocyte maturation from a porcine follicular fluid: Further purification and evidence for reversible action. *Biol Reprod* 19:585-592.
- Sun FZ, Hoyland J, Huang X, Mason W, Moor RM (1992) A comparison of intracellular calcium changes in porcine eggs after fertilization and electroactivation. *Development* 115:947-956.
- Sutovsky P, Elechon JE, Pavlok A (1995) F-actin is involved in control of bovine cumulus expansion. *Mol Reprod Dev* 41:521-529.
- Suzuki K, Ebihara M, Nagai T, Clarke NGE, Harrison RAP (1994) Importance of bicarbonate/CO₂ for fertilization of pig oocytes in vitro, and synergism with caffeine. *Reprod Fertil Dev* 6:221-227.
- Swann K (1990) A cytosolic sperm factor stimulates repetitive calcium increases and mimics fertilization in hamster eggs. *Development* 110:1295-1302.
- Swann K (1992) Different triggers for calcium oscillations in mouse eggs involve a ryanodine sensitive calcium store. *Biochem J* 287:79-84.
- Swann K (1994) Ca²⁺ oscillations and sensitization of Ca²⁺ release in

- unfertilized mouse eggs injected with a sperm factor. *Cell Calcium* 15:331-339.
- Tsafriri A, Channing CP (1975) Influence of follicular maturation and culture conditions on the meiosis of pig oocytes in vitro. *J Reprod Fert* 43:149-152.
- Tsafriri A, Channing CP, Pomerantz SH, Lindner HR (1977) Inhibition of maturation of isolated rat oocytes by porcine follicular fluid. *J Endocr* 75:285-291.
- 豊田裕 (1988) 性細胞と生殖器. *新家畜繁殖学* 21-49, 朝倉書店.
- Vanderhyden BC, Armstrong DT (1989) Role of cumulus cells and serum on the in vitro maturation, fertilization, and subsequent development of rat oocytes. *Biol Reprod* 40:720-728.
- Vazquez JM, Martinez E, Roca J, Coy P, Pastor LM (1993) Acrosome reaction of boar spermatozoa in homologous in vitro fertilization. *Mol Reprod Dev* 36:84-88.
- Wang WH, Niwa K, Okuda K (1991) In-vitro penetration of pig oocytes matured in culture by frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *J Reprod Fert* 93:491-496.
- Wang WH, Abeydeera LR, Fraser LR, Niwa K (1995) Fluorimetric analysis using chlortetracycline fluorescence and in vitro fertilization of frozen-thawed ejaculate boar spermatozoa incubated in a protein-free chemically defined medium. *J Reprod Fert* 104:305-313.
- Wert SE, Larsen WJ (1989) Meiotic resumption and gap junction modulation in the cultured rat cumulus-oocyte complexes. *Gamete Res* 22:143-162.
- Wiesen JF, Midgley AR Jr (1994) Expression of connexin 43 gap junction messenger ribonucleic acid and protein during follicular atresia. *Biol Reprod* 50:336-348.
- Yoshida M, Bamba K, Kojima Y (1989) Effects of gonadotropins and estradiol-17 β on the timing of nuclear maturation and cumulus

- mass expansion in pig oocytes cultured in vitro. *Jpn J Anim Reprod* 35:86-91.
- Yoshida M, Ishigaki K, Pursel VG (1992a) Effect of maturation media on pronucleus formation in pig oocytes matured in vitro. *Mol Reprod Dev* 31:68-71.
- Yoshida M, Ishizaki Y, Kawagishi H, Bamba K, Kojima Y (1992b) Effects of pig follicular fluid on maturation of pig oocytes in vitro and on their subsequent fertilizing and developmental capacity in vitro. *J Reprod Fert* 95:481-488.
- Zhang L, Jiang S, Wozniak PJ, Yang X, Godke RA (1995) Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro. *Mol Reprod Dev* 40:338-344.
- Zheng YS, Sirard MA (1992) The effect of sera, bovine serum albumin and follicular cells on in vitro maturation and fertilization of porcine oocytes. *Theriogenology* 37:779-790.