

博士論文

ヒト卵体外成熟培養法開発のための生理学的研究
(要約)

平成 26 年 3 月

広島大学大学院生物圏科学研究科

生物資源科学専攻

日下 千賀子

目次

第一章	緒論	4
第二章	採卵前の卵胞刺激ホルモン投与が体外成熟培養に及ぼす影響の検討	
	序論	15
	材料及び方法	18
	結果	22
	考察	24
	要約	27
	図および表	28
第三章	体外成熟培養における培養条件の検討	
	序論	34
	材料及び方法	37
	結果	40
	考察	43
	要約	47
	図および表	48
第四章	体外成熟培養における培地への添加因子の検討 (要約)	57
第五章	総合論議 (要約)	57
第六章	総括 (要約)	57

略語一覽	58
謝辭	60
引用文献	61

第一章

緒論

1. 生殖工学の発展

1-1 卵胞発育と卵成熟

哺乳類の雌個体では、胎生期において雌性始原生殖細胞が卵母細胞（卵）へと分化し、それが出生前後に減数分裂へと移行後、第一減数分裂前期の複糸期の状態で停止している。この卵は、第二性徴後の各発情周期に一定数が発育を開始し、後述するように卵胞発育過程で卵核胞（germinal vesicle: GV）と呼ばれる巨大な核様の構造を形成する。この十分に発育した卵胞内のGV期卵は、排卵刺激を受け、減数分裂を再開し、卵核胞崩壊（germinal vesicle breakdown: GVBD）と言われる核膜の消失が起こり、紡錘体が形成される（Deckel, 1995）。紡錘体の形成により、二価染色体が赤道面に整列し（第一減数分裂中期（MI））、姉妹染色体の分離により第一極体が放出され、第二減数分裂中期（MII）で再び減数分裂は停止する（Deckel, 1995）。このGV期卵が、MIIへと移行する過程を卵成熟と呼び、MII卵は受精能を持つことから成熟卵、それ以前を受精能のない未成熟卵として区別する。

卵の成熟が可能となるには、体積の増大に伴う機能的変化が必要であり、その第一段階として卵から分泌される因子に支配された体細胞と卵胞組織を構築する。まず、第一減数分裂前期で停止した卵は、一層の扁平な上皮様細胞（前顆粒膜細胞）に囲まれた原始卵胞を形成する。ヒトにおいては、その直径は30~60 μm であり、妊娠16週以降の胎生期に形成が始まり、分娩後6カ月までに終了する（Baker et al., 1963）。この原始卵胞から、卵の発育に伴う卵胞成長が開始されるが、それは全卵胞の3%に過ぎず、これを卵胞の活性化と定義している（Peters, 1978）。活性化された卵胞は、一層の扁平な細胞が立方状の細胞へと変化した一次卵胞へ移行し、卵周囲を糖タンパク質が主成分となる透明帯に覆われ、かつ複数層化した顆粒層細胞を有する二次卵胞を経て、胞状卵胞に至る。ヒトにおいては、この胞状卵胞までの発育に70日ばかりを要するが、この過程で、卵を直接取り囲む細胞は卵丘細胞へと分化し、卵胞腔を挟んで卵胞膜を裏打ちする細胞層が顆粒膜細胞、卵胞膜は内卵胞膜と外卵胞膜へと分化する（Hirshfield et al., 1991）。

二次卵胞までの卵胞発育は、性腺刺激ホルモン非依存的に進行する。この間は、卵直径は著しく増大するが（Schultz and Wassarman, 1977）、この時期の卵を卵胞から回収して体外培養しても卵の減数分裂は再開せず、受精能力も持たない（Baehvarova et al., 1985）。すなわ

ち、胞状卵胞の発育に伴う卵の機能獲得が、雌性配偶子形成に重要であることがわかる。この胞状卵胞においては、顆粒膜細胞に卵胞刺激ホルモン (follicle stimulating hormone: FSH) 受容体が発現し、卵胞内膜 (内夾膜細胞) に黄体形成ホルモン (luteinizing hormone: LH) 受容体が発現している (Kobayashi, 1990)。脳下垂体から分泌される FSH と LH がこれら受容体を刺激し、内夾膜細胞でアンドロジェンが合成され、顆粒膜細胞においてエストロジェンへと変換される (McNatty et al., 1980; Hillier, 1991)。アンドロジェンは、初期の胞状卵胞の発育を促進すると考えられているが、それが高濃度維持されるとその後の卵胞発育は停止する (Westergaard et al., 1986)。したがって、FSH 依存的なエストロジェンへの変換が、十分発育した卵胞を形成するために必須であると考えられている。実際に、エストロジェン受容体の遺伝子欠損マウスは、卵胞発育過程の顆粒膜細胞の増殖が不十分であり、かつ排卵準備が完了しないため、産子数が著しく低いと報告されている (Lubahn et al., 1993; Dupont et al., 2000)。このことから FSH 依存的なエストロジェン合成が卵胞発育に必須であると考えられる。一方でエストロジェンには脳下垂体の FSH 分泌抑制というネガティブフィードバック因子としての機能もある。すなわち、卵胞発育に伴って血中 FSH 濃度は低下し、その結果、顆粒膜細胞において FSH 受容体発現が低値な卵胞は、エストロジェン合成が不十分になり、卵胞発育が継続しない (Fauser and Van Heusden, 1997)。ヒトにおいては、この FSH 濃度低下条件下でも発育が継続する卵胞と、その条件では停止する卵胞との選別により (卵胞選択)、排卵に至る直径 15 mm 以上の主席卵胞が 1 つのみ選択される (Block, 1951; Hodgen et al., 1982)。主席卵胞の成長は、直径が 16~29 mm に達するまで継続し、多量のエストロジェンが産生され、血中濃度が高まる。このエストロジェンは、脳下垂体における LH 産生細胞を刺激し、一過的な LH 分泌 (LH サージ) を引き起こし、これが十分に発育した主席卵胞の顆粒膜細胞に発現する LH 受容体を刺激することで、排卵が引き起こされる (Renaud et al., 1980; Kerin et al., 1981; Lenz, 1985)。

この主席卵胞への発育過程で、卵は減数分裂再開能とその後の受精能を獲得する。それには、減数分裂再開を引き起こす細胞周期制御因子群の蓄積とその活性調節が重要な役割を果たしている。卵では、その発達過程において多数の遺伝子が発現するが、その多くは直ちにタンパク質へと翻訳されない母性 mRNA (maternal mRNA) として蓄積される (Brevini- Gandolfi et al., 1999)。その中には、Cyclin B1 や Mos などの減数分裂時に翻訳されるものが含まれており、これらを発現しない遺伝子欠損マウスでは、正常な減数分裂の進行が認められない (Araki et al., 1996; Brandeis et al., 1998)。さらに、直ちに翻訳されるものにおいても、Cyclin B2 は Cyclin dependent protein kinase type I (CDK1) と結合し、CDK1 の

リン酸化状態による活性化制御に関わっている (Clarke and Karsenti, 1991). すなわち, Cyclin B2 と結合した CDK1 は, スレオニンとセリンがリン酸化されている状態では不活性化状態であり, それが脱リン酸化されることで活性化し, 核膜を裏打ちするビメンチンやラミンをリン酸化して, GVBD を引き起こす (Chou et al., 1990; Dessev et al., 1991). このように, 胞状卵胞の発育過程で, 卵は減数分裂再開と進行に必要な遺伝子を発現し, 母性 mRNA を蓄積していることから, 十分に発育した卵のみが卵成熟能を持つことがわかる.

ここまで, 記述してきたように, 卵胞発育過程において, ある一定期を過ぎると卵は卵成熟能を持つが, この時期の卵胞は排卵準備を完了していない. このように, 卵と卵胞を構成する体細胞の発育ステージの不調和が生じることから, 卵は卵胞が排卵準備を完了するまで, 減数分裂再開を抑制されていなければならない. ヒトの場合, 卵直径が 110 μm を超えると卵成熟能は備わるが, この大きさの卵は, 卵胞直径が 5 mm 程度を越えると認められるようになる (Durinz et al., 1995). 一方で, 直径 5 mm 程度の胞状卵胞では, 排卵刺激を引き起こすエストロジェンの分泌は不十分であり (Tsuji et al., 1985), かつ排卵刺激を感受する LH 受容体が顆粒膜細胞でほとんど発現していない (Takao et al., 1997). 上述のように, 排卵準備の完了には, 卵胞直径が 15 mm 以上にまで発育する必要があることから, 直径 5 mm 程度の卵胞には, 卵の減数分裂再開抑制因子が存在すると考えられる. Downs et al. (1985) は, 直径 5 mm 程度のブタ卵胞から卵胞液を回収し, 卵胞液中の減数分裂再開抑制因子を探索した結果, ヒポキサンチンを同定した. その後の研究により, ヒポキサンチンが cAMP や cGMP を分解する phosphodiesterase 活性の抑制因子であること (Downs et al., 1989), ヒポキサンチン添加により卵内の cAMP 濃度が上昇すること, その結果, cAMP の下流シグナル系により CDK1 のリン酸化が維持され, 減数分裂が停止することが明らかとなっている (Wassarman and Albertini, 1994). さらに, 最新の研究により, 顆粒膜細胞が胞状卵胞発育過程で発現, 分泌する natriuretic peptide precursor type C (NPPC) と, 卵丘細胞に発現する受容体 (NPR2) の重要性も報告されている. NPPC は, NPR2 に作用すると, 卵丘細胞で cGMP が合成され, これがギャップジャンクションを介して卵へ移行する (Zhang, 2010; Kawamura et al., 2011). cGMP は, 卵に特異的に発現する phosphodiesterase type III B (PDE3B) を抑制するので, 卵内の cAMP が高濃度で維持されることが示されている (Törnell, 1991, Draijer, 1995).

以上をまとめると, 卵の発達過程では, 減数分裂再開に必要なタンパク質や母性 mRNA の不足により, 卵は減数分裂を再開できない. 十分に発達した後には, 卵胞液成分や顆粒膜細胞分泌因子の刺激を受けた卵丘細胞の作用により卵内 cAMP 量が高値を維持し, それが減数分裂再開抑制機構を司っている. つまり, 卵の減数分裂再開は強力な抑制機構の支

配下にあるため、減数分裂を再開させるには、それを解除する特別な刺激が必要となる。卵は、排卵刺激を感受する LH 受容体を発現していないばかりでなく、排卵刺激を受けた顆粒膜細胞が発現、分泌する因子に対する受容体もほとんど持っていない (Park, 1991; Mattioli, 1994; Hizaki et al., 1999)。そのために、これらの刺激は、卵丘細胞を介して感受し、卵成熟を開始する。排卵刺激により顆粒膜細胞が発現、分泌する因子として、epidermal growth factor (EGF) like factor, プロスタグランジン, プロジェステロンがあり、EGF 受容体の欠損マウス (Hsieh et al., 2007) や、プロジェステロン受容体の欠損マウス (Montgomery et al., 1995), プロスタグランジンの合成酵素欠損マウス (Lim et al., 1997) が排卵数を低下させることから、これらの排卵過程での関与が示された。Kawashima et al. (2008) は、ブタの各ステージの卵胞を回収し、それらの受容体である EGF 受容体 (EGFR), プロジェステロン受容体 (PGR), プロスタグランジン受容体 (EP2) の発現変化を検討した。その結果、FSH 投与 72 時間後の卵胞が最大直径に到達したとき、それらの発現が最大値に達することを明らかとした。また、FSH は、エストロジェンやプロジェステロンと協調的に卵丘細胞に LH 受容体を形成させる (Kessel et al., 1985; Kawashima et al., 2008)。ラットにおいても、エストロジェンが顆粒膜細胞を刺激し、EGFR の発現を増強させることが報告されていることから (Liang et al., 1990)、十分に卵胞が発育することは、排卵刺激となるエストロジェンのポジティブフィードバックによる LH サージの出現のみでなく、それを感受し、卵成熟を開始させる準備を完了させるためにも必要である。これらのことから、体内における卵の減数分裂再開、受精可能な第二減数分裂中期への進行機構を解明するには、排卵という卵成熟過程そのものみに着目するのではなく、卵胞発育期における卵や卵丘細胞、顆粒膜細胞の機能変化を十分に明らかにする必要がある。

1 - 2 卵の体外成熟培養と体外受精

卵の減数分裂再開および第二減数分裂中期への進行能のみを考えるのであれば、直径 110 μm 以上の卵を卵胞から回収し、体外培養すれば、抑制作用が自発的に解除され、減数分裂は再開することになる。Pincus and Enzyman (1935) は、ウサギの卵巣から未成熟卵を回収し、グルコースを主成分とするリンゲル液中で培養した結果、減数分裂の再開が観察されたと報告している。Edwards (1965) は、グルコースと様々なアミノ酸類やビタミン類を構成成分とする TCM199 に 15%ウシ血清を添加した成熟培地で、マウス、ブタ、ウサギ、ウシ、ヒツジ、レッサーモンキー、ヒト卵を培養し、第二減数分裂中期の成熟卵を得ることに成功した。

このように、体外で卵を受精可能な第二減数分裂中期へと進行させることができるならば、1950年代に急速に進展した体外受精 (*in vitro* fertilization: IVF) 技術と組み合わせることにより、体内で受精できない患者への不妊治療や家畜の効率的増産に応用できると考えられた。そこで、体外成熟卵の受精能とその後の発生能に関する研究が多くの動物種で実施された。しかし、卵胞発育過程を経ていない未成熟卵は、減数分裂再開は高頻度で誘導されるが、第二減数分裂中期への進行率は低く、受精能はほとんど無く、産子を得ることは難しかった (Chang, 1955; Cross and Brinster, 1970; Mukherjee, 1972)。このような卵胞から回収することで減数分裂を再開する卵成熟は、体内で起こる卵成熟とは異なる非生理的な現象と考えられるようになり、自発的成熟 (*spontaneous maturation*) と定義された。そして、体内の卵成熟を体外で模倣する研究が開始された。

性成熟前の生後 15 日齢のマウスから回収した卵は、減数分裂を再開できない (Sorensen and Wassarman, 1976)。しかし、未成熟マウスに FSH 製剤 (PMSG) を投与すると、採卵数が増え、体外成熟培養 (*in vitro* maturation: IVM) により減数分裂を再開し、第二減数分裂中期に到達する (Schroeder et al., 1984, 1989)。また、性成熟したマウスにおいても、PMSG 未投与マウスから回収した卵の第二減数分裂中期への到達率 (MII 率) は 50 %程度であるが、PMSG 投与後に回収した卵のそれは 90 %以上と報告されている (Cross and Brinster, 1970)。さらに、Cross and Brinster (1970) は、卵丘細胞の付着の有無により成熟培養後の MII 率を比較した結果、裸化卵では 59.2 %であるのに対して、卵丘細胞が有する卵のそれは 91.7 %であると報告した。したがって、第二減数分裂中期に減数分裂を進行させることは、充分発育した卵胞から卵を回収すること、卵丘細胞が付着した状態 (卵・卵丘細胞複合体) で培養することにより誘起できることが示された。しかし、卵・卵丘細胞複合体 (*cumulus oocyte complex: COC*) を成熟培養しても、依然として IVF 後の受精率は体内成熟卵に比べて有意に低いものであった (Cross and Brinster, 1970)。この結果は、卵の受精能獲得については、卵胞発育期においては充分ではなく、減数分裂進行過程 (排卵過程) においても付与されるものと示唆された。

排卵過程における卵の減数分裂再開、進行は、LH サージにより引き起こされる。先に述べたように、卵には LH 受容体が発現せず、卵と共に排卵される卵丘細胞においてもその発現量は顆粒膜細胞と比較して著しく低い。したがって、LH 刺激を受けた顆粒膜細胞が発現、分泌する二次因子が、卵成熟の開始に必須である。しかし、これら二次因子の重要性は、DNA チップやサブトラクション法、ディファレンシャルディスプレイ法などの網羅的な発現遺伝子解析により、近年明らかにされてきたものである (Richards, 2001; Park et al., 2004;

Conti et al., 2006; Fan et al., 2009). 初期の IVM では、卵丘細胞に受容体があり、LH サージ時に付随的に下垂体から分泌される FSH が卵丘細胞を刺激し、卵成熟を開始させると想定され、非生理的な高濃度の FSH 製剤を添加する実験が行われた。Minato and Toyoda (1982) は、ブタの卵巣内の 2~5 mm の小卵胞から卵子回収を行い、成熟培地に FSH 様の作用を示す PMSG, あるいは LH 作用を示す hCG (human chorionic gonadotropine) を添加した結果、80 % 程度の卵が MII へと減数分裂を進行すると報告した。成熟培地への hCG や LH 単独添加が、卵丘細胞を刺激して、卵丘細胞の膨潤 (卵丘細胞間へのヒアルロン酸蓄積) を引き起こし、卵成熟を開始させるとの報告は、他にも多数ある (Yoshida et al., 1989; Mattioli et al., 1991)。しかし、hCG や脳下垂体から抽出した LH は、FSH 作用も示し、一般的に市販されている LH では 10 %以上の FSH が混雑している。そこで、高純度の LH を用いた研究が行われ、LH 単独添加では小卵胞から回収した COC を刺激しないことが明確にされた (Chen et al., 1994; Choi et al., 2000)。

FSH 製剤の最適添加時期を検討した Funahashi et al. (1994) は、3~6 mm の小卵胞から採卵した COC を培養した場合、培養前半での PMSG 添加は受精率を向上させるのに対し、それを継続的に添加した培地では、培養後半を PMSG 無添加で培養した COC に比較して、MII 率に変化はないが、受精率は減少することを報告した。また、培養後半に hCG 単独添加培地に COC を移動させることで、受精率がさらに向上することを認めた。Shimada et al. (2003) は、FSH 添加培地でブタ COC を培養することにより、20 時間以内に卵丘細胞に LH 受容体が発現することを明らかにした。さらに、20 時間以降は LH 単独添加培地で培養することで、卵成熟が引き起こされ、FSH で継続的に培養した COC の受精率、胚盤胞期胚への発生率に比較して、有意に高いことを示している (Okazaki et al., 2003)。Kawashima et al. (2008) は、ブタにおいても顆粒膜細胞で LH 刺激により EGF like-factor の発現上昇が起こることを認め、FSH 添加培地で前培養することで LH 受容体と EGF 受容体を発現させ、それを LH + EGF 添加培地で刺激する新たな培養系を構築した。これにより、IVF を行い 40 %程度を胚盤胞期胚へ発達させることに成功した。Yamashita et al. (2011) は、ブタ COC の培養において、FSH により prostaglandin E2 receptor 2 (EP2) が発現し、それを prostaglandin E2 (PGE2) で刺激することで、EGF like factor の発現、卵丘細胞の膨潤、卵成熟が起こることを認め、PGE2 の重要性も示した。このように、家畜卵においては、FSH 刺激を行っていない小さな胞状卵胞から回収した COC においても、卵胞発育を模倣する低濃度の FSH 添加培地で前培養し、卵丘細胞での受容体発現を誘導し、それを刺激する培地に移すことで、排卵過程の卵成熟を模倣する培養系が構築された。一方、ヒト卵においては、1960 年代に体外成熟卵を用い

たヒト不妊治療への応用が試みられたが、培養条件が不十分であり、受精能が著しく低い成熟卵しか得られなかった (Edwards et al., 1969). 培地中への FSH や hCG 添加などの研究が行われたが、家畜卵とは異なり卵巣に多数ある小さな胞状卵胞からの採卵が非常に難しいこと、卵胞選択 (主席卵胞以外は卵胞発育が停止する現象) がおこるため発育した胞状卵胞から十分な数の未成熟卵を得て体外成熟させることができないことから、十分な数の卵を用いた検討ができず、培養系が確立されなかった。

1-3 体内成熟卵のヒト不妊治療への臨床応用および問題点

1960 年代では、ヒトにおいて体内で成熟した卵は、排卵し卵管内へと取り込まれてしまうため、採卵が不可能であった。しかし、卵胞発育過程を継続的に検査し、LH サージ出現をモニタリングし、その後に採卵すれば、成熟卵を体内から得ることができることになる。Stephoe (1970) により内視鏡下で排卵直前に卵胞から直接的に卵を吸引回収することで、ヒト卵巣から反復的に成熟卵を回収することが可能となった。さらに、Stephoe et al. (1978) は、発生能の低かった体外成熟卵に代わり、この方法を用いて、体内成熟卵を回収し、IVF により世界初の体外受精児 Lowise Brown を誕生させた。自然周期 (外因性 FSH を投与しない) での採卵は、ヒトは単一排卵の動物であるため、成熟卵を 1 つしか採卵できない。実際に初期の症例では、40 症例以上の採卵を行っても獲得した成熟卵は 19 個のみという採卵成功率は非常に低いものであった (Jones, 2008)。採卵の成功率を向上させるため、ヒト由来の FSH 活性を持つヒト閉経性腺刺激ホルモン (human menopausal gonadotropin: hMG) を用いた卵巣刺激法が注目された。hMG は、更年期女性の尿中に多量に排出される FSH 様作用を有する性腺刺激ホルモンであり、わずかな LH 作用も併せ持つ (Donini et al., 1966)。したがって、hMG 投与は、卵胞膜と顆粒膜細胞の両者を刺激することで、複数卵胞の発育が促され、内因性の LH サージ後の採卵により、一度の刺激周期で多数の成熟卵を回収することが可能となった。これにより、複数個の成熟卵に IVF を行い、移植することで、採卵周期あたりの妊娠率が著しく向上した (Jones et al., 1984)。しかし、この方法では、複数個の発育した卵胞からエストロジェンが分泌するため、一つ一つの卵胞の発育は不十分な段階であっても、血中エストロジェン濃度は閾値に達し、LH サージが引き起こされるという症例も多数認められた。この早期の LH サージでは、LH 受容体が発現していない発育過程の卵胞を刺激しても卵成熟を引き起こすことはできず、そのような卵胞は閉鎖してしまう (Block, 1951; Hodgen et al., 1982)。また、一部の反応した卵胞は、排卵してしまうため、採卵できない症例が多いという問題があった (Jones et al., 1984)。

LH サージは、胞状卵胞が合成、分泌したエストロゲンにより視索前野ニューロンが gonadotropin-releasing hormones (GnRH) を分泌し、これが脳下垂体の LH 産生細胞の GnRH 受容体に作用し、一過的な放出が引き起こされる現象である (Young et al., 1976; Mais et al., 1986). 継続的でなく、一過的な分泌であるのは、GnRH が作用することで受容体が分解され、その発現も抑制されることに起因している (Chappel et al., 1981). そこで、hMG 投与開始前に GnRH agonist を複数回投与することにより、脳下垂体の LH 放出機能を消失させる手法が開発された (Porter et al., 1984). 本法と LH 製剤である hCG を用いることで、排卵を人為的に誘導することが可能となって以降、エストロゲン受容体拮抗剤や GnRH 拮抗剤 (GnRH antagonist) など、自発的な LH サージ抑制下での卵巣刺激法が IVF の標準的手法となっている (Edwards, 2007). これにより、多数の卵胞を発育させ、hCG 投与により卵成熟を開始させることが可能となり、ヒト IVF により不妊治療の成功率を飛躍的に向上させ、この方法により世界中に 500 万人以上の体外受精児が誕生している (Adamson, 2012).

この卵巣刺激周期において、発育した胞状卵胞の直径の違いにより、その中にある成熟卵の受精率、移植後の妊娠率に有意差があると報告されている。Brenth et al. (1998) は、16 mm 以上とそれ以下で卵胞直径を区分し、その卵の受精率および胚移植後の妊娠率が、16 mm 以上の卵胞から回収した卵で有意に高いことを示した。Ectors et al. (1997) も、16 ~23 mm の大きな卵胞で 16 mm 以下の卵胞と比較し、回収した卵の MII 率、および IVF 後の良好胚への発達率が有意に高いことを報告している。これらのことから、卵巣刺激周期において、hCG 投与に反応し良好な成熟卵が得られる卵胞は、直径が 16 mm 以上であることが明確化された。しかし、卵巣刺激の反応性は個人差が大きく、かつ不妊治療を希望する患者は高齢化が進んでおり、卵巣刺激にほとんど反応しない患者も数多く存在する (Edwards, 2007). このため、卵胞直径を 16 mm 以上に発育させるには、大量かつ長期間の FSH 製剤投与が必要となる。一方、卵巣刺激により末梢血 estradiol (E₂) 濃度が 2500 pg/ml 以上となる FSH 製剤への反応性が良い症例 (多数の卵胞が発育する) では、採卵後に形成される黄体数も増加することで多量のプロジェステロンが分泌され、それにより卵巣過剰刺激症候群が 20 %程度で認められる (Gera et al., 2010). 卵巣過剰刺激症候群は、脳梗塞や心筋梗塞、肺梗塞などの生死に関わる重篤な症状を引き起こすことから、過度の卵巣刺激を回避する必要がある (Calorina et al., 2010). したがって、低反応性の患者や卵巣過剰刺激症候群のリスク回避のため、過度の卵巣刺激を必要としない IVM に再度注目が集まっている (Marcus et al., 2006; Edwards, 2007).

1-4 体外成熟卵のヒト不妊治療への臨床応用および問題点

ヒト IVM の臨床応用では、1991 年に Cha (1991) によって初めて妊娠例が報告された。しかし、それ以降は全世界で 1300 人程度しか出産症例がないと推察されている (Suikkari et al., 2008)。上述したように、このように IVM の普及が妨げられている理由は、外因性ホルモン投与をしない条件では、腹腔鏡下あるいは、頸膣からの超音波ガイドによる直接的採卵（頸膣採卵）においても、未成熟卵の回収が困難なことがあげられる。家畜卵の IVM では、食肉処理場で採取した卵巣から卵を直接回収するため、小卵胞からであっても、内部をシリンジの鋭端でくり抜きながら強く吸引し、効率的に採卵することができる。一方、ヒトでは腹腔鏡下あるいは頸膣採卵において、長いシリンジを卵胞に突き刺して吸引することとなる。IVM に用いる未成熟卵を回収する小卵胞では、顆粒膜細胞層から卵丘細胞の確実な剥離が難しいため、単純な吸引では卵の回収率は低い。したがって、顆粒膜細胞層から COC を遊離させた状態とした後に採卵すること、あるいは、ある程度の大きさまで卵胞を発育させ、十分な吸引力により未成熟卵を回収するかの、いずれかを行う必要があると考えられた。

Chian et al. (2000) は、COC を卵胞液中に遊離させることを目的として、採卵前にヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (human chorionic gonadotropin: hCG) 投与を行った。これは、小規模の卵胞であっても、体内の排卵刺激と同様に顆粒層細胞がプラスミンやコラゲナーゼ等のタンパク質分解酵素を発現し、COC を遊離すること期待したものである。しかし、この hCG 投与を卵巣刺激を行わない多嚢胞性卵巣の症例に実施した結果、卵胞径が 10 mm 未満の卵胞から回収される卵数は、hCG 投与の有無に関わらず変化しなかった (hCG 投与: 7.8 ± 3.9 個, hCG 非投与: 7.4 ± 5.2 個)。一方、培養による卵の減数分裂再開と進行には、hCG 投与による正の効果があり、hCG 前投与区では培養 30 時間以内に半数以上が MII に到達した。さらに、IVF 後の発生能も hCG 投与により高まることが示された。ヒト顆粒層細胞の LH 受容体は、12~15 mm 以上の卵胞で初めて発現が開始されることから (Takao et al., 1997)、hCG 投与により回収された卵の質が向上された理由は不明である。Chian et al. (2000, 2001) では、多嚢胞性卵巣の症例で hCG 投与効果を検証している。多嚢胞性卵巣では、卵胞膜における LH 受容体発現量が亢進されているため、hCG 投与により卵胞膜の黄体化が誘導されたか、あるいはアンドロジェン産生量が高まった可能性がある。高濃度のアンドロジェンは、卵丘細胞を刺激し、排卵様の変化を誘導すると近年報告されていることから (Yazawa et al., 2013)、この hCG 投与後に採卵する方法は、多嚢胞性卵巣症例においてのみ有効なのかもしれない。

多嚢胞性卵巣とは、多数の小卵胞が発育するが、排卵前卵胞までの発育が継続されない症例であることから、外因性の FSH の投与を必要とせず、ある程度の採卵可能な卵胞数を確保することができる (Adams et al., 1985). 一方、低反応性症例や卵巣過剰刺激症候群回避を目的とした IVM を実施するためには、採卵前の外因性の FSH 投与により、10 mm 程度まで数多くの卵胞を発育させる必要がある。Suikkari et al. (2000) は、正常月経周期の女性を対象として、黄体期後期から低量の FSH 製剤を 2~5 日間投与後に採卵を行った。自然周期で採卵した他の報告 (Trousseau et al., 1994; Mikkelsen et al., 1999) に比べ、採卵個数が増えると報告している。しかし、各報告者によって採卵手技が異なるため、採卵前の FSH 投与が採卵個数の増加に有効であったか否かを明確に結論づけることはできない。このため、同じ施設内で採卵手技法を一定にした上で、採卵前 FSH 投与の有効性を検討する必要がある。

FSH により卵胞発育を促すことにより、顆粒膜細胞のみでなく卵丘細胞の細胞増殖が促進され、COC の卵丘細胞層が肥厚化される (Goodhand et al., 1998). 卵丘細胞は、排卵刺激を受けた顆粒膜細胞が分泌する因子に対する受容体を持ち、卵へその情報を伝達する役割を持っていることから、その細胞数の変化は、卵の減数分裂再開・進行、受精能および発生能の獲得にも影響をもたらすと推察される。さらに、IVM においては、卵丘細胞が刺激の受け手と刺激因子の発現・分泌の両者を行うことから、細胞数の増加による影響は大きくなる。Yamashita et al. (2003) は、300 μ l の培地中で培養するブタ卵丘細胞・卵複合体数を変化させ、それが卵の減数分裂再開に及ぼす影響を検討した。その結果、個数依存的に減数分裂再開が早期に認められること、この誘導と卵丘細胞が分泌するプロジェステロン量 (培地中濃度) に正の相関が認められることを報告した。Byskov et al. (1995) は、卵丘細胞が maturation activating sterol を合成・分泌し、それが卵に直接作用して、減数分裂再開を誘起させると報告している。Shimada et al. (2006) は、卵丘細胞が発現・分泌する EGF like factor が卵丘細胞をオートクライン的に刺激し、卵丘細胞のヒアルロン酸合成と卵の減数分裂再開を促進すると報告している。すなわち、異なった卵胞発育段階から採取した COC の卵丘細胞数の違いが、卵の培養成績に影響を与える可能性を示している。したがって、異なった条件で採卵した COC の IVM では、要求される外因性ホルモンの種類および量にも違いがあると推察されるが、それを検証した報告は全くない。

さらに、卵胞発育期に卵丘細胞数が増加する過程で、卵が分泌する growth differentiation factor-9 (GDF9) や bone morphogenetic protein 15 (BMP15) が卵丘細胞の解糖系やコレステロール合成系、脂質合成系を活性化させるとの報告がある (Su et al., 2008). 卵は、解糖系

を持たないこと、分子量 1 万以下の物質はギャップジャンクションにより卵丘細胞から卵へと輸送されていることから (Grazul-Bilska et al., 1997), IVM に用いる COC により、栄養要求性もまた大きく異なっている可能性が示唆される。家畜の IVM に用いられている培地は、初期にはグルコースのみでなくアミノ酸類、脂肪酸類など栄養素に富んだ TCM199 が用いられていた (Morgan et al., 1950, 1955; Edwards, 1965; Cross and Brinster, 1970; Moor and Trounson, 1977)。しかし、これでは MII には到達するが、受精能や発生能が低いことから、栄養源をグルコースのみや、アミノ酸添加量を低減した限定培地が用いられるようになってきた。その代表的な限定培地が、ブタ卵の IVM に用いられる NCSU37 である (Petters et al., 1993)。

ヒト卵においても、最適な限定培地を作製し、それを用いた IVM を行う必要があるが、培地を作製するために個々の因子の影響についてヒト卵を用いて検討することは、倫理的にも個数確保という物理的にも実施することは難しい。一方、体内の卵成熟過程における代謝機構を解析することは、卵胞液中の代謝基質の濃度変動をとらえることにより推定することができる。このような、血液や組織液の代謝基質の変動を網羅的に検出する手法はメタボローム解析と呼ばれ、様々に疾病の原因追及やマーカーの開発に利用されている (Yuan et al., 2007; Pasikanti et al., 2008; Revelli et al., 2009)。卵胞液の代謝基質変動を網羅的にとらえることで、利用される栄養基質を選択的に加えたヒト IVM 培地を開発することができる。このように採卵条件、卵・卵丘細胞複合体の発達ステージ毎の培養条件、培地の基本組成を決定することにより、体内で起こる連続的なホルモン環境の変化を模倣した体内成熟卵と同等の高い受精能、発生能を持つ体外成熟卵を得ることができると考えられる。

2. 本研究の目的

本研究では、高い発生能を持つ成熟卵を IVM により低リスクで効率よく獲得すること、それにより IVM の不妊治療への応用を目的とした。このため、第二章では採卵前の FSH 投与による回収卵の個数や胚の発生能への影響を検討した。第三章では発生能の高い体外成熟卵を獲得するために、培地中に添加する性腺刺激ホルモンやステロイドホルモンの体外成熟卵の胚発生能に与える影響を検討した。第四章では体外成熟卵の発生能向上のため培地中の添加因子を決定するため、排卵刺激後の卵胞液を回収し、卵が IVF 後に胚盤胞期胚に到達したものと、受精後に分割期胚で発達停止したものに分類し、メタボローム解析を行った。

第二章

採卵前の卵胞刺激ホルモン投与が体外成熟培養に及ぼす影響の検討

序論

未成熟卵の体外成熟培養 (*in vitro* maturation: IVM) では、卵を直接覆う卵丘細胞が付着した卵・卵丘細胞複合体 (cumulus oocyte complex: COC) を用いる。これは、卵丘細胞の付着が見られない裸化卵の培養では、成熟後の受精能および発生能が著しく低いことに起因している (Yamauchi and Nagai, 1999)。実際、ウシIVMにおいて卵の成熟率、受精率、胚発生能は卵丘細胞層数と正の相関を示すことが報告されている (Shioya et al., 1988; Madison et al., 1992)。しかし、このような卵丘細胞が密に付着したCOCをヒトにおいて採卵することは非常に難しい。つまり、卵丘細胞層の発達は、卵胞発育期に卵丘細胞の増殖により起こるが、ヒトにおいてはこの時期に卵胞の選択が起こるため、形態良好なCOCを一つしか得られないこととなる (Block et al., 1951; Hodgen, 1982; Bird, 1987)。そこで、卵丘細胞の増殖を促すホルモン処理を行い、複数個の形態良好なCOCを回収する手法を開発する必要がある。

follicle stimulating hormone (FSH) は顆粒膜細胞のアロマターゼ発現を誘導し、それが卵胞膜で合成されたテストステロンをestradiol (E_2) へ変換して、卵胞内の局所的 E_2 濃度を飛躍的に高める (Erickson et al., 1978, 1979; Hiller et al., 1979)。未成熟ラットへの E_2 あるいはFSH単独投与は、顆粒膜細胞と卵丘細胞において細胞周期調節因子Cyclin D2を発現させ、細胞増殖を促進することが報告されている (Robker and Richards, 1998)。 E_2 受容体には $ER\alpha$ と $ER\beta$ があるが (Jensen et al., 1962; Kuiper et al., 1996)、顆粒膜細胞や卵丘細胞で発現する $ER\beta$ 遺伝子欠損マウスにおいて、胞状卵胞における卵丘細胞数が低値であることも報告されている (Kreg et al., 1998)。したがって、採卵前に体内へ外因性のFSH投与を行うことにより、発育過程の卵胞を複数個存在させるという作用のみでなく、卵丘細胞を増殖させ、形態的良好なCOCを回収できると期待できる。実際に、ヒトと同様の単一排卵動物であるウシにおいて、外因性FSH投与が血中 E_2 濃度を有意に上昇させ、4層以上の卵丘細胞層を持つCOCの回収数を有意に増加させる (Goodhand et al., 1998)。また、回収したCOCのIVM後の受精および胚発生能も向上したと報告されている。

ヒトIVMにおいて、採卵前のFSH投与効果について検討したWynn et al. (1998) は、ヒト多嚢胞性卵巣患者から回収されるCOC数がFSHにより増加し、その回収されたCOCに付着する卵丘細胞数も未投与患者と比較して二倍程度に増加したと報告している。Suikkari et al.

(2000) やMikkelsen and Lindenberg (2001) も多嚢胞性卵巣の女性において、採卵前のFSH投与がCOC数、IVM後の成熟率、体外受精 (*in vitro fertilization: IVF*) 後の受精率、妊娠・着床率を向上させることを報告した。このように多嚢胞性卵巣の症例では、FSH投与により、採卵可能な胞状卵胞数の増加と、その卵胞内での卵丘細胞の増殖に伴う卵成熟能の向上がもたらされる結果、IVMの効率がFSHにより改善されることは明らかである。さらに、多嚢胞性卵巣の女性では、FSH投与が卵胞内ホルモン環境を変化させ、卵に正の効果を間接的にもたらす可能性がある。すなわち、多嚢胞性卵巣の患者では、末梢血中のluteinizing hormone (LH)が増加し、正常月経周期の女性と比較し、LH/FSH比が増加している (Lobo et al., 1981; Shterev et al., 1982)。その結果、卵胞内はアンドロジェン優位であり、この高濃度のアンドロジェンが顆粒膜細胞や卵丘細胞の生存性、機能性を低下させている (Mori et al., 1982; Erickson et al., 1992; Billig et al., 1993; Willis et al., 1998; Jakimiuk et al., 2001)。しかし、FSHを投与することで、体内のLH/FSH比が下降するため、正常月経周期の女性と同様に、E₂優位な健康な卵胞内環境となる (Teisser et al., 1999, 2000)。これが、多嚢胞性卵巣の患者のIVMにおいて、採卵前のFSH投与について正の効果が認められた原因であれば、他の要因により不妊となり、IVMを実施する必要がある症例において、FSHを投与する効果はないのかもしれない。実際に、Trousseau et al. (1998) やMikkelsen et al. (1999) は、正常月経周期女性での採卵において、採卵数は変わらず、IVM後の卵成熟能、胚発生能、妊娠能のどれにおいてもFSH投与の有効性は確認できなかつたと報告している。

しかし、Suikkari et al. (2000) は、正常月経周期の女性において前周期の黄体期からFSH投与を行うと、自然周期で採卵した他の報告 (Trousseau et al., 1994; Mikkelsen et al., 1999) に比べ、採卵数や成熟率・受精率が向上したことを報告している。さらに、卵胞期中期でのFSH投与による卵胞選択の遅延によって、小卵胞の閉鎖卵胞への移行を阻害すること (Macklon et al., 2000) や、12 mm以下の小卵胞の増加 (Shipper et al., 1998) 等が報告されている。これらのFSHの正の効果に関する研究成果は、複数の施設での採卵実施による解析であり、ランドマイズスタディーにより実施されたものでもない。したがって、卵巣機能の状態により症例を分類し、採卵手技を一定とした施設内で、採卵前のFSH投与の有効性を再検討する必要があると考えられた。

そこで、本章では正常月経周期の女性において、採卵前のFSH投与による有効性を検討することを目的とした。このため、卵胞内環境や卵丘細胞の増殖効果については、末梢ホルモン濃度の変化や採卵数、採卵時のCOCの卵丘細胞層数に対する影響を比較し、COCの採卵時卵丘細胞層数の違いから、IVM後の成熟率 (MII率) やその体外成熟卵を用いたIVF

成績（受精率，桑実期胚到達率，胚盤胞期胚到達率）の比較を行い，卵丘細胞層数が胚発
生能・妊娠能に及ぼす影響を検討した．

材料および方法

採卵前卵胞刺激ホルモン投与

腹腔鏡検査時に IVM の実施を目的とし、未成熟卵の採卵を希望した患者のインフォームドコンセントを得て、FSH 投与を行う周期*と非投与(自然)周期にランダムに振り分けた。FSH 投与周期区では腹腔鏡検査施行 3 日前(月経開始日～9 日後)より Fertinorm P (Merck Serono Co., Darmstadt, Germany) 150 単位を 3 日間投与し、自然周期区は月経開始 3～12 日に採卵を行った。

※ヒト不妊治療は反復して採卵する症例も存在し、採卵は女性の月経周期に合わせて行われるため n 数として症例数ではなく、採卵実施数(周期数)が用いられる。

採卵から卵子回収

腹腔鏡検査時に 18 G の採卵針 (COOK MEDICAL INC, Bloomington, USA) を用いて、直径が 5～10 mm 卵胞から採卵を行った。吸引回収した卵胞液を直ちに最終濃度 0.05 % (w/v) PVP (Polyvinylpyrrolidone; Sigma-Aldrich Co., St Louis, USA), 10 % (v/v) SSS (Serum Substitute Supplement; Fuso chemical Co., Tokyo, Japan), 3 mg/ml penicilline (Meiji Seika Pharma Co., Ltd, Tokyo, Japan), 4 μ mol/ml hypoxanthin (Sigma), 3 % (v/v) heparin (Novo-Heparin; Mochida Pharmaceutical Co., Ltd, Tokyo, Japan) を添加した HEPES-medium 199 (Life Technologies Co., California, USA) と懸濁し、顕微鏡下で COC を回収した。回収した COC を 37 °C のインキュベーター内で保温した新しい回収用培地を充填した 4 穴ディッシュ (NUNC, Rochester, New York, USA) に移した。

採卵時 COC のグレーディング

採卵後の COC を倒立顕微鏡下で観察し、卵丘細胞層数によりグレード分類を行った。卵丘細胞層数が 5 層以上であればグレード A, 3～4 層はグレード B, 2 層以下はグレード C と分類した (図 1)。

IVM

回収した卵を 200 mIU/ml FSH (FertinormP; Merck Serono Co., Darmstadt, Germany), 1 IU/ml hCG (Profasi; Merck Serono Co., Darmstadt, Germany), 0.6 nmol/ml cystein (Sigma), 10 % (v/v)

男性血清を添加した medium 199 (Life Technologies) 150 μ l の入った 96 穴ディッシュ (NUNC, Rochester, New York, USA) 内の成熟培地に移し, 約 44 時間の個別培養を行った.

培養終了後に卵丘細胞を除去し, 裸化卵の第一極体の有無を観察した. MII 卵には顕微授精を実施した.

精液調整

腹腔鏡検査当日に夫から精液を採取し, 液化を確認したのち精液洗浄を行った. 37 $^{\circ}$ C, 6% CO₂, 4% O₂, 90% N₂ で平衡化した 10% (v/v) SSS (Fuso) を添加した HFF (Fuso) で希釈し, 500 \times g で 8 分間の遠心洗浄を行った. 遠心後, HFF で希釈した沈渣とテストヨークバッファー (IS Japan Co., Saitama, Japan) を懸濁し, エッペンチューブに入れ, 二日間冷蔵保存した.

顕微授精前の精液調整では, 腹腔鏡検査当日から冷蔵保存した精液を遠沈管 (Falcon 2095; Becton, Dickinson and Co., New Jersey, USA) に移し, HFF と懸濁し 500 \times g で 8 分間の遠心洗浄をおこなった. 得られた沈渣を HFF と再懸濁した.

顕微授精から胚培養

ディッシュ (Falcon1008; Becton, Dickinson) の蓋に PVP (IS Japan) ドロップ, 精子浮遊液, 10% (v/v) SSS を添加した Hepes-HFF (Fuso) のドロップを作製し, ミネラルオイル (Fuso) でカバーし, 顕微鏡下で Hepes-HFF ドロップに MII 卵を移動した. 精子浮遊液内で運動性が高く形態良好な精子の尾部をインジェクションピペット (Origio Co., Malov, Denmark) で叩いて不動化した. 不動化した精子をインジェクションピペットで吸引し, ホールディングピペットで第一極体を 6 時もしくは 12 時の方向で固定した卵に精子を 3 時の方向から注入した.

顕微授精から 20 時間以内に受精確認を行った. 受精が確認できたものは Blast assist System 1 (Origio) の 30 μ l ドロップで 3 日間培養し, その後 BAS 2 (Origio) ドロップで培養した.

胚の凍結保存

Veek (1991) や Gardner et al. (2000) の分類により内部細胞塊もしくは栄養膜がグレード B 以上のものを形態良好な胚盤胞期胚とし, 条件を満たした胚盤胞期胚は次周期以降の胚移

植のために凍結保存を行った。胚は横田式の急速凍結法（Vitrification 法，ガラス化法）に従って凍結し（Yokota et al., 2000），液体窒素内で保存した。

胚の凍結融解胚移植

27～30 °Cの恒温槽でシュークローズを融解し，ストロー内の凍結溶液を混和した。封入した胚を凍結溶液と共にファルコン 3002 に出して 5 分静置し，37 °C，6 % CO₂，4 % O₂，90 % N₂ のインキュベーター内で平衡化した BAS 2 ドロップに胚を移動し，胚が形態良好であれば，胚移植を行った。

ホルモン測定

採卵当日に患者から末梢血を採取し，免疫学的測定法による自動測定装置（AIA1800; Tosoh, Japan）で E₂，progesterone（P₄），LH，FSH の測定を行った。

統計処理

各実験のデータは医学統計解析ソフト Sarh Base（Meditech Luke Ltd, Oita, Japan）を用いてスチューデントの t 検定，Statcel -The Useful Addin forms on Excel-（OMS publishing Inc, Saitama, Japan）を用いてカイ二乗検定を行った。

実験計画

【実験 1】

FSH 投与周期区と自然周期区の患者において採卵時の患者年齢，月経周期，COC（グレード C COC 以上）が 1 個以上採卵できた症例の割合，採卵によって回収された COC 平均個数，回収された COC 総数，採卵できた COC のグレード別での回収個数，末梢血ホルモンの E₂，P₄，LH，FSH，P₄/E₂ 比，LH/FSH 比を比較し，FSH 投与による COC 個数や卵丘細胞への影響を比較検討した。

【実験 2】

FSH 投与周期区と自然周期区において IVM 後の MII 率，IVF 後の受精率，桑実期胚到達率，胚盤胞期胚到達率を比較した。さらに各周期において採卵時の卵丘細胞層数による COC

のグレード別に、IVM 後の MII 率、IVF 後の受精率、桑実期胚到達率、胚盤胞期胚到達率を比較した。

【実験 3】

形態良好な胚盤胞期胚に到達した胚を凍結保存し、次周期以降で融解し胚移植を行った。凍結率※、妊娠率、流産率を採卵時の COC グレードによって比較した。

※胚盤胞期胚に到達した胚のうち、形態良好で凍結保存に供した胚盤胞期胚の割合。

結果

【実験 1】

IVM を実施した患者の背景と卵丘細胞層数によるグレーディングを行った COC についてのグレード分布を表 1 に示した。自然周期区 (n=108) と FSH 投与周期区で (n=98) 患者の年齢・月経周期に有意差は認められなかった。グレード C COC 以上のグレードが 1 個でも採卵できた症例は、自然周期区の 52.7% に比べ、FSH 投与周期区で 72.4% と有意に増加した ($P < 0.01$)。採卵あたりの培養可能な COC 数は自然周期区で 1.58 ± 0.11 個であったが、FSH 投与周期区では 1.94 ± 0.12 個であり、後者が FSH 投与により有意に増加した ($P < 0.05$)。一方、自然周期区と FSH 投与周期区で採卵された COC において、COC のグレード分布による差は認められなかった。両周期で 2~4 層の卵丘細胞層を持つグレード B COC が最も多く採卵され、半数以上を占めた。

自然周期区と FSH 投与周期区において、採卵時に同一グレードの COC が採卵された症例で、末梢血中のホルモン濃度 (FSH, LH, E_2 , P_4 , P_4/E_2 比, LH/FSH 比) を比較解析した (表 2)。FSH 投与周期区 (n=37) は自然周期区 (n=40) と比較して、末梢血中 FSH 濃度に有意差は認められなかったが、高い傾向が認められた。反対に LH 濃度は、FSH 投与周期区で自然周期区と比較し、低い傾向であった。LH/FSH 比は、FSH 投与周期区が有意に低値を示した ($P < 0.05$)。

E_2 濃度においては、FSH 投与周期区で 155.56 ± 18.69 pg/ml、自然周期区で 99.39 ± 10.53 pg/ml であり、前者が後者より有意に高かった ($P < 0.01$)。 P_4 濃度および P_4/E_2 比は、FSH 投与周期区と、自然周期区との間に有意差は認められなかった。

【実験 2】

自然周期区 (n=39) と FSH 投与周期区 (n=44) の COC において IVM 後の MII 率と IVF 後の受精率、桑実期胚到達率、胚盤胞期胚到達率を比較し、カイ二乗検定を行った (図 2)。 MII 率には両区に差はないものの、それ以降の各胚発生率は自然周期区と比較し、FSH 投与周期区で高い傾向にあった。特に桑実期胚到達率では有意差 ($P < 0.05$) が認められた (自然周期区: 15.4%; FSH 投与周期区: 36.4%)。

自然周期区と FSH 投与周期区において、採卵時の COC グレード別に IVM 後の MII 率と各胚発生率の比較を行った (図 3)。まず、自然周期区では MII 率、受精率のそれぞれに採卵時 COC グレードによる差はほとんど見られず、グレード A COC において桑実期胚到達率 (33.3%)、胚盤胞期胚到達率 (33.3%) でもっとも高い傾向を示したが、他のグレード

COC との間には有意差は得られなかった。FSH 投与周期区では、受精以降ではグレード B COC が各発生への到達率が高く、受精率は 68.4%，桑実期胚到達率は 52.6%，胚盤胞期胚到達率は 42.1%であった。グレード C COC では受精率 33.3%，桑実期胚到達率 16.7%，胚盤胞期胚到達率 16.7%と各発生への到達率が最も低く、グレード B COC と比較して、受精率、桑実期胚到達率に有意差 ($P < 0.05$) が認められた (図 3)。

【実験 3】

MII 卵を用いて顕微授精により得られた受精卵を培養し、胚盤胞期胚まで培養を行い、形態良好であったものを凍結保存した。凍結融解胚移植を希望した患者に、採卵周期の次周期以降に患者の子宮着床最適時期に併せて胚を融解し、胚移植を行った (表 3)。自然周期区において、3 症例の凍結胚融解を行い、1 症例は融解後、胚の形態不良により胚移植が中止され、2 症例の胚移植を行ったが、妊娠は確認できなかった。

FSH 投与周期区での COC グレード別の凍結率、妊娠率、流産率を表 3 に示した。これらの項目において各グレード間でカイ二乗検定を行った。形態良好で凍結保存に供した胚盤胞期胚の割合 (凍結率) に関して、各グレード間に有意差は認められなかったが、グレード B COC が最も高かった (グレード A: 40.0%；グレード B: 70.0%；グレード C: 45.5%)。グレード A COC では、1 症例に胚移植を施行したが、妊娠例は得られなかった。グレード B COC の妊娠率は 44.4%，流産率 25.0%，グレード C COC は妊娠率 66.7%，流産率 16.7%であった。妊娠率、流産率においてグレード B COC とグレード C COC の間に有意差は認められなかった。FSH 投与周期区全体の妊娠成績は妊娠率 52.6%，流産率 20.0%であった。

考察

体外成熟卵を用いた体外受精胚移植において、多嚢胞性卵巣の症例では採卵前の外因性 FSH 投与が採卵個数や体外成熟卵の受精後の胚発生能、妊娠能を向上させるとの報告は多くある (Wynn et al., 1998; Suikkari et al., 2000; Mikkelsen and Lindenberg, 2001) . 一方、正常月経周期の女性において採卵前の外因性 FSH 投与の有効性ははっきりとした結論が出ていない. 正常月経周期の女性において外因性 FSH 投与が有効であったと報告している Suikkari et al. (2000) は、自然周期で採卵した他の報告 (Trounson et al., 1994; Mikkelsen et al., 1999) に比べ、採卵数が増加すると報告している. このため、採卵成績を比較した各報告者によって採卵手技が異なり、FSH 投与の有効性をはっきりと肯定できない要因となっている. そこで、本章では採卵手技を一定とした条件下で正常月経周期の女性において採卵前の外因性 FSH 投与が有効であるかを検討した.

本章実験 1 において、正常月経周期の症例で外因性 FSH 投与により平均採卵個数が有意 ($P < 0.01$) に増加し (FSH 投与周期: 1.58 ± 0.11 ; 自然周期: 1.94 ± 0.12) , 採卵の成功率が増加することが示された. しかし、FSH 投与周期区と自然周期区で採卵された COC のグレード分布に差は無く、FSH 投与による卵丘細胞の増加効果は得られなかった. 多嚢胞性卵巣の症例では、未熟卵の採卵前の外因性 FSH 投与により卵丘細胞数が増加し、採卵数の増加が報告されている (Wynn et al., 1998; Suikkari et al., 2000; Mikkelsen and Lindenberg, 2001) . この事実から、正常月経周期の症例では多嚢胞性卵巣と同様に FSH が採卵可能な卵胞数を増加させるが、個々の卵胞内の細胞増殖には影響を与えないことが示された. これは、多嚢胞性卵巣では、卵胞を裏打ちする顆粒膜細胞層と卵を覆う卵丘細胞層が共に希薄化すると報告されていることから (Chang et al., 2007) , 外因性 FSH 投与が個々の卵胞内の環境をも改善することを示している. 一方、採卵手技を一定とした施設内で正常月経周期の症例において採卵前の FSH 投与は、閉鎖する卵胞数を減少させることにより、採卵数のみが増加することが示された.

採卵時の卵丘細胞層数と IVM 後の成熟能や胚発生能との間には正の相関があると報告されている (Shioya et al., 1988; Madison et al., 1992) . FSH 投与周期区と自然周期区のコCの卵丘細胞層数に差は見られないにもかかわらず、本章実験 2 では両周期の卵の成熟能、胚発生能を比較すると、受精以降の各発生率が FSH 投与周期で高い結果となり、特に桑実期胚到達率では有意差が認められた ($P < 0.05$) . そこで、両周期の末梢血ホルモン濃度から、自然周期区においては FSH 投与周期区と比較し、LH/FSH 比が有意 ($P < 0.05$) に増加してお

り（表 2），特に自然周期区の LH/FSH 比は 1.0 を超えていた．卵胞期中期において FSH 濃度が下降し，LH 濃度が上昇することで卵胞選択が行われるが，LH 優位な環境に置かれた自然周期区の COC では卵胞選択が開始され，多くの小卵胞が閉鎖卵胞へ移行したと考えられた．一旦卵胞閉鎖が起こると，顆粒層細胞のアポトーシスが始まっていることが報告されている（Kimura et al., 1999; Mcgee et al., 2000）．つまり，卵丘細胞の数に違いが無くても，卵丘細胞の機能は低下していると考えられた．このように自然周期区では卵胞選択が開始されていると考えられるため，閉鎖に向かうと思われる卵胞から採卵した卵が IVM により成熟しても，発生能が低いことが示唆された．

自然周期区では卵胞選択が始まっており，閉鎖に向かうと思われる卵胞から採卵されたため，FSH 投与周期区に比べ，発生能が低いと思われた．しかし，自然周期区において 5 層以上と最も卵丘細胞が付着したグレード A COC では，FSH 投与周期区と同程度の胚盤胞期胚到達率を示した．自然周期区だけで採卵時の卵丘細胞層数によって成熟能，受精能，胚発生能を比較すると，やはり卵丘細胞層数の増加が卵の受精後の発生能を向上させることが示された．

このように自然周期区において，胚発生能を比較すると，卵丘細胞層数と胚発生能が比例し，グレード A COC が最も胚発生能が高かった．しかし，FSH 投与周期区において発生能が最も高いのは，グレード A COC ではなかった．ブタにおいて卵丘細胞の付着が不十分な場合，IVM の培養初期に FSH， E_2 の添加によって卵丘細胞を増殖させてから，卵成熟過程に移行することで発生能が向上することが報告されている（Kawashima et al., 2008）．既に十分な卵丘細胞が付着しているグレード A COC では，培地中 FSH による細胞増殖効果は必要ではないと考えられた．このため，卵丘細胞の増殖期間が必要でないグレード A COC では，培地中の hCG 作用による卵成熟過程の開始が卵丘細胞層数の少ないグレード B，C COC よりも早いため，過熟卵となった可能性が考えられた．このようにグレード A COC では IVM での FSH の細胞増殖作用は必要ではないと考えられるが，FSH は細胞増殖以外にも卵丘細胞の LH 受容体の形成を行うことが知られている（Zelevnik et al., 1974; Richards et al., 1976; Erickson et al., 1979）．採卵時の卵丘細胞には LH 受容体はほとんど発現していないため（Peng et al., 1991; Chen et al., 1994; Jeppesen et al., 2012），培養系への FSH 添加が必要となる．ブタにおいては IVM での FSH による機能的 LH 受容体の形成は培養後 12 時間以降で急激に増加することが報告されている（Shimada et al., 2003）．このため，ヒト IVM においてもグレード A COC の LH 受容体の形成期間を検討し，グレード A COC に適切な培養時間の再設定をすることや，ヒポキサンチンや isobutylmethylxanthine (IBMX) などの卵成熟

抑制因子の添加により、卵の過熟を阻止することがグレード A COC の発生能の向上に効果的であると考えられた。

FSH 投与周期区において、グレード A COC よりも発生能が高かったのは 3~4 層の卵丘細胞層を持つグレード B COC であった。グレード B COC ではグレード A COC のように卵丘細胞が十分に付着していないため、IVM 時に卵丘細胞の増殖過程を経てから卵成熟過程に移行したと考えられる。このため、グレード B COC では本実験の培養時間が適切であり、発生能の向上に繋がったと考えられた。

実験 3 より、最も発生能が高かったグレード B COC では胚盤胞期胚に達した 70% が形態良好で凍結保存が可能であった。凍結融解後の胚移植において、FSH 投与周期区全体では妊娠率は 52.6% であった。採卵時の卵丘細胞別に妊娠率を比較すると、グレード B COC とグレード C COC で同程度の妊娠率であった（グレード B COC: 44.4%; グレード C COC: 66.7%）。発生能が低かったグレード C COC であっても、形態良好な胚盤胞期胚に達したものは、グレード B COC と同程度の妊娠能を有することが明らかになった。このことから、グレード C COC であっても、培養環境の改善により MII 率、受精率、胚発生率の向上が可能であれば、体外受精胚移植において妊娠率向上が期待される。このため、グレード C COC での発生能の向上を目的に培養条件の検討を第三章で行った。

以上より、正常月経周期の女性において、採卵前の外因性 FSH 投与により採卵数が向上することが示された。FSH 投与により卵胞閉鎖が阻害され、IVF 後の胚の発生能が向上することが示された。自然周期区、FSH 投与周期区共に、卵丘細胞層数の違いにより胚の発生能が影響を受けること、FSH 投与周期区のグレード B COC で発生能が最も高いことが示された。FSH 投与周期区のグレード C COC 由来の形態良好な胚盤胞期胚は、グレード B COC 由来の胚盤胞期胚と同程度の妊娠能を有することが示された。

要約

ヒト IVM を目的とした未成熟卵の採卵では、性腺刺激ホルモン投与により多嚢胞性卵巣の女性では採卵個数や発生能が向上すると多く報告されているが、正常月経周期の女性では採卵前の性腺刺激ホルモンの投与に関して、はっきりとした結論は出ていない。

このため、本研究では正常月経周期の女性において FSH 投与の有効性を検討することを目的にし、採卵個数、採卵時の末梢血ホルモン濃度、採卵時の COC 形態像による卵成熟能、胚発生能、妊娠能の比較を行った。

本章実験 1 により、FSH 投与周期区と自然周期区を比較し、採卵時 COC のグレード分布に変化は無く、両周期共にグレード B COC の割合が最も高く 50 %以上であった。また、FSH 投与により採卵率や、平均採卵個数が有意に増加した。末梢血ホルモンでは FSH 投与により E₂ 濃度は有意に増加し、LH/FSH 比は有意に減少し、P₄/E₂ 濃度は減少傾向にあった。

本章実験 2 より、FSH 投与周期区で、自然周期区と比較し、受精後の胚発生能は向上した。卵丘細胞層数により、COC の受精後の発生能は異なり、FSH 投与周期区のグレード B COC が 42.1 %と最も胚盤胞期胚到達率が高かった。

本章実験 3 では、FSH 投与周期区において発生能が最も高かったグレード B COC において、凍結率 (70 %) が最も高かった。FSH 投与周期区で発生能が最も低かったグレード C COC において、凍結後の妊娠率 (66.7 %) と流産率 (16.7 %) はグレード B COC (妊娠率: 44.4 %; 流産率: 25.0 %) との間に有意差は認められず、同程度の妊娠能を有していることが示された。また、FSH 投与周期区全体の妊娠成績は妊娠率 52.6 %, 流産率 20.0 %であった。

以上より、正常月経周期の女性において FSH 投与により卵丘細胞の増加効果は得られなかったが、自然周期区と比較し、卵胞内ホルモン環境が改善された卵胞から発生能の高い卵の獲得数が増加した。採卵時の卵丘細胞層数によって受精後の発生能は異なり、FSH 投与周期区において最も多く採卵されたグレード B COC の発生能が最も高かった。FSH 投与周期区全体の妊娠率 52.6 %であり、形態良好な胚盤胞期胚に到達した場合、採卵時の COC グレードによって妊娠能に差は認められなかった。

表1. 自然周期区とFSH投与周期区の患者背景と採卵成績.

	自然周期区	FSH投与周期区	<i>P value</i>
周期数 ^{※1}	108	98	
患者年齢	32.76 ± 0.36	31.99 ± 0.40	
採卵日	8.94 ± 0.36	8.60 ± 0.28	
COCが1個以上採卵できた周期 ^{※2}	57 (52.7%)	71 (72.4%)	<i>P</i> < 0.01
回収されたCOC个数	1.58 ± 0.11	1.94 ± 0.12	<i>P</i> < 0.05
COC総数	91	137	
グレードA COC	10 (11.0%)	21 (15.3%)	
グレードB COC	50 (54.9%)	76 (55.5%)	
グレードC COC	31 (34.1%)	40 (29.2%)	

※1 採卵実施数を示す.

※2 グレードC以上のCOCが1個以上採卵できた周期

周期数, COC総数, グレードA COC, グレードB COC, グレードC COCの数値は対象区におけるn数を示す. それ以外の項目の数値は平均値 ± 標準誤差を示す.

()内の数値は各項目の対象区における割合(%)を示す.

各項目における自然周期区とFSH投与周期区の間に有意差あり (*P* < 0.01, *P* < 0.05).

表2. 自然周期区とFSH投与周期区での末梢血中ホルモン濃度 (FSH, LH, E₂, P₄).

	自然周期区	FSH投与周期区	<i>P value</i>
周期数	37	41	
FSH [mIU/ml]	7.22 ± 0.48	8.21 ± 0.46	
LH [mIU/ml]	8.41 ± 1.43	6.02 ± 0.88	
E ₂ [pg/ml]	99.39 ± 10.53	155.56 ± 18.69	<i>P</i> < 0.01
P ₄ [ng/ml]	0.56 ± 0.08	0.63 ± 0.10	
P ₄ /E ₂ ratio[-]	8.36 ± 1.52	5.98 ± 1.07	
LH / FSH ratio [-]	1.23 ± 0.19	0.77 ± 0.10	<i>P</i> < 0.05

周期数の数値は対象区の n 数, それ以外の項目の数値は平均値 ± 標準誤差を示す.

各項目における自然周期区とFSH投与周期区の間に有意差あり (*P* < 0.01, *P* < 0.05).

表3. FSH投与周期における採卵時COCグレード毎の凍結・妊娠成績.

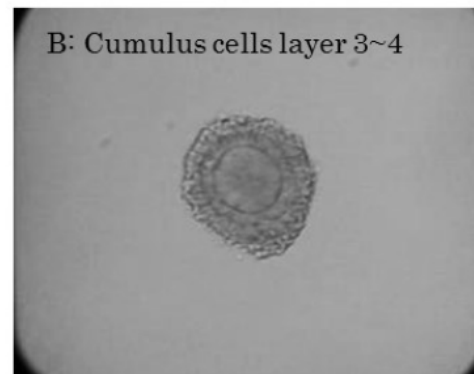
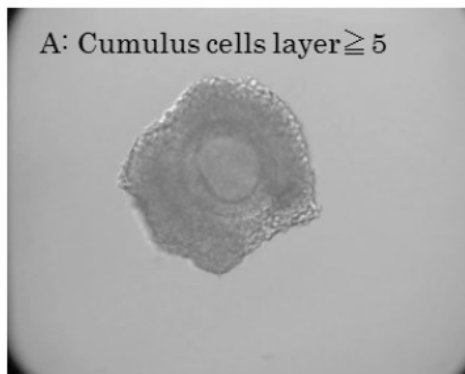
	A	B	C
凍結率*[%]	40.0 (2/5)	70.0 (14/20)	45.5 (10/22)
妊娠率 [%]	0 (0/1)	44.4 (4/9)	66.7 (6/9)
流産率 [%]		25.0 (1/4)	16.7 (1/6)

※胚盤胞期胚に到達した胚のうち、形態良好で凍結保存に供した胚盤胞期胚の割合.

各項目の数値は各COCグレードでの割合を示す.

() 内の数値は、凍結率では (凍結した胚盤胞期胚数/胚盤胞期胚数) ,
妊娠率は (妊娠数/胚移植実施数) , 流産率は (流産数/妊娠数) を示す.

Good morphology group



Poor morphology COC

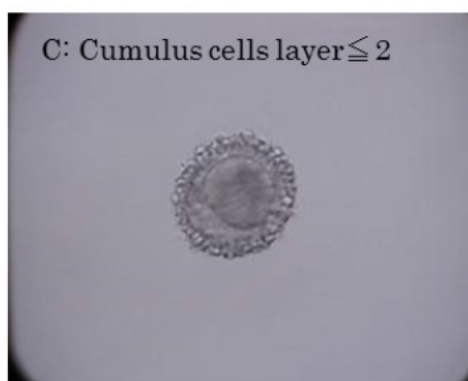


図 1. 採卵後の COC の卵丘細胞層数によるグレーディング.

Good morphology グループ.

(グレード A COC) 卵丘細胞層数が 5 層以上.

(グレード B COC) 卵丘細胞層数が 3~4 層.

Poor morphology COC.

(グレード C COC) 卵丘細胞層数が 2 層以下.

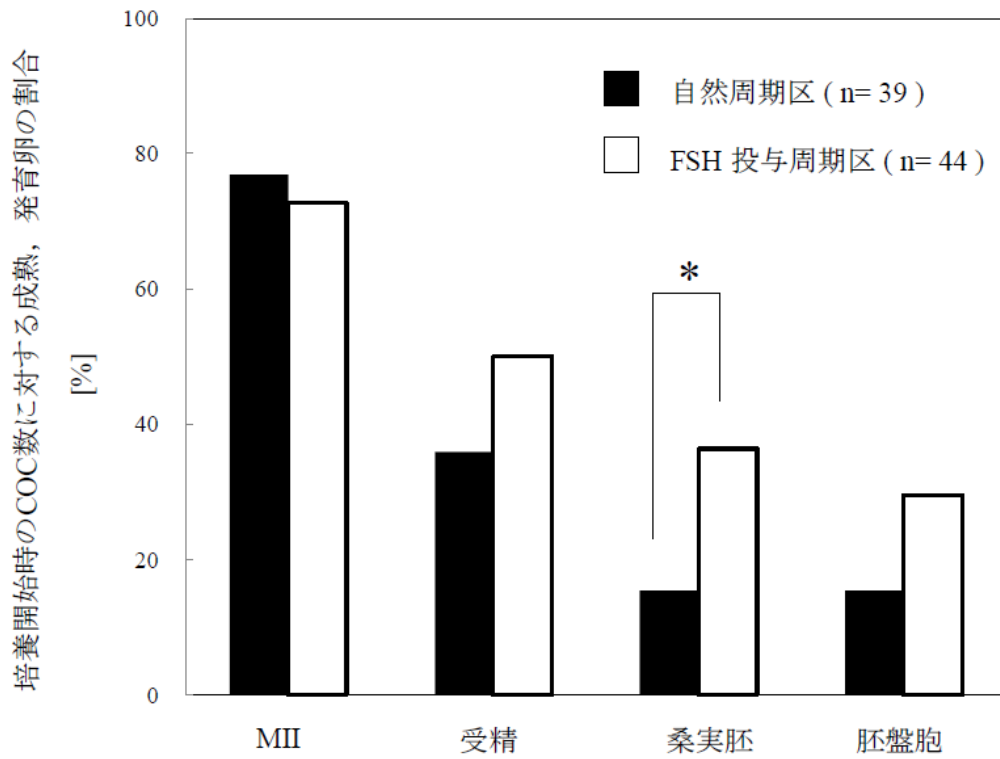


図2. 自然周期区とFSH投与周期区におけるIVM, IVF後のMII率, 受精率および胚発生率.

*; 各項目における自然周期区とFSH投与周期区の間に有意差あり ($P < 0.05$) .

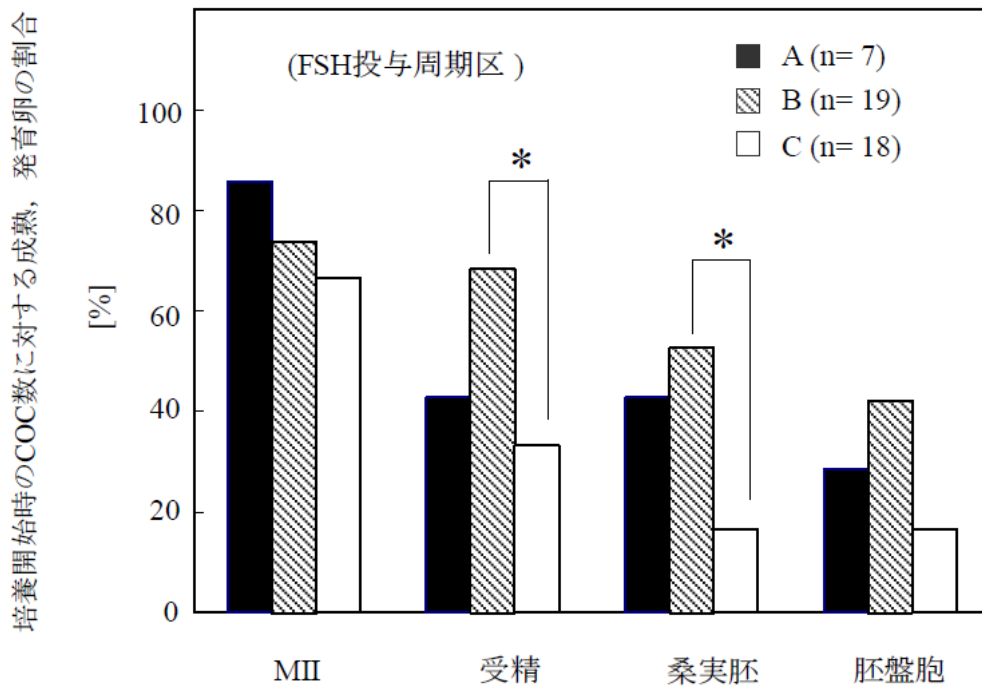
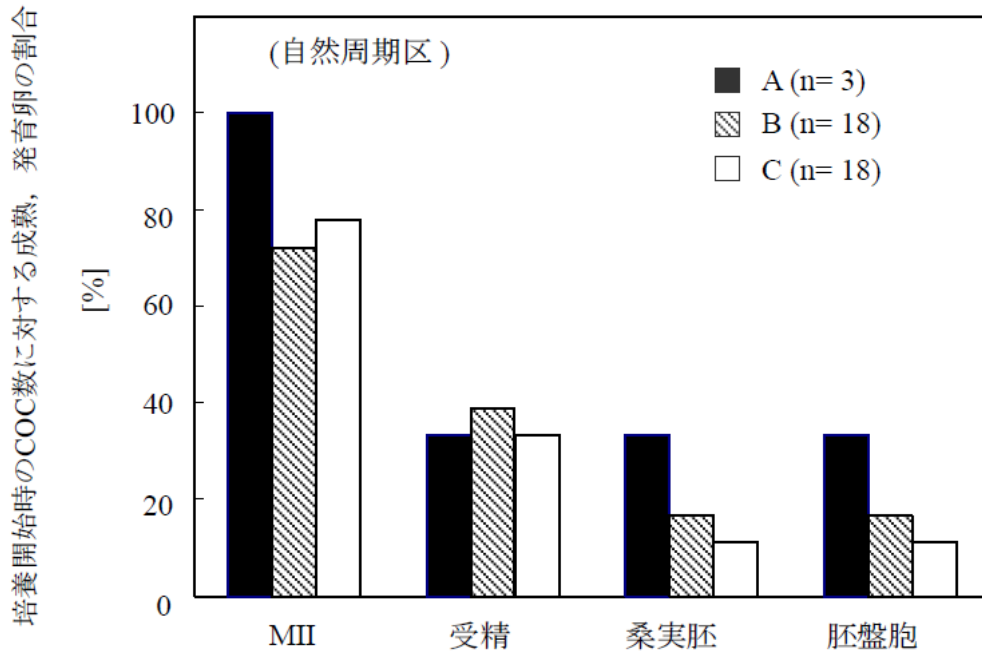


図3. 採卵時グレードにおけるIVM，IVF後のMII率，受精率および胚発生率.

*: 各項目におけるCOCグレードの間に有意差あり ($P < 0.05$) .

第三章

体外成熟培養における培養条件の検討

序章

第二章より、ヒト体外成熟培養 (*in vitro* maturation: IVM) によって得られた成熟卵による体外受精後の発生能が、採卵時の卵・卵丘細胞複合体 (cumulus oocyte complex: COC) に付着した卵丘細胞層数により異なることが明らかになった。この事実から、卵丘細胞層数によりIVMにおける培養条件を変えることが有効である可能性が示唆された。follicle stimulating hormone (FSH) 投与周期区で採卵されたCOCでは、全体の50%以上がグレード B COCであり、それらCOCの発生能は高く、40%以上が胚盤胞期胚に達した。グレード C COCも全体の約30%を占めたが、これらの発生能は低かった。したがって、ヒトIVMの技術的向上のためには、グレード B COCに次いで採卵数の多かったグレード C COCに適した培養条件を検討する必要がある。ヒトでは、体外成熟卵よりも体内成熟卵の発生能が高いことが報告されており (Trounson et al., 2001; Suikarri et al., 2007)、体内での卵成熟過程を模倣することのできる培養条件の検討によって、体外成熟卵の細胞質成熟を促進できると考えられる。

体内では、luteinizing hormone (LH) が顆粒膜細胞に発現したLH受容体に作用し、顆粒膜細胞の黄体化、卵丘細胞の膨潤、卵成熟が促進され、膨化したCOCの状態でも卵管へと排卵される (Richards et al., 1994, 1998)。近年のマイクロアレイを用いた網羅的解析により、LHサーージ後に顆粒膜細胞から局所性の生理活性因子が放出され、それが卵丘細胞に作用することで、上記の卵丘細胞の機能的変化を伴った卵成熟が誘起されることが明らかになってきた (Richards, 2001; Park et al., 2004; Conti et al., 2006; Fan et al., 2009)。具体的には、LHサーージにより卵胞内のestradiol (E₂) 濃度は減少し、progesterone (P₄) やprostaglandin E₂ (PGE₂)、EGF like factorが排卵前卵胞で増加することが報告されている (Ainsworth, 1980; Sirois et al., 1992; Wong et al., 1992; Richards, 1994; Joyce et al., 2001)。PGE₂の受容体は卵丘細胞に発現し、その刺激はcAMPを増加させる (Breyer et al., 1996; Takahashi et al., 2006)。このcAMPの増加はprotein kinase A - cAMP responsive element binding protein (PKA-CREB) 系を活性化し、それによりEGF like factorの発現および放出が亢進され、卵丘細胞の膨潤と卵成熟が引き起こされる (Park et al., 2004)。また、LHサーージは、顆粒膜細胞における*Cyp11a1*や*Star*の発現を上昇させ、*Cyp19a1*発現を低下させることで、卵胞内をP₄有意な環境へと変化させ

るが (Richards, 1994; Richards et al., 2001; Sue, 2006) , このP₄は卵丘細胞にはパラクライン的に、顆粒膜細胞にはオートクライン的に作用する。Mori et al. (1977) は、eCG + hCGを投与したラットにP₄中和抗体を投与すると、排卵と卵の減数分裂再開が有意に抑制されると報告した。また、P₄受容体をコードする*Nr3c3*遺伝子欠損マウスとPGE₂合成酵素であるcyclooxygenase-2 (COX-2) をコードする*Ptgs2*遺伝子欠損マウスにおいてEGF like factorの遺伝子発現が有意に低下することが報告されていることから (Shimada et al., 2006) , EGF like factor, PGE₂, P₄はそれぞれが相互作用して体内で卵成熟、排卵過程を行うことが考えられた。このため、顆粒膜細胞が存在しないCOCのIVM環境においても、LHサーージ後に顆粒膜細胞が分泌する二次因子に着目した研究を行い、体内の卵成熟過程を再現する必要があると考えられる。

マウス、ラット、ヒトでは、採卵されたCOCの卵丘細胞においてLH受容体の発現が顆粒膜細胞と比較し、著しく低いことが報告されている (Peng et al., 1991; Chen et al., 1994; Jeppesen et al., 2012) . LH受容体はFSHによって誘導されるため (Chen et al., 1994; Shimada et al., 2003) , 体外成熟培養において体内と同様のLH刺激により分泌される二次因子の関与した卵成熟過程を模倣するには、培養系へのFSH添加によるLH受容体の形成が必須であると考えられる。体外培養におけるブタ卵の成熟過程では、添加されるFSH濃度は20 mIU/mlをピークとしてLH受容体の形成と正の相関が認められることが報告されている (Okazaki et al., 2003) ことから、培地中に添加するFSH濃度の適正值が存在することが考えられた。FSHの体外成熟培養系への添加は、LH受容体の形成以外にも、受精後の胚発生能を向上することが報告されている (Armstrong et al., 1991; Moor et al., 1998) . しかし、培養後期までの継続的なFSH単独添加環境は、卵の発生能を低下させるとの報告もある (Funahashi et al., 1994) . したがって、FSHの至適濃度とLHとの最適な組合せを検討するために、FSHやLHの作用機序と生理的役割を解明する必要があると考えられる。

FSH受容体は、LH受容体とは異なり恒常的に卵丘細胞上に発現し (Van et al., 1996; Jeppesen et al., 2012) , FSHが作用することでcAMPを生産させる (Mattioli et al., 1994; Sirad et al., 2007) . 卵丘細胞におけるcAMP量を直接的にforskolinにより制御すると、低量では卵丘細胞の増殖を促進し、高濃度ではP₄生産を促す (Shimada et al., 2002) . 一般的にIVMでは、卵胞発育期を模倣するような低濃度のFSH添加量ではなく、その100倍ほどの高濃度FSHが添加されるために、卵丘細胞でcAMP合成が著しく亢進される結果、体内では起こりえないFSHによる卵成熟が引き起こされる (Racowsky, 1985; Mattioli et al., 1994; Sirad et al., 2007) . ブタCOCのIVMにおいて、LH受容体を形成させるような低濃度のFSH添加ではcAMP量は低

値であり、FSH、LHの両者を添加した場合にcAMPは有意に増加し、その結果、P₄分泌濃度も増加することが報告されている (Shimada et al., 2002) . さらに、ブタCOCのFSH、LHを添加したIVMにおいて、培養系にさらにP₄受容体のantagonistを添加した場合、卵丘細胞は膨潤せず、胚盤胞期胚到達率も著しく低下したことが報告された (Shimada et al., 2004 a, b) . また、ブタにおいてFSH、LHを添加してCOCを単独培養した場合、卵丘細胞によって分泌されるP₄分泌量の不足からGVBDの遅延が起これ、外因性P₄ (培地中濃度: 20 ng/ml) を培養系に添加することでGVBDの遅延が解消したことが報告されている (Yamashita et al., 2003) . このようにIVM系に添加するFSH、LHにより培地中のP₄分泌濃度が影響されること、分泌されたP₄は二次因子として卵成熟と卵丘細胞の膨潤に関与し、更にはその後の胚発生にも影響すると考えられた. これらから、IVMによって発生能の高い卵を得るには、まず培地中へのP₄分泌を促進できる最適なFSH、LHの添加濃度の検討が必要であると考えられた.

また、第二章において、グレード C COCは卵丘細胞の付着が最も少ないために、体外培養時にCOCから分泌される培地中のP₄分泌濃度の不足により胚の発生能が低い可能性が考えられた. しかし、ヒトにおいては、Hasegawa et al. (2005) により、P₄受容体が体内成熟卵において卵丘細胞上に一時的に出現するとあるが、ヒトIVMにおけるP₄に関する報告はない. そこで、本章では体外成熟培養により発生能の高い卵を獲得することを目的に、体内での卵成熟過程を模倣できるホルモン添加条件の検討を行った. 培養系に添加するFSH濃度とhuman chorionic gonadotrophin (hCG) 添加の有無、IVM後の卵丘細胞の変化とP₄分泌が体外成熟卵の受精後の胚発生能に及ぼす影響、さらに成熟培養系へのP₄添加が卵成熟と胚発生能に及ぼす影響を採卵時の卵丘細胞層数により比較することでヒトIVMの最適培養条件を検討した.

材料および方法

腹腔鏡検査施術前に IVM についての説明を行い，インフォームドコンセントを得られた症例に対して IVM を実施した．

採卵前の FSH 投与，COC の採卵，回収，実験結果の有意差検定は第二章と同様に行った．

IVM

37 °C，6 % CO₂，4 % O₂，90 % N₂ のインキュベーター内で平衡化した medium 199 (Life Technologies Co., California, USA) 入りの 4 穴ディッシュに採卵した COC を移し，3～5 時間の前培養を行った．その後，0.6 nmol/ml システイン (Sigma-Aldrich Co., St Louis, USA) と 10 % 男性血清を添加した medium 199 を基本培地として，20 あるいは 200 mIU/ml FSH (Merck Serono Co., Darmstadt, Germany) ，および 1 IU/ml hCG (Profasi; Merck Serono) を添加し，培養を行った．一部の処理区では，200 mIU/ml FSH，1 IU/ml hCG に 20 ng/ml P₄ (Sigma) を添加した．これらの IVM は，いずれも 96 穴ディッシュ内 (NUNC, Rochester, New York, USA) で各 well に 1 つの COC を入れた個別培養条件で約 44 時間行った．

前章で示した方法と同様に，培養終了後に卵丘細胞を除去し，第一極体の有無を確認した．第一極体を確認された MII 卵に顕微授精を行った．受精後，5 日あるいは 6 日まで培養を行った．

P₄ 濃度測定

培養開始 20 時間時点もしくは培養終了 (約 44 時間) 後に培地を 10 μl 採取し，免疫学的測定法による自動測定装置 (AIA1800; Tosoh, Japan) で測定を行った．

培養後の卵丘細胞における膨潤状態の観察

培養終了後に卵丘細胞の膨潤状態を観察した．卵丘細胞が著しく膨潤した COC を膨潤 2 ++，卵丘細胞が膨潤した COC を膨潤 1+ とし，IVM 後に卵丘細胞が膨潤した COC として図 4 a に示した．IVM 後に卵丘細胞が膨潤しなかった COC として，卵丘細胞が卵から分離した COC を例 1 に，卵丘細胞が培養開始より増殖しているが，膨潤しなかった COC を例 2 として図 4 b に示した．

PCR

採卵前 hMG, hCG 投与を行った体内成熟卵の卵丘細胞および IVM の培養終了後に MII であった卵の卵丘細胞から SV Total RNA Isolation System (Promega KK, Tokyo, Japan) を用いて RNA を採取した. 得られた RNA を Access RT-PCR System (Promega) を用いてプロジェステロン受容体 (*Pgr*) と β -*actin* を標的としてワンステップ RT-PCR を行った. 用いたプライマー配列と予想される生産物サイズを表 4 に示した. 48 °C, 45 分間で 5 ng の total RNA を逆転写し, 2 分間で不活化を行った.

β -*actin* 遺伝子は 94 °C/30 秒間, 56 °C/1 分間, 68 °C/1 分間 33 サイクルの条件で RT-PCR を行った後, 68 °C で 7 分間処理し PCR 産物を安定化させた. また, *Pgr* 遺伝子は 94 °C/30 秒間, 60 °C/1 分間, 68 °C/1 分間を 35 サイクルの条件で RT-PCR を行い, 68 °C で 7 分間処理し PCR 産物を安定化させた. 得られた PCR 産物を 2 %アガロースゲルを用いて電気泳動した.

実験計画

【実験 1】

自然周期区で採卵された COC を 20 mIU/ml FSH のみ, 20 mIU/ml FSH + 1 IU/ml hCG, 200 mIU/ml FSH のみ, 200 mIU/ml FSH + 1 IU/ml hCG の 4 つのホルモン添加条件にランダムに振り分けて IVM を行った. 各培地で IVM を行い, 培地中の P_4 濃度と MII 率を求めた.

【実験 2】

FSH 投与周期区において 200 mIU/ml FSH + 1 IU/ml hCG のホルモン添加条件で IVM を行い, 培地中の P_4 濃度測定を行った. 一部は P_4 分泌の経時変化を測定するために, 培養 20 時間時点の P_4 分泌濃度を測定した. 培養終了後, MII 卵と未成熟卵 (MI, GV) の培地中の P_4 濃度を比較し, MII 卵を卵丘細胞の膨潤状態により区分し, 受精率, 桑実期胚到達率, 胚盤胞期胚到達率を比較した.

【実験 3】

FSH 投与周期区において採卵した COC を培養開始時の卵丘細胞層数によりグレーディングし, 第二章において卵丘細胞層数が 5 層以上のものをグレード A COC, 3 層以上のもの

をグレード B COC と分類したが，第三章においてはこれらを Good morphology グループと分類し，卵丘細胞層数が 2 層以下のグレード C COC を Poor morphology COC として 200 mIU/ml FSH + 1 IU/ml hCG の条件で IVM を行い，それぞれが培養終了時（約 44 時間時点）に分泌した P₄濃度を比較した．また 200 mIU/ml FSH + 1 IU/ml hCG + 20 ng/ml P₄ で Good morphology および Poor morphology の COC を IVM し，培養後の MII 率，受精率，桑実期胚到達率，胚盤胞期胚到達率の比較を行った．

【実験 4】

Poor morphology および Good morphology グループの COC に IVM を行い，培養後の卵丘細胞から RNA を採取し，P₄受容体の RT-PCR を行った．体内成熟卵の卵丘細胞からも RNA を採取し，同様に P₄受容体の RT-PCR を行った．

結果

【実験 1】

自然周期区で得られた COC を用いて、IVM 時に添加する性腺刺激ホルモン濃度の検討を行った。IVM 培地に添加する性腺刺激ホルモン濃度を 20 mIU/ml FSH のみ (n=6) , 20 mIU/ml FSH + 1 IU/ml hCG (n=12) , 200 mIU/ml FSH のみ (n=4) , 200 mIU/ml FSH + 1 IU/ml hCG (n=6) と四つのホルモン添加区に区分し、各区の培養終了 (約 44 時間) 後の P₄ 分泌濃度と MII 率を比較した (図 5)。

MIII 率は、20 mIU/ml FSH 区が 50 % , 20 mIU/ml FSH + 1 IU/ml hCG 区が 41.7 % , 200 mIU/ml FSH 区が 25 % , 200 mIU/ml FSH + 1 IU/ml hCG 区が 100 % であった。すべてが MII へと成熟した 200 mIU/ml FSH + 1 IU/ml hCG の添加区と 20 mIU/ml FSH + 1 IU/ml hCG 区および、200 mIU/ml FSH のみの区との間に有意差が認められた ($P < 0.05$)。

また、培養終了後の P₄ 濃度比較を図 5 に示した。FSH のみの添加区では、P₄ 濃度が低く (20 mIU/ml FSH 区: 9.3 ± 4.5 ng/ml; 200 mIU/ml FSH 区: 5.1 ± 1.8 ng/ml) , FSH に加え hCG を添加した場合、20 mIU/ml、200 mIU/ml の両 FSH 添加濃度で P₄ 濃度は上昇した (20 mIU/ml FSH + 1 IU/ml hCG 区: 24.4 ± 9.5 ng/ml; 200 mIU/ml FSH + 1 IU/ml hCG 区: 23.3 ± 3.0 ng/ml) 。特に 200 mIU/ml FSH + 1 IU/ml hCG 区においては、hCG 無添加区と比較して P₄ 分泌濃度が有意に高い結果となった (200 mIU/ml FSH + 1 IU/ml hCG 区 vs. 200 mIU/ml FSH 区: $P < 0.01$) 。ここで、20 mIU/ml FSH + 1 IU/ml hCG 区と 200 mIU/ml FSH + 1 IU/ml hCG 区の P₄ 濃度の平均値は同程度であったが、200 mIU/ml FSH + 1 IU/ml hCG 区の培養終了時の P₄ 濃度は、すべてが 10 ng/ml 以上であったのに対し、20 mIU/ml FSH + 1 IU/ml hCG 区では半数 (6/12) が 10 ng/ml 未満であり COC によって P₄ 濃度のばらつきが著しい結果となった。

【実験 2】

FSH 投与周期区において、200 mIU/ml FSH + 1 IU/ml hCG の性腺刺激ホルモン添加条件で IVM を行った (n=10) 。膨潤し、かつ MII であった COC における 20 時間時点と培養終了後 (約 44 時間時点) の P₄ 濃度を比較した (図 6) 。その結果、培養開始 20 時間時点でも COC による P₄ 分泌は行われており、培養開始 20 時間時点よりも培養終了時で P₄ 濃度が有意に高かった ($P < 0.05$) 。

IVM 終了時に卵丘細胞が膨潤し、かつ MII へと成熟した区 (n=30) , 膨潤せずに MII へと成熟した区 (n=4) , MI, GV の未成熟卵であった区 (n=15) において、培養終了後の

培地中 P₄濃度を比較した (図 7) . その結果, 卵丘細胞が膨潤し, かつ MII であった区 (29.3 ± 6.3 ng/ml) は, 卵丘細胞が膨潤せずに MII であった区 (3.3 ± 6.3 ng/ml) , あるいは MI, GV 区 (8.2 ± 0.8 ng/ml) よりも P₄分泌量は有意に高値を示した ($P < 0.05$) . また, MI と GV の培養終了後の P₄分泌濃度を比較すると MI 区 10.4 ± 4.6 ng/ml, GV 区 4.9 ± 1.2 ng/ml と MI 区で高い傾向にあったが, 有意差は認められなかった.

さらに卵丘細胞が膨潤し, かつ MII であった区 (n= 30) と膨潤せずに MII であった区 (n= 4) の IVF 後の受精率, 胚発生率を比較した (表 5) . その結果, 卵数が少ないものの, 膨潤せずに MII であった区は, 卵丘細胞が膨潤し, かつ MII であった区よりも受精率 (50.0 % vs. 80.0 %) , 桑実期胚到達率 (25.0 % vs. 46.7 %) , 胚盤胞期胚到達率 (25.0 % vs. 40.0 %) が低い傾向にあった. いずれも有意差は認められなかった.

【実験 3】

FSH 投与周期区において採卵した COC を培養開始時の卵丘細胞層数によりグレーディングし, 卵丘細胞層数が 3 層以上の COC を Good morphology グループ (n= 31) , 2 層以下を Poor morphology COC (n= 22) として, 200 mIU/ml FSH + 1 IU/ml hCG の性腺刺激ホルモン添加条件において, それぞれの培養終了時 (約 44 時間時点) の P₄濃度を比較した (表 6) . さらに, 培養系への P₄添加の有無により卵丘細胞の膨潤状態, MII 率, 受精後の胚発生能を比較した (図 8) .

200 mIU/ml FSH + 1 IU/ml hCG の性腺刺激ホルモン添加条件において, 培養終了後の P₄分泌は, Good morphology グループでは 39.2 ± 12.8 ng/ml, Poor morphology COC では 9.7 ± 1.3 ng/ml となり, Good morphology グループと Poor morphology COC の間に有意差が認められた ($P < 0.05$) . 卵丘細胞の膨潤した COC の割合は, 有意差は認められないものの Good morphology グループで高い傾向を示した. 採卵時の卵丘細胞層数により受精後の発生能が異なることが第二章で示されたが, 採卵時の卵丘細胞層数の違いにより, 培養終了後の卵丘細胞の膨潤や P₄分泌能にも影響することが示された. これらから, Poor morphology COC では培地中の COC が分泌する P₄濃度が不足していると考えられた.

採卵時 COC 形態により IVM 後の P₄分泌が異なることが示されたため, 200 mIU/ml FSH + 1 IU/ml hCG を添加した培養区に, 20 ng/ml P₄の添加もしくは無添加で IVM を行った. そして, 採卵時 COC の卵丘細胞層数によるグレーディングにより IVM 後の MII 率や IVF 後の受精率, 桑実期胚到達率, 胚盤胞期胚到達率の比較を行い, カイ二乗検定を行った. その結果, 形態良好な Good morphology グループの COC では P₄添加により 68 %から 84 %へと

MII 率は上昇したものの、有意差は認められなかった。しかし、受精以降の各胚発生率、特に桑実期胚到達率 (P_4 無添加 39 % vs. P_4 添加 14 %: $P < 0.05$)、胚盤胞期胚到達率 (P_4 無添加 32 % vs. P_4 添加 8 %: $P < 0.01$) は有意に減少した (図 8-2)。Poor morphology COC では P_4 添加により MII 率・各胚発生率が上昇し、特に受精率では有意差が認められた (P_4 無添加 36 % vs. P_4 添加 68 %: $P < 0.05$) (図 8-1)。卵丘細胞層数が少なく、 P_4 分泌が少ない Poor morphology COC に IVM の培養開始時点で P_4 を添加することにより、受精後の胚発生率が向上したが、 P_4 分泌が十分な Good morphology グループでは、IVM への P_4 添加により、胚発生率が低下する結果となった。

【実験 4】

性腺刺激ホルモン添加条件 200 mIU/ml FSH + 1 IU/ml hCG 区において、培養終了後 (約 44 時間後) の Poor morphology と Good morphology グループの COC と採卵前 hMG・hCG 投与を行った体内成熟卵において、それぞれの卵丘細胞から、mRNA を採取し、 P_4 受容体の発現を RT-PCR により検出した (図 9)。

これらの PCR 産物に電気泳動を行うと、Poor morphology COC、Good morphology グループと体内成熟卵のいずれの卵丘細胞においても電気泳動により約 250 bp 付近にバンドが認められ、シーケンスにより 254bp の P_4 受容体であることを確認した。この結果、体内成熟卵と同様に IVM 後の卵丘細胞に P_4 受容体が存在することが示された。また、採卵時の COC における卵丘細胞層数は違っていても、 P_4 受容体は発現していることが示された。

考察

体内ではLHサージにより，顆粒膜細胞から分泌される P_4 やPGE2, EGF like factorが二次因子として卵成熟，排卵に関与することが明らかになってきた (Richards, 2001; Park et al., 2004; Conti et al., 2006; Fan et al., 2009) . こうした二次因子の一つである P_4 について， P_4 受容体のノックアウトマウスでは排卵が阻害され (Lydon et al., 1995) ，ラットでは，体内に P_4 中和抗体を投与した場合，MIIへの卵成熟が阻害されることが報告されている (Mori et al., 1983) . 体外培養においても P_4 受容体のantagonistと培養した場合，卵丘細胞は膨潤せず，胚盤胞期胚到達率も著しく低下したことが報告された (Shimada et al., 2004 a,b) . また，ブタ卵においてFSH, LHを添加してCOCを単独培養した場合，卵丘細胞によって分泌される P_4 分泌量の不足からGVBDの遅延が起り， P_4 を培養系に添加することでGVBDの遅延が回復できたことが報告されている (Yamashita et al., 2003) . これらの事実から体内と同様に体外培養においても卵成熟，受精後の発生能について P_4 が関与していることが示唆された. したがって本研究では，培地中へ P_4 分泌を促進できるFSH, LH濃度の検討と第二章で発生能の低かったグレード C COCをPoor morphology COC, 卵丘細胞層数が3層以上であったCOCをGood morphology グループとして，Poor morphology COCの受精後の発生能を向上させるためにIVMへの P_4 添加による培養条件の検討を行った.

P_4 はP450 sccと 3β HSDの二つの酵素によってコレステロールから合成され (Simpson et al., 1967; Goldschmit et al., 1989; Strauss et al., 1991) ，これらの酵素遺伝子が排卵過程で卵丘細胞上に発現することが報告されている (Richards et al., 1994) . また，卵丘細胞では*de novo* 合成によりコレステロールから P_4 合成を行うことが報告されている (Yamashita et al., 2005) . さらに， P_4 はFSH単独添加による培養よりも，FSH, LHの両者を添加した場合でその分泌量が増加することが報告されている (Shimada et al., 2003) ことから，ヒトIVMにおいて， P_4 分泌量を増加し，卵成熟を促進できるFSH, LH添加濃度の検討を行う必要があると考えられた.

本章実験1においては，自然周期で採卵されたCOCでは，FSHのみを添加した培養条件よりもFSH, LHの両者を培養系に添加することで， P_4 の分泌量が有意に増加した (200 mIU/ml FSH + 1 IU/ml hCG区 vs. 200 mIU/ml FSH区: $P < 0.01$) . 培地中にCOCから分泌された P_4 は，20 mIU/ml FSH + 1 IU/ml hCG区: 24.4 ± 9.5 ng/ml, 200 mIU/ml FSH + 1 IU/ml hCG区: 23.3 ± 3.0 ng/mlと培地に添加したFSH濃度による差は見られなかったが，培養終了後のMII率は20 mIU/ml FSH + 1 IU/ml hCG区で41.7%であったのに対し，200 mIU/ml FSH + 1 IU/ml hCG区で

は100%と、すべてがMIIへと成熟した。P₄分泌量において、20 mIU/ml FSH + 1 IU/ml hCG区と200 mIU/FSH + 1 IU/ml hCG区の間には有意差は見られなかったが、前者において培養を行ったCOC 12個の内、6個はP₄分泌濃度が10 ng/ml未満であり、その内5個が未成熟卵であった。このため、20 mIU/ml FSH + 1 IU/ml hCG区では、COCによってはFSH添加濃度が不足し、分泌されるP₄量が低いため、200 mIU/ml FSH + 1 IU/ml hCG区に比べ、MII率が低かったと考えられた。これらから、ヒトIVMにおいて性腺刺激ホルモンの添加条件として200 mIU/ml FSH + 1 IU/ml hCG区が適していると考えられた。

卵丘細胞はヒアルロン酸等の細胞外マトリックスを卵丘細胞間に蓄積し、その複合体の体積が増大し、膨潤する (Dekel et al., 1979)。マウスCOCにおける体外培養では卵丘細胞の膨潤はFSH, LH刺激により生産されたEGF like factorによって誘起されること、AREG, EREGの発現はPGEやP₄により誘導されることが報告されている (Shimada et al., 2006)。ブタCOC培養系において、RU486を添加培養後は、卵丘細胞の膨潤が抑制され、胚盤胞期胚到達率が有意に減少すると報告されている (Shimada et al., 2004c)。さらに培養系にP₄を添加した培養系で、卵丘細胞の膨潤が促進され、胚盤胞期胚到達率が増加したと報告されている (Kawashima et al., 2008)。これらから、体外培養において、EGF like factorを介して行われる卵丘細胞の膨潤は、培地中のP₄濃度に依存し、卵丘細胞の膨潤したCOCで発生能が高いことが示された。本章実験1から、性腺刺激ホルモンの添加条件を200 mIU/ml FSH + 1 IU/ml hCGとして、培養終了後の卵丘細胞の膨潤状態によりP₄分泌濃度を比較した。実験2より卵丘細胞が膨潤し、かつMIIであった区は、卵丘細胞が膨潤せずにMIIであった区と未成熟であった区に比較し、P₄分泌濃度が高く、有意差が認められた ($P < 0.05$)。さらに、IVF後の発生能を比較すると、卵丘細胞が膨潤し、かつMIIであった区で受精率、桑実期胚到達率、胚盤胞期胚到達率が高かったことから、ヒトにおいてもP₄分泌能が高く、卵丘細胞が膨潤するCOCが受精後の発生能が高いことが示された。

第二章において卵丘細胞層数の違いにより受精後の発生能の違いが明らかになったため、本章実験3においてGood morphology グループとPoor morphology COCの培養終了後のP₄濃度と卵丘細胞が膨潤したCOCの割合を比較すると、卵丘細胞の膨潤については差がなかった。しかし、P₄濃度はPoor morphology COCが著しく低く、ヒトCOCのP₄分泌は付着した卵丘細胞の数に依存することが明らかになった (Good morphology グループ: 39.2 ± 12.8 ng/ml; Poor morphology COC: 9.7 ± 1.3 ng/ml; $P < 0.05$)。一方でPoor morphology COCでも、Good morphology グループや体内成熟卵と同様にP₄受容体は発現していることが実験4において確認された。これらから、COCの卵丘細胞層数によるP₄分泌濃度の違いによって、第二章で

示した体外受精後の発生能の違いが生じると考えられた。このため、MII率や胚発生能についてP₄濃度が不足していると思われるPoor morphology COCで培養系へのP₄添加が必要であると考えられた。

卵丘細胞が膨潤し、かつMIIであった区の培地中P₄分泌の経時変化を見ると培養開始20 h時点で10 ng/mlのP₄濃度であった(図6)。Good morphology グループ(39.2 ± 12.8 ng/ml)とPoor morphology COC(9.7 ± 1.3 ng/ml)のP₄濃度の差が約30 ng/mlであったこと、Yamashita et al. (2003)によってブタのIVM開始時にP₄(培地中外因性P₄濃度: 20 ng/ml)を添加することにより、GVBDの遅延が回復できたと報告されていることを踏まえて、ヒトIVMにおいても培養開始時点から培地中外因性P₄濃度が20 ng/mlとなるようにP₄を添加した。すると、Poor morphology COCにおいて、受精率が有意に増加した($P < 0.05$)。有意差が認められないものの、MII率も増加しているため、受精率の増加に繋がったと思われた。受精以降の桑実期胚到達率や、胚盤胞期胚到達率も増加傾向にあった。このことから、Poor morphology COCにおいてIVM系にP₄を添加することは、ブタと同様に(Yamashita et al., 2003)、IVMによって得られた成熟卵の発生能を向上させたと考えられた。しかし、Good morphology グループではMII率は増加したものの、桑実期胚到達率、胚盤胞期胚到達率は有意に減少した。Good morphology グループではPoor morphology COCに比べ、培地中に分泌したP₄濃度は有意に高かったことから、更なるP₄添加により培地中のP₄濃度が過剰であったことが考えられた。発生能が低下したGood morphology グループのP₄添加区において一部のCOCに対し培地中P₄濃度の測定を行った結果、P₄濃度の平均はオートクライン分泌も含めて56.5 ± 4.7 ng/ml (n=34)であった。培地中の過剰なP₄は卵成熟をさらに加速することが予想される。このため、既に十分なP₄分泌能を持つGood morphology グループにおいては、P₄無添加培養において卵成熟過程が培養時間に対し適切であったが、P₄添加により、卵の核成熟がさらに促進され、培養終了時には細胞質の過熟を引き起こしたと考えられる。これらから、IVM時のP₄濃度は20 ~ 40 ng/mlが適切ではないかと予想される。

P₄は卵丘細胞の増殖を抑制し、膨潤を促進することが報告されており(Okazaki et al., 2003)、体外培養時に培地中に分泌されたP₄はP₄受容体を介して卵丘細胞に作用する。P₄受容体は二種類のスプライシング変異体(PR-AとPR-B)が存在し(Kraus et al., 1993; Mulac-Jericevic et al., 2000, 2003)、ブタCOCの培養において、FSH添加により培養後すぐにPR-Bが出現し、その後、PR-Aが出現する(Shimada et al., 2004 a,b,c)。PR-AはLH受容体の形成や、卵丘細胞の膨潤に関与することが報告されている(Shimada et al., 2004b)。培地中のP₄濃度の過剰により、こうしたP₄受容体の発現に影響を及ぼしたことが考えられるが、今回の実験4では二種

類のP₄受容体の共通領域を増幅させたため、P₄受容体と卵丘細胞層数による発生能の違いをはっきりと考察することはできなかった。

以上の結果より、ヒトIVMにおいては、①性腺刺激ホルモンの添加条件、200 mIU/ml FSH + 1 IU/ml hCGがもっともP₄を分泌し、MIIへと成熟したこと、②P₄を多く分泌するCOCで成熟能、受精後の発生能が高かったこと、③COCから分泌されるP₄は採卵時の卵丘細胞層数に依存すること、④卵丘細胞層の少ないPoor morphology COCには培養系にP₄を添加することで受精率が有意に増加したこと、⑤Good morphology グループでは培養系へのP₄添加により、桑実期胚到達率と胚盤胞期胚到達率が有意に減少すること、⑥Good morphology グループとPoor morphologyのCOCでIVM後の卵丘細胞にP₄受容体が発現していることが明らかになった。

これらから、ヒトIVMにおいても性腺刺激ホルモンによって分泌される二次因子であるP₄が受精後の発生能に関与することが示され、体外成熟卵の発生能を向上させるために、こうした二次因子の培養系への影響に対し検討が必要であると考えられた。近年でもブタのIVMにおいて限定培地を用いるよりも培養系への卵胞液あるいは血清成分の添加により、総合的に体外培養における胚の生産性が向上するとの報告もあり (Kishida et al., 2004; Marques et al., 2007; Bijttebier et al., 2008) , 卵の発生能に影響を与える未だに特定できていない成分因子の存在が示唆されている。また、ヒトでは倫理的な観点や採卵されるCOC個数の不足から卵成熟に関与する既知の成分因子であっても添加実験が制限される。こうした背景から、次章において卵胞液内の代謝基質の変動を網羅的に検出するメタボローム解析により、卵胞液中の成分分析を行い、ヒト体外成熟卵の発生能を向上させる成分因子の検討を行った。

要約

IVM時にFSH, LH刺激によってCOCから分泌される P_4 は, 卵丘細胞上の P_4 受容体を介して卵成熟や体外受精後の発生能に影響を及ぼすことが報告されている. 本研究では P_4 分泌を促進できる体外培養系でのFSH, LH添加濃度の検討と, 第二章において発生能の低かったPoor morphology COCの発生能を向上させるため, 培養時の外因性 P_4 添加について検討した.

本章実験1において P_4 分泌を促進できる体外培養系でのFSH, LH添加濃度の検討を行った結果, 200mIU/ml FSHと1 IU/ml hCGの両者をIVM時に添加した場合, 最もMII率が高く, 培養終了後の P_4 濃度が最も高かった. また, 実験2において培養終了後の P_4 濃度を卵丘細胞の膨潤状態と卵成熟について比較した. その結果, 卵丘細胞が膨潤し, MIIへと成熟した区では培養後の P_4 濃度は最も高く, 有意差は認められなかったものの胚発生能が高かった. このためブタ卵と同様にヒト卵においても P_4 分泌能が高く卵丘細胞が膨潤した区でMII率や受精後の胚発生能が高かった. また, この区では P_4 分泌は培養開始20時間時点で既に10 ng/ml以上が分泌されていた.

第二章で発生能の低かったPoor morphology COCについて培養終了後の卵丘細胞の膨潤と P_4 分泌濃度をGood morphology グループと比較した. その結果, IVM後の卵丘細胞の膨潤は両COCの間で差は認められなかったが, Poor morphology COCでGood morphology グループよりも P_4 分泌濃度は有意に低かった. 実験4より P_4 受容体はPoor morphology COCおよびGood morphology グループの両者における卵丘細胞で発現が確認されたため, 培地中の P_4 濃度の不足により, Poor morphology COCでIVF後の発生能が低いことが考えられた.

実験3において培養開始時からIVM系に培地中濃度20 ng/mlとなる P_4 を添加すると, Poor morphology COCではIVF後の胚発生能が向上し, 特に桑実期胚到達率で有意差が認められた. しかし, 培養系への P_4 無添加時に既に発生能の高かったGood morphology グループでは胚発生能が低下した.

以上の結果から, ヒトIVMにおいて, COCが分泌する P_4 は卵丘細胞に作用し, 卵の発生能に関与する(培地中の至適濃度は20~40 ng/mlと推察される)こと, 体外培養系で P_4 分泌濃度が不足する場合は外因性 P_4 の添加により胚発生能を向上できること, P_4 分泌濃度が十分な場合は, 外因性 P_4 の添加によって発生能が低下することが明らかになった.

表4. RT-PCRに用いたプライマー配列と増幅されるフラグメントサイズ.

mRNA	Primer sequence	Predicted product size
<i>Pgr</i>	F: 5'-AGC CCA CAA TAC AGC TTC GAG-3' R: 5'-TTT CGA CCT CCA AGG ACC AT-3'	254 bp
<i>β-actin</i>	F: 5'-CTA CAA TGA GCT GCG TGT GG-3' R: 5'-TAG CTC TTC TCC AGG GAG GA-3'	450 bp

表5. 卵丘細胞の膨潤あり，あるいは膨潤なしにより区分した卵の受精率，桑実期胚到達率，胚盤胞期胚到達率.

	卵丘細胞膨潤あり	卵丘細胞膨潤なし
卵数	30	4
受精率 [%]	80.0 (24)	50.0 (2)
桑実期胚到達率 [%]	46.7 (14)	25.0 (1)
胚盤胞期胚到達率 [%]	40.0 (12)	25.0 (1)

数値は各項目における割合，（ ）内の数値はn数を示す.

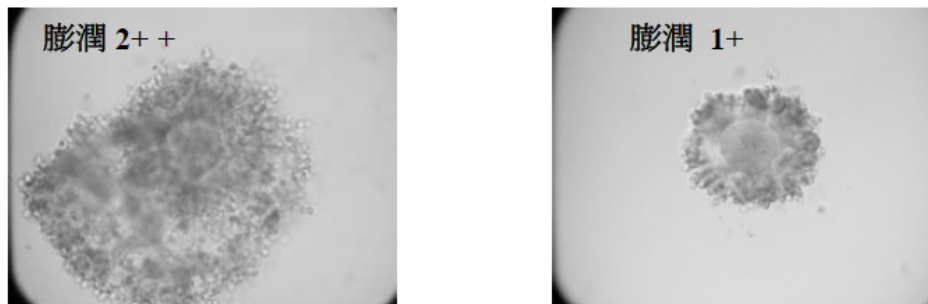
表6. Poor morphology COCおよびGood morphology グループ
 における卵丘細胞の膨潤した卵の割合とP₄濃度.

	Poor morphology COC	Good morphology グループ	<i>P value</i>
Progesterone 濃度 [ng/ml]	9.7 ± 1.3 (22)	39.2 ± 12.8 (31)	<i>P</i> < 0.05
卵丘細胞が膨潤 したCOC [%]	81.8 (18)	90.3 (28)	

Progesterone 濃度における数値は平均値 ± 標準誤差を示す。
 卵丘細胞が膨潤したCOCにおける数値は割合を示す。() 内の数値はn数を示す。

Progesterone 濃度において、Poor morphology COCとGood morphologyグループの間に
 有意差あり (*P* < 0.05)。

a) IVM後に卵丘細胞が膨潤したCOC.



b) IVM後に卵丘細胞が膨潤しなかったCOC.

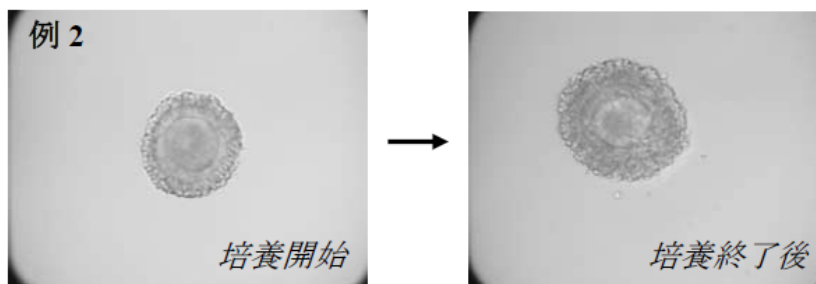
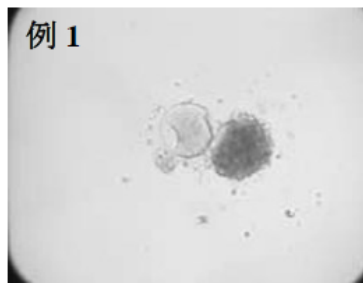
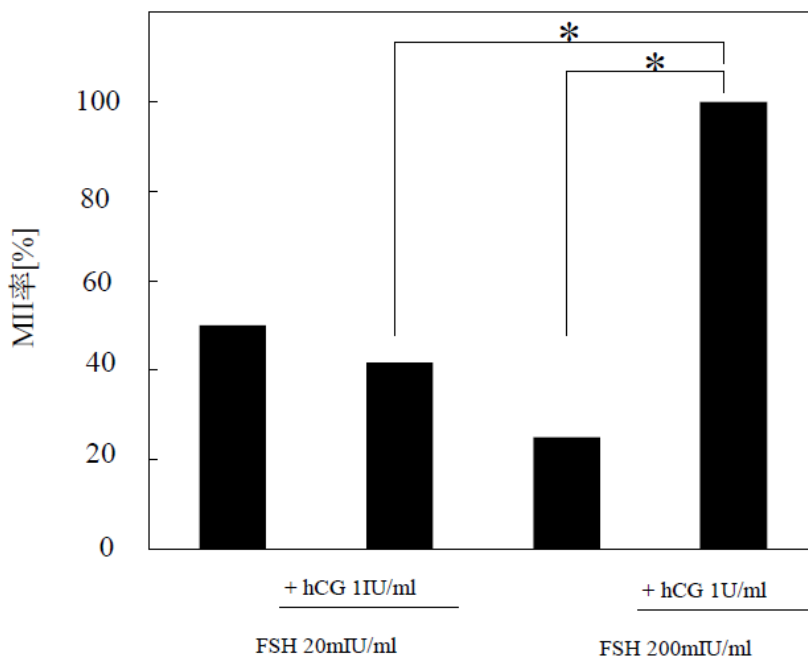


図4. IVM培養後のCOCにおける卵丘細胞の膨潤の程度.

- a) IVM後に卵丘細胞が膨潤したCOC.
 - (膨潤2++) 卵丘細胞が著しく膨潤したCOC.
 - (膨潤1+) 卵丘細胞が膨潤したCOC.
- b) IVM後に卵丘細胞が膨潤しなかったCOC.
 - (例 1) 卵丘細胞が卵から分離したCOC.
 - (例 2) 卵丘細胞が培養開始より増殖しているが、膨潤しなかったCOC.

1) MII率.



2) P₄濃度.

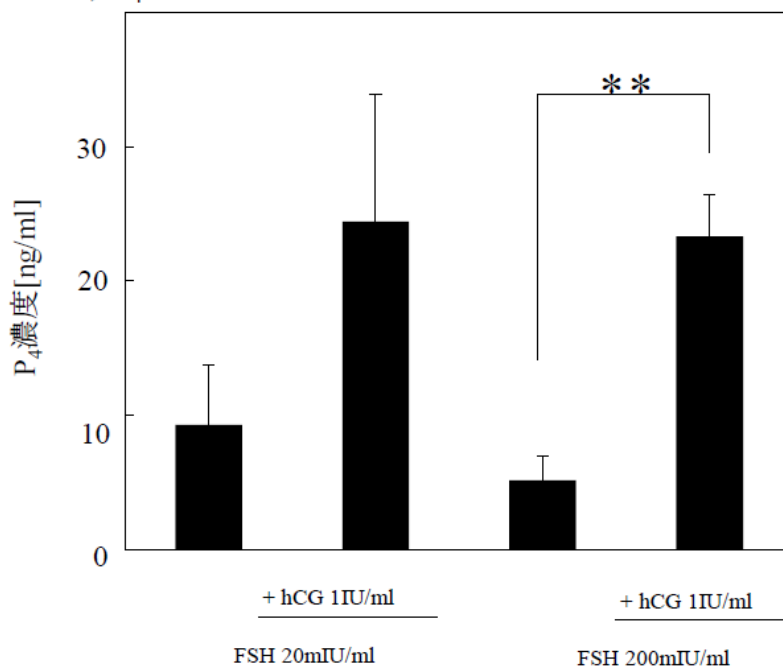


図5. 各種性腺刺激ホルモン添加培養条件におけるMII率とP₄濃度の比較.

** ; 各項目における培養条件の間に有意差あり ($P < 0.01$) .

* ; 各項目における培養条件の間に有意差あり ($P < 0.05$) .

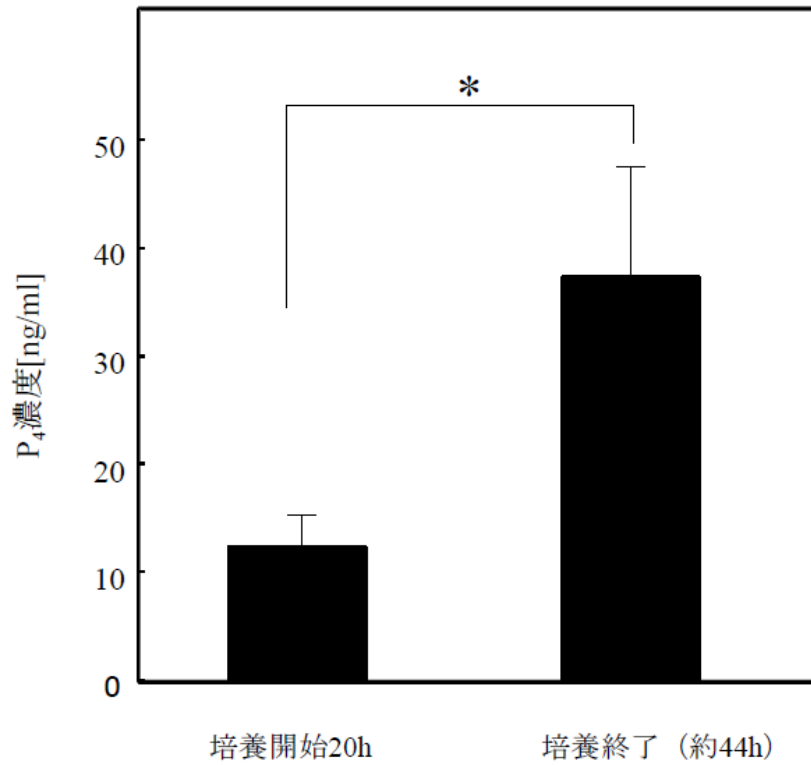


図6. 卵丘細胞が膨潤し、かつMIIであった区の培地中のP₄濃度.

*; 培養時間20hと培養終了時 (約44h) のP₄濃度間に有意差あり ($P < 0.05$).

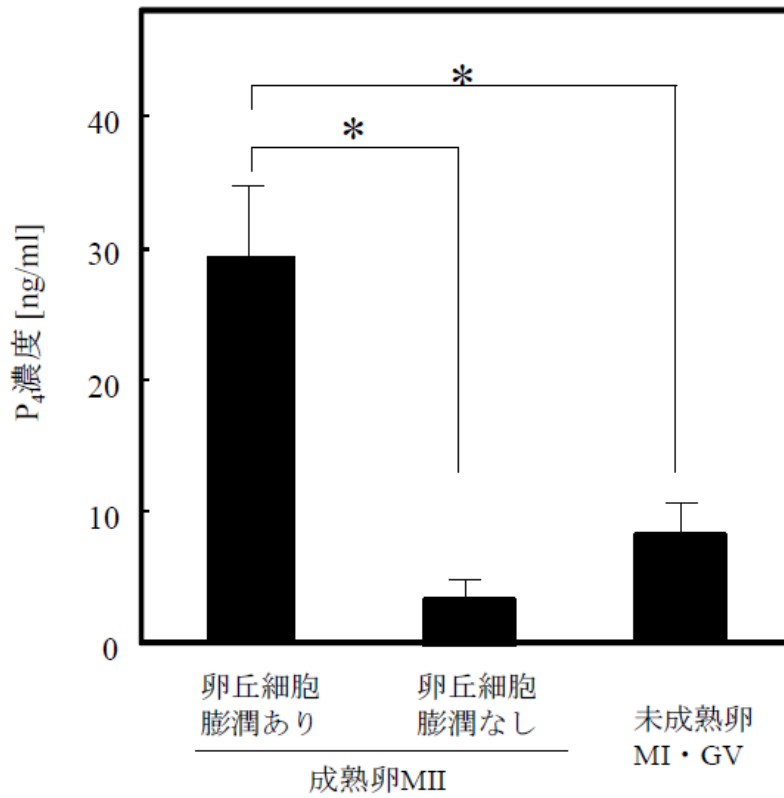
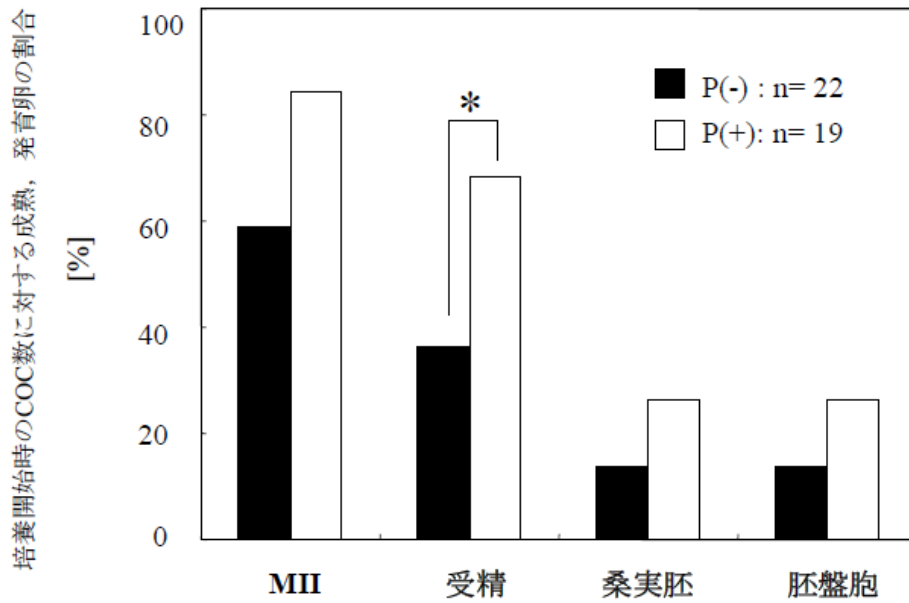


図7. 成熟卵（卵丘細胞膨潤あり，膨潤なし）および未成熟卵における培養終了後のP₄濃度.

*: P₄濃度における卵丘細胞の膨潤の有無，および成熟卵と未成熟卵の間に有意差あり ($P < 0.05$).

1) Poor morphology



2) Good morphology

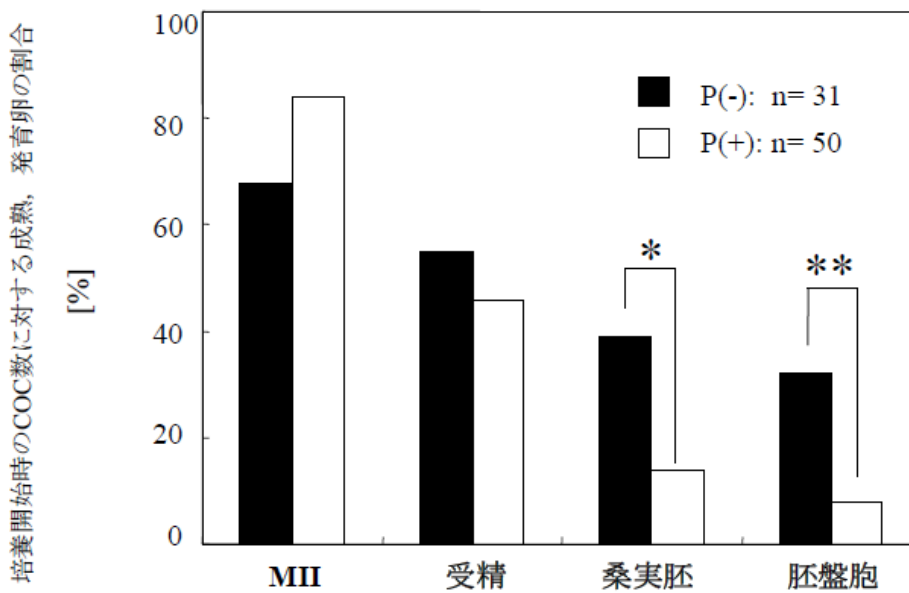


図8. 培地中へのP₄添加あるいは無添加におけるIVM・IVF後のMII率, 受精率および胚発生率.

*; 各項目におけるP₄添加の有無に有意差あり ($P < 0.05$).

**; 各項目におけるP₄添加の有無に有意差あり ($P < 0.01$).

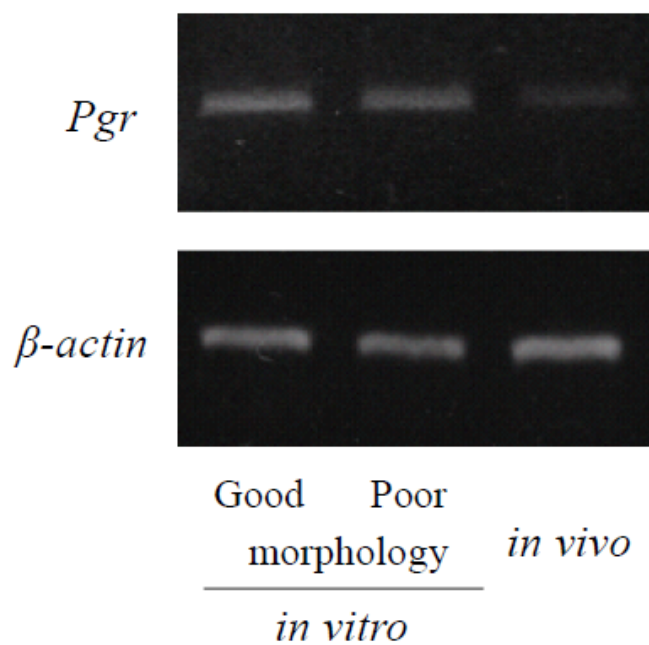


図9. 体内成熟COCと体外成熟COCにおける卵丘細胞のP₄受容体の発現.

第四章 体外成熟培養における培地への添加因子の検討

体内成熟卵の卵胞液成分を解析し、体内での排卵過程を模倣し、卵の発生能を向上させる物質を特定できれば、その物質を体外成熟培地に添加することにより、卵の発生能が向上できると考えられる。そこで、体内成熟卵の採卵時に卵胞液を採取し、IVF後に胚盤胞期胚に到達した発生良好群と、分割期胚で停止した発生不良群とに卵胞液を分類し、メタボローム解析に供試した。その結果、ピーク面積比の発生不良群/発生良好群比が0.3以下であったのは、Tyramine, Phosphocreatine, Hypoxanthine, Phosphorylcholine, Glutathione (GSSG) divalent, UMP, AMP, Cytidine, Inosine, Guanosine, S-Adenosylmethionineであった。この結果より、発生良好群の卵胞においてプリンヌクレオチド代謝物質が高濃度に存在することが明らかになった。プリンヌクレオチドはペントースリン酸経路の最終産物である phosphoribosyl pyrophosphate (PRPP) を骨格として合成される。そこで、卵胞発育・排卵期におけるペントースリン酸経路と *de novo* でのプリンヌクレオチド合成経路に着目し、未成熟マウスを用いて卵胞発育時の代謝酵素の遺伝子発現を検討した。Glucose 6 phosphate dehydrogenase をコードする *G6pdx* の発現量は eCG 非投与と比較し、eCG 投与後 24 時間で有意に上昇し、eCG 投与後 24 時間と比較し、eCG 投与後 48 時間時点において有意に減少していた。また、Glucose 6 phosphate dehydrogenase 活性は eCG 投与後、有意に減少し、mRNA 発現量の経時変化と一致しなかった。このため、体内での卵の発生能獲得に、ペントースリン酸経路によって制御されたプリンヌクレオチド合成経路が関与し、これらの代謝経路のタンパク質発現にはネガティブフィードバック機構が推定された。

発生良好群に高濃度で存在した Hx をヒト卵体外成熟培養系に 4 mM 添加し、成熟率、IVF による受精率、桑実期胚到達率、胚盤胞期胚到達率に及ぼす影響を検討した。その結果、予想に反して、いずれの指標も Hx 添加により有意に低い値を示した。以上から、卵の発生能の獲得過程についてプリンヌクレオチドが関連する事、プリンヌクレオチドの発現量の調整にはペントースリン酸経路の律速酵素である Glucose 6 phosphate dehydrogenase が関与すると考えられた。しかし、ヒト卵の体外成熟培養系への応用には、Hx 添加によりネガティブフィードバックが推察されるため、その添加時期、添加量、添加する因子の詳細な検討が必要であると考えられた。

第五章 総合論議, 第六章 総括

本研究では正常月経周期の女性において、FSH 投与後に未成熟卵を採取し、それを体外成熟することで、体外受精胚移植により、妊娠率は 52.6% と他の報告の妊娠率 (4~25%) よりも高い成績を得ることができた。さらに、未成熟卵を卵丘細胞の付着により形態的に分類することで、形態良好な COC には 200 mIU/ml FSH, 1 IU/ml hCG 添加培地を用いること、形態が不良な COC には上述のホルモン環境に 20 ng/ml P₄ をさらに添加することで良好な成績が得られることも明らかとなった。したがって、本研究により、採卵時の卵丘細胞層数による新規のヒト卵体外成熟培養条件を考案することに成功した。本法が普及することにより、高齢女性の不妊治療成績が向上すると期待される。

略語一覽

BMP15: bone morphogenetic protein 15
CDK1: cyclin dependent protein kinase type I
COC: cumulus oocyte complex
COX-2: cyclooxygenase 2
E₂: estradiol
eCG: equine chorionic gonadotropin
EGF: epidermal growth factor
EGFR: EGF receptor
EP2: prostaglandine receptor
FSH: follicle stimulating hormone
GDF9: growth differentiation factor 9
GnRH: gonadotropin releasing hormone
G6PDH: glucose 6 phosphate dehydrogenase
GV: germinal vesicle
GVBD: germinal vesicle breakdown
hCG: human chorionic gonadotropin
hMG: human menopausal gonadotropin
Hx: hypoxanthine
IVF: *in vitro* fertilization
IVM: *in vitro* maturation
LH: luteinizing hormone
MI: metaphase I
MII: metaphase II
NPPC: natriuretic peptide precursor type C
NPR2: NPPC receptor
P₄: progesterone
PDF3B: phosphodiesterase type III B
PGR: progesterone receptor

PGE2: prostaglandin E2

PKA-CREB: protein kinase A - cAMP responsive element binding protein

PRPP: phosphoribosyl pyrophosphate

PVP: polyvinylpyrrolidone

SSS: serum substitute supplement

謝辞

本研究を遂行し、論文作成にあたり厳しくも熱意あるご指導をいただいた広島大学大学院生物圏科学研究科 准教授 島田 昌之 博士には大変お手数をおかけしました。本研究を通して得た知識や経験は、今後の人生の糧になるものでありました。島田 先生には心よりお詫びと感謝を申し上げます。

本論文をご精読頂き、有益かつ丁寧で分かりやすい論文指導を行って下さった生物圏科学研究科 教授 前田 照夫 博士には深く感謝を申し上げます。

また、本研究を取りまとめるにあたり、ご協力して頂いた生物圏科学研究科 教授 都築 政起 博士，教授 吉村 幸則 博士，准教授 西堀 正英 博士から有意義かつ的確なご意見を頂いたことにより、論文の内容を一層充実させることができました。深く感謝を申し上げます。

大分県農林水産研究センター 研究員 岡崎 哲司 博士，さらに川合 智子 女史，梅原 崇 氏，川島 一公 博士を始めとし，家畜生殖学研究室の皆様には，本研究を行うにあたり，実験の手技指導やご助言を頂き，多大なご協力を頂きましたことを深く感謝を申し上げます。

京都大学 名誉教授 森 崇英 博士には，私がセント・ルカ産婦人科在籍時から，確固たる研究信念に基づき，深い洞察から得られる知見をご指導頂くことで研究に対する姿勢を学ばせて頂きました。森先生のお人柄により学術的な面だけではなく精神面でも成長することができ，心より感謝致しております。

また，私が，セント・ルカ産婦人科退職後も快く共同研究を引き受けて下さり，論文作成にも多大なご指導を頂いただけでなく，あたたかいお心で叱咤激励して下さったセント・ルカ産婦人科 院長 宇津宮 隆史 博士には感謝の念が絶えません。ここに深く感謝の意を表明致します。さらにセント・ルカ産婦人科培養室の大津 英子 博士，長木 美由紀 女史，熊迫 陽子 博士，後藤 香里 女史，城戸 京子 女史，佐藤 晶子 博士，小池 恵 女史を初めとし，セント・ルカ産婦人科スタッフの皆様には，検体収集やミーティングなどの討議にご協力いただき，心より感謝致しております。

最後に，広島大学大学院への進学を快く賛同し，本研究の遂行，論文作成にあたり，精神的に支えてくれた夫，浩一に感謝致します。

引用文献

- Abma JC, Chandra A, Mosher WD, Peterson LS, Piccinino LJ. Fertility, family planning, and women's health new data from the 1995 National Survey of Family Growth. *Vital Health Stat.* 1997; 23: 1-114.
- Adamson D. ICMART (International Committee Monitoring Assisted Reproductive Technologies) world report: preliminary 2008 data. The 28th annual meeting of ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology). Istanbul, Turkey; July 3, 2012.
- Adams J, Franks S, Polson DW, Mason HD, Abdulwahid N, Tucker M, Morris DV, Price J, Jacobs HS. Multifollicular ovaries: clinical and endocrine features and response to pulsatile gonadotropin releasing hormone. *Lancet.* 1985; 2: 1375-1379.
- Ainsworth L, Tsang BK, Downey BR, Marcus GJ, Armstrong DT. Interrelationships between follicular fluid steroid levels, gonadotropic stimuli, and oocyte maturation during preovulatory development of porcine follicles. *Biol Reprod.* 1980; 23: 621-627.
- Araki K, Naito K, Haraguchi S, Suzuki R, Yokoyama M, Inoue M, Aizawa S, Toyoda Y, Sato E. Meiotic abnormalities of c-mos knockout mouse oocytes: activation after first meiosis or entrance into third meiotic metaphase. *Biol Reprod.* 1996; 55: 1315-1324.
- Armstrong DT, Zhang X, Vanderhyden BC, Khamsi F. Hormonal actions during oocyte maturation influence fertilization and early embryonic development. *Ann N Y Acad Sci.* 1991; 626: 137-158.
- Bachvarova R, De Leon V, Johnson A, Kaplan G, Paynton BV. Changes in total RNA, polyadenylated RNA, and actin mRNA during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol.* 1985; 108: 325-331.
- Baker TG. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1963; 158: 417-433.
- Barnes FL, Crombie A, Gardner DK, Kausche A, Lacham-Kaplan O, Suikkari AM, Tiglias J, Wood C, Trounson AO. Blastocyst development and birth after in-vitro maturation of human primary oocytes, intracytoplasmic sperm injection and assisted hatching. *Hum Reprod.* 1995; 10: 3243-3247.
- Block E. Quantitative morphological investigations of the follicular system in women; variations in

- the different phases of the sexual cycle. *Acta Endocrinol.* 1951; 8: 33-54.
- Blossfeld HP, Huinink J. Human-Capital Investments or norms of role transition - How womens schooling and career affect the process of family formation. *Am J Sociol.* 1991; 97: 143-168.
- Biggers JD, Whittingham DG, Donahue RP. The pattern of energy metabolism in the mouse oöcyte and zygote. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1967; 58: 560-567.
- Biljan MM, Buckett WM, Dean N, Phillips SJ, Tan SL. The outcome of IVF-embryo transfer treatment in patients who develop three follicles or less. *Hum Reprod.* 2000; 15: 2140-2144.
- Bijttebier J, Van Soom A, Meyer E, Mateusen B, Maes D. Preovulatory follicular fluid during in vitro maturation decreases polyspermic fertilization of cumulus-intact porcine oocytes in vitro maturation of porcine oocytes. *Theriogenology.* 2008; 70: 715-724.
- Billig H, Furuta I, Hsueh AJ. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology.* 1993; 133: 2204-2212.
- Brandeis M, Rosewell I, Carrington M, Crompton T, Jacobs MA, Kirk J, Gannon J, Hunt T. Cyclin B2-null mice develop normally and are fertile whereas cyclin B1-null mice die in utero. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95: 4344-4349.
- Brevini-Gandolfi TA, Favetta LA, Mauri L, Luciano AM, Cillo F, Gandolfi F. Changes in poly (A) tail length of maternal transcripts during in vitro maturation of bovine oocytes and their relation with developmental competence. *Mol Reprod Dev.* 1999; 52: 427-433.
- Breyer MD, Jacobson HR, Breyer RM. Functional and molecular aspects of renal prostaglandin receptors. *J Am Soc Nephrol.* 1996; 7: 8-17.
- Byskov AG, Andersen CY, Nordholm L, Thøgersen H, Xia G, Wassmann O, Andersen JV, Guddal E, Roed T. Chemical structure of sterols that activate oocyte meiosis. *Nature.* 1995; 374: 559-562.
- Canipari R, Pietrolucci A, Mangia F. Increase of total protein synthesis during mouse oocyte growth. *J Reprod Fertil.* 1979; 57: 405-413.
- Carolina ON, Rui AF, Isa AR, Wellington PM. Ovarian hyperstimulation syndrome: pathophysiology and prevention. *J Assist Reprod Genet.* 2010; 27: 121-128.
- Cha KY, Koo JJ, Ko JJ, Choi DH, Han SY, Yoon TK. Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture in vitro and their

- transfer in a donor oocyte program. *Fertil Steril*. 1991; 55: 109-113.
- Cha KY, Chian, RC. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. *Hum Reprod Update*. 1998; 4: 103-120.
- Child TJ, Abdul-Jalil AK, Gulekli B, Tan SL. In vitro maturation and fertilization of oocytes from unstimulated normal ovaries, polycystic ovaries, and women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2001; 76: 936-942.
- Chang MC. Fertilization and normal development of follicular oocytes in the rabbit. *Science*. 1955; 121: 867-869.
- Chang RJ. The reproductive phenotype in polycystic ovary syndrome. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2007; 3: 688-695.
- Chen L, Russell PT, Larsen WJ. Sequential effects of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone on mouse cumulus expansion in vitro. *Biol Reprod*. 1994; 51: 290-295.
- Chian RC, Buckett WM, Tulandi T, Tan SL. Prospective randomized study of human chorionic gonadotrophin priming before immature oocyte retrieval from unstimulated women with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod*. 2000; 15: 165-170.
- Child TJ, Abdul-Jalil AK, Gulekli B, Tan SL. In vitro maturation and fertilization of oocytes from unstimulated normal ovaries, polycystic ovaries, and women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2001; 76: 936-942.
- Choi YH, Carnevale EM, Seidel GE Jr, Squire EL. Effects of gonadotropins on bovine oocytes matured in TCM-199. *Theriogenology*. 2001; 56: 661-670.
- Chou YH, Bischoff JR, Beach D, Goldman RD. Intermediate filament reorganization during mitosis is mediated by p34cdc2 phosphorylation of vimentin. *Cell*. 1990; 62: 1063-1071.
- Clarke PR, Karsenti E. Regulation of p34cdc2 protein kinase: new insights into protein phosphorylation and the cell cycle. 1991; 100: 409-414.
- Conneely OM, Mulac-Jericevic B, Lydon JP. Progesterone-dependent regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms. *Steroids*. 2003; 68: 771-778.
- Cobo AC, Requena A, Neuspiller F, Aragon s M, Mercader A, Navarro J, Simón C, Remohí J, Pellicer A. Maturation in vitro of human oocytes from unstimulated cycles: selection of the optimal day for ovum retrieval based on follicular size. *Hum Reprod*. 1999; 14: 1864-1868.

- Conti M, Hsieh M, Park JY, Su YQ. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. *Mol Endocrinol.* 2006; 20: 715-723.
- Cran DG, Moor RM, Hay MF. Permeability of ovarian follicles to electron-dense macromolecules. *Acta Endocrinol.* 1976; 82: 631-636.
- Cross PC, Brinster RL. In vitro development of mouse oocytes. *Biol Reprod.* 1970; 3: 298-307.
- Crozet N, Ahmed-Ali M, Dubos MP. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture in vitro. *J Reprod Fertil.* 1995; 103: 293-298.
- Cummins J. Mitochondrial DNA in mammalian reproduction. *Rev Reprod.* 1998; 3: 172-182.
- de Bruin JP, Dorland M, Spek ER, Posthuma G, van Haaften M, Looman CW, te Velde ER. Age-related changes in the ultrastructure of the resting follicle pool in human ovaries. *Biol Reprod.* 2004; 70: 419-424.
- Dekel N, Hillensjö T, Kraicer PF. Maturation effects of gonadotropins on the cumulus-oocyte complex of the rat. *Biol Reprod.* 1979; 20: 191-197.
- Dekel N. Molecular Control of Meiosis *Trends Endocrinol Metab.* 1995; 6: 165-169.
- de Sutter P, Dhont M. Poor response after hormonal stimulation for in vitro fertilization is not related to ovarian aging. *Fertil Steril.* 2003; 79: 1294-1298
- Dessev G, Iovcheva-Dessev C, Bischoff JR, Beach D, Goldman R. A complex containing p34cdc2 and cyclin B phosphorylates the nuclear lamin and disassembles nuclei of clam oocytes in vitro. *J Cell Biol.* 1991; 112: 523-533.
- Downs SM, Coleman DL, Ward-Bailey PF, Eppig JJ. Hypoxanthine is the principal inhibitor of murine oocyte maturation in a low molecular weight fraction of porcine follicular fluid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985; 82: 454-458.
- Downs SM, Daniel SA, Bornslaeger EA, Hoppe PC, Eppig JJ. Maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes by purines: modulation of cAMP levels and cAMP phosphodiesterase activity. *Gamete Res.* 1989; 23: 323-334.
- Downs SM, Utecht AM. Metabolism of radiolabeled glucose by mouse oocytes and oocyte-cumulus cell complexes. *Biol Reprod.* 1999; 60: 1446-1452.
- Donini P, Puzzuoli D, D'Alessio I, Lunenfeld B, Eshkol A, Parlow AF. Purification and separation of follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) from human postmenopausal gonadotrophin (HMG). I. Separation of FSH and LH by electrophoresis,

- chromatography and gel filtration procedures. *Acta Endocrinol.* 1966; 52: 169-185.
- Draijer R, Atsma DE, van der Laarse A, van Hinsbergh VW. cGMP and nitric oxide modulate thrombin-induced endothelial permeability. Regulation via different pathways in human aortic and umbilical vein endothelial cells. *Circ Res.* 1995; 76: 199-208.
- Durinzi KL, Saniga EM, Lanzendorf SE. The relationship between size and maturation in vitro in the unstimulated human oocyte. *Fertil Steril.* 1995; 63: 404-406.
- Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P, Mark M. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development.* 2000; 127: 4277-4291.
- Duszczyńska A.M, Rapała Ł, Trzeciak P, Dąbrowski S, Piliszek A. Obtaining farm animal embryos in vitro. *J Anim Sci food.* 2012; 21: 217-233.
- Edwards RG. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature.* 1965; 208: 349-351.
- Edwards RG. IVF, IVM, natural cycle IVF, minimal stimulation IVF - time for a rethink. *Reprod Biomed Online.* 2007; 15: 106-119.
- Edwards RG, Bavister BD, Steptoe PC. Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro. *Nature.* 1969; 221: 632-635.
- Eppig JJ, Ward-Bailey PF, Coleman DL. Hypoxanthine and adenosine in murine ovarian follicular fluid: concentrations and activity in maintaining oocyte meiotic arrest. *Biol Reprod.* 1985; 33: 1041-1049.
- Erickson GF, Hsueh AJ. Stimulation of aromatase activity by follicle stimulating hormone in rat granulosa cells in vivo and in vitro. *Endocrinology.* 1978; 102: 1275-1282.
- Erickson GF, Hsueh AJ, Quigley ME, Rebar RW, Yen SS. Functional studies of aromatase activity in human granulosa cells from normal and polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab.* 1979; 49: 514-519.
- Erickson GF, Magoffin DA, Garzo VG, Cheung AP, Chang RJ. Granulosa cells of polycystic ovaries: are they normal or abnormal? *Hum Reprod.* 1992; 7: 293-299.
- Fagbohun CF, Downs SM. Requirement for glucose in ligand-stimulated meiotic maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes. *J Reprod Fertil.* 1992; 96: 681-697.
- Fan HY, Liu Z, Shimada M, Sterneck E, Johnson PF, Hedrick SM, Richards JS. MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility. *Science.* 2009; 324: 938-941.

- Fauser BC, Van Heusden AM. Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. *Endocr Rev.* 1997; 18: 71-106.
- Funahashi H, Cantley T, Day BN. Different hormonal requirements of pig oocyte-cumulus complexes during maturation in vitro. *J Reprod Fertil.* 1994; 101: 159-165.
- Funahashi H, Cantley TC, Day BN. Preincubation of cumulus-oocyte complexes before exposure to gonadotropins improves the developmental competence of porcine embryos matured and fertilized in vitro. *Theriogenology.* 1997; 47: 679-686.
- Gardner DK, Lane M, Calderon I, Leeton J. Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertil Steril.* 1996; 65: 349-353.
- Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril.* 2000; 73: 1155-1158.
- Gera PS, Tatpati LL, Allemand MC, Wentworth MA, Coddington CC. Ovarian hyperstimulation syndrome: steps to maximize success and minimize effect for assisted reproductive outcome. *Fertil Steril.* 2010; 94: 173-178.
- Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update.* 2008; 14: 159-177.
- Goldschmit D, Kraicer P, Orly J. Periovalvular expression of cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 in cumulus cells. *Endocrinology.* 1989; 124: 369-378.
- Goodhand KL, Watt RG, Staines ME, Hutchinson JS, Broadbent PJ. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. *Theriogenology.* 1999; 51: 951-961.
- González-Fernández R, Peña Ó, Hernández J, Martín-Vasallo P, Palumbo A, Ávila J. Patients with endometriosis and patients with poor ovarian reserve have abnormal follicle-stimulating hormone receptor signaling pathways. *Fertil Steril.* 2011; 95: 2373-2378.
- Grazul-Bilska AT, Reynolds LP, Redmer DA. Gap junctions in the ovaries. *Biol Reprod.* 1997; 57: 947-957.
- Guixue Z, Luciano AM, Coenen K, Gandolfi F, Sirard MA. The influence of cAMP before or during bovine oocyte maturation on embryonic developmental competence. *Theriogenology.* 2001; 55: 1733-1743.

- Hasegawa J, Yanaihara A, Iwasaki S, Otsuka Y, Negishi M, Akahane T, Okai T. Reduction of progesterone receptor expression in human cumulus cells at the time of oocyte collection during IVF is associated with good embryo quality. *Hum Reprod.* 2005; 20: 2194-2200.
- Hendriks DJ, te Velde ER, Looman CW, Bancsi LF, Broekmans FJ. Expected poor ovarian response in predicting cumulative pregnancy rates: a powerful tool. *Reprod Biomed Online.* 2008; 17: 727-736.
- Hirshfield AN. Theca cells may be present at the outset of follicular growth. *Biol Reprod.* 1991; 44: 1157-1162.
- Hilliier SG. Paracrine control of follicular estrogen synthesis. *Seminars reprod endocrinol.* 1991; 9: 332.
- Hizaki H, Segi E, Sugimoto Y, Hirose M, Saji T, Ushikubi F, Matsuoka T, Noda Y, Tanaka T, Yoshida N, Narumiya S, Ichikawa A. Abortive expansion of the cumulus and impaired fertility in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP(2). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96: 10501-10506.
- Hodgen G. The dominant ovarian follicle. *Fertile Steril.* 1982; 38: 281-300.
- Hovatta O, Cooke I. Cost-effective approaches to in vitro fertilization: means to improve access. *Int J Gynaecol Obstet.* 2006; 94: 287-291.
- Hsieh M, Lee D, Panigone S, Horner K, Chen R, Theologis A, Lee DC, Threadgill DW, Conti M. Luteinizing hormone-dependent activation of the epidermal growth factor network is essential for ovulation. *Mol Cell Biol.* 2007; 27: 1914-1924.
- Hsueh AJ. Pre-ovulatory LH/hCG surge decreases C-type natriuretic peptide secretion by ovarian granulosa cells to promote meiotic resumption of pre-ovulatory oocytes. *Hum Reprod.* 2011; 26: 3094-3101.
- Inge GB, Brinsden PR, Elder KT. Oocyte number per live birth in IVF: were Steptoe and Edwards less wasteful? *Hum Reprod.* 2005; 20: 588-592.
- Japan society of obstetrics and gynecology. The Japan society of obstetrics and gynecology for assisted reproductive technology registry 2010. *Acta Obstet Gynaec Jpn.* 2012; 64: 2110-2140.
- Jakimiuk AJ, Weitsman SR, Navab A, Magoffin DA. Luteinizing hormone receptor, steroidogenesis acute regulatory protein, and steroidogenic enzyme messenger ribonucleic acids are overexpressed in thecal and granulosa cells from polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol*

- Metab. 2001; 86: 1318-1323.
- Jensen EV. On the mechanism of estrogen action. *Perspect Biol Med.* 1962; 6: 47-59.
- Jeppesen JV, Kristensen SG, Nielsen ME, Humaidan P, Dal Canto M, Fadini R, Schmidt KT, Ernst E, Yding Andersen C. LH-receptor gene expression in human granulosa and cumulus cells from antral and preovulatory follicles. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012; 97: E1524-E1531.
- Jones HW Jr. The use of controlled ovarian hyperstimulation (COH) in clinical in vitro fertilization: the role of Georgeanna Seegar Jones. *Fertil Steril.* 2008; 90: e1-e3.
- Jones HW Jr, Acosta AA, Andrews MC, Garcia JE, Jones GS, Mayer J, McDowell JS, Rosenwaks Z, Sandow BA, Veeck LL. Three years of in vitro fertilization at Norfolk. *Fertil Steril.* 1984; 42: 826-834.
- Joyce IM, Pendola FL, O'Brien M, Eppig JJ. Regulation of prostaglandin-endoperoxide synthase 2 messenger ribonucleic acid expression in mouse granulosa cells during ovulation. *Endocrinology.* 2001; 142: 3187-3197.
- Kadam AL, Koide SS. Identification of hypoxanthine in bovine follicular fluid. *J Pharm Sci.* 1990; 79: 1077-1082.
- Kawashima I, Okazaki T, Noma N, Nishibori M, Yamashita Y, Shimada M. Sequential exposure of porcine cumulus cells to FSH and/or LH is critical for appropriate expression of steroidogenic and ovulation-related genes that impact oocyte maturation in vivo and in vitro. *Reproduction.* 2008; 136: 9-21.
- Kawamura K, Cheng Y, Kawamura N, Takae S, Okada A, Kawagoe Y, Mulders S, Terada Y, Törnell J, Billig H, Hillensjö T. Regulation of oocyte maturation by changes in ovarian levels of cyclic nucleotides. *Hum Reprod.* 1991; 6: 411-422.
- Kerin JF, Edmonds DK, Warnes GM, Cox LW, Seamark RF, Matthews CD, Young GB, Baird DT. Morphological and functional relations of graafian follicle growth to ovulation in women using ultrasonic, laparoscopic and biochemical measurements. *Br J Obstet Gynaecol.* 1981; 88: 81-90.
- Kessel B, Liu YX, Jia XC, Hsueh AJ. Autocrine role of estrogens in the augmentation of luteinizing hormone receptor formation in cultured rat granulosa cells. *Biol Reprod.* 1985; 32: 1038-1050.
- Kimura Y, Manabe N, Nishihara S, Matsushita H, Tajima C, Wada S, Miyamoto H. Up-regulation of the alpha 2,6-sialyltransferase messenger ribonucleic acid increases glycoconjugates

- containing alpha 2, 6-linked sialic acid residues in granulosa cells during follicular atresia of porcine ovaries. *Biol Reprod.* 1999; 60: 1475-1482.
- Kishida R, Lee ES, Fukui Y. In vitro maturation of porcine oocytes using a defined medium and developmental capacity after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology.* 2004; 62: 1663-1676.
- Kletzien RF, Harris PK, Foellmi LA. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a "housekeeping" enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. *FASEB J.* 1994; 8: 174-181.
- Kobayashi M, Nakano R, Ooshima A. Immunohistochemical localization of pituitary gonadotrophins and gonadal steroids confirms the 'two-cell, two-gonadotrophin' hypothesis of steroidogenesis in the human ovary. *J Endocrinol.* 1990; 12: 483-488.
- Kraus WL, Montano MM, Katzenellenbogen BS. Cloning of the rat progesterone receptor gene 5'-region and identification of two functionally distinct promoters. *Mol Endocrinol.* 1993; 7: 1603-1616.
- Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson JA, Smithies O. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95: 15677-15682.
- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93: 5925-5930.
- Lenz S. Ultrasonic study of follicular maturation, ovulation and development of corpus luteum during normal menstrual cycles. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1985; 64: 15-19.
- Leridon H. Can assisted reproduction technology compensate for the natural decline in fertility with age? A model assessment. *Hum Reprod.* 2004; 19: 1548-1553.
- Liang SG, Taketani Y, Mizuno M. Estradiol stimulates the binding of epidermal growth factor in cultured rat granulosa cells. *Endocrinol Jpn.* 1990; 37: 893-899.
- Lobo RA, Granger L, Goebelsmann U, Mishell DR Jr. Elevations in unbound serum estradiol as a possible mechanism for inappropriate gonadotropin secretion in women with PCO. *J Clin Endocrinol Metab.* 1981; 52: 156-158.
- Lonergan P, Khatir H, Carolan C, Mermillod P. Bovine blastocyst production in vitro after inhibition of oocyte meiotic resumption for 24 h. *J Reprod Fertil.* 1997; 109: 355-365.

- Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90: 11162-11166.
- Macklon S.N, Fauser BC. Regulation of follicle development and novel approaches to ovarian stimulation for IVF. *Hum Reprod Update*. 2000; 6: 307-312.
- Madison V, Birthe A. Greve T. Selection of immature bovine oocytes for developmental potential in vitro. *Anim Reprod Sci*. 1992; 27: 1-11.
- Mangia F, Epstein CJ, Erickson RP, Palombi F, Siracusa G. Metabolism of mammalian oocyte during growth, maturation and activation. In *The endocrine function of the human ovary*. Academic Press. Edinburgh. Scotland; 1976: 63-70.
- Marcus W, Daniela N. In vitro maturation of human oocytes for assisted reproduction. *Fertil Steril*. 2006; 86: 1277-1291.
- Marques MG, Nicacio AC, de Oliveira VP, Nascimento AB, Caetano HV, Mendes CM, Mello MR, Milazzotto MP, Assumpção ME, Visintin JA. In vitro maturation of pig oocytes with different media, hormone and meiosis inhibitors. *Anim Reprod Sci*. 2007; 97: 375-381.
- Mattioli M. Transduction mechanisms for gonadotrophin-induced oocyte maturation in mammals. *Zygote*. 1994; 2: 347-349.
- Mattioli M, Bacci ML, Galeati G, Seren E. Effects of LH and FSH on the maturation of pig oocytes in vitro. *Theriogenology*. 1991; 36: 95-105.
- Mais V, Kazer RR, Cetel NS, Rivier J, Vale W, Yen SS. The dependency of folliculogenesis and corpus luteum function on pulsatile gonadotropin secretion in cycling women using a gonadotropin-releasing hormone antagonist as a probe. *J Clin Endocrinol Metab*. 1986; 62: 1250-1255.
- McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev*. 2000; 21: 200-214.
- McNatty KP, Makris A, De Grazia C, Osathanondh R, Ryan KJ. Steroidogenesis by recombined follicular cells from the human ovary in vitro. *Clin Endocrinol Metab*. 1980; 51: 1286-1292.
- Mikkelsen AL, Smith SD, Lindenberg S. In-vitro maturation of human oocytes from regularly menstruating women may be successful without follicle stimulating hormone priming. *Hum Reprod*. 1999; 14: 1847-1851.

- Mikkelsen AL, Lindenberg S. Benefit of FSH priming of women with PCOS to the in vitro maturation procedure and the outcome: a randomized prospective study. *Reproduction*. 2001; 122: 587-592.
- Minato Y and Toyoda Y. Induction of cumulus expansion and maturation division of porcine oocyte-cumulus complexes in vitro. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 1982; 53: 480-487.
- Ministry of health labor and welfare. The vital statistics of Japan 2010. Ministry of health labor and welfare. Statistics and Information Department. Tokyo. Japan; 2011: 23.
- Moor RM, Dai Y, Lee C, Fulka J Jr. Oocyte maturation and embryonic failure. *Hum Reprod Update*. 1998; 4: 223-236.
- Moor RM, Trounson AO. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent developmental capacity. *J Reprod Fertil*. 1977; 49: 101-109.
- Moore GP, Lintern-Moore S, Peters H, Faber M. RNA synthesis in the mouse oocyte. *J Cell Biol*. 1974; 60: 416-422.
- Morgan JF, Morton HJ, and Parker RC. The nutrition of animal cells in tissue culture. I. Initial studies on a synthetic medium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1950; 73: 1-8.
- Mori T, Suzuki A, Nishimura T, Kambegawa A. Inhibition of ovulation in immature rats by anti-progesterone antiserum. *J Endocrinol*. 1977; 73: 185-186.
- Mori T, Fujita Y, Nihnobu K, Aso T, Sakamoto Y, Nishimura T. Significance of atretic follicles as the site of androgen production in polycystic ovaries. *J Endocrinol Invest*. 1982; 5: 209-215.
- Mukherjee AB. Normal pregnancy from fertilization in vitro of mouse oocyte matured in culture and spermatozoa capacitated in vitro. 1972; 237: 397-398.
- Mulac-Jericevic B, Mullinax RA, DeMayo FJ, Lydon JP, Conneely OM. Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science*. 2000; 289: 1751-1754.
- Okazaki T, Nishibori M, Yamashita Y, Shimada M. LH reduces proliferative activity of cumulus cells and accelerates GVBD of porcine oocytes. *Mol Cell Endocrinol*. 2003; 209: 43-50.
- Ortega-Camarillo C, González-González A, Vergara-Onofre M, González-Padilla E, Avalos-Rodríguez A, Gutiérrez-Rodríguez ME, Arriaga-Pizano L, Cruz M, Baiza-Gutman LA, Díaz-Flores M. Changes in the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in granulosa cells during follicular atresia in ewes. *Reproduction*. 2009; 137: 979-986.

- Orvieto R, Meltzer S, Nahum R, Rabinson J, Anteby EY, Ashkenazi J. The influence of body mass index on in vitro fertilization outcome. *Int J Gynaecol Obstet.* 2009; 104: 53-55.
- Pandolfi PP, Sonati F, Rivi R, Mason P, Grosveld F, Luzzatto L. Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defense against oxidative stress. *EMBO J.* 1995; 14: 5209-52015.
- Park OK, Mayo KE. Transient expression of progesterone receptor messenger RNA in ovarian granulosa cells after the preovulatory luteinizing hormone surge. *Mol Endocrinol.* 1991; 5: 967-978.
- Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SL, Conti M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science.* 2004; 303: 682-684.
- Pasikanti KK, Ho PC, Chan EC. Gas chromatography/mass spectrometry in metabolic profiling of biological fluids. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2008; 871: 202-211.
- Pavlok A, Lucas-Hahn A, Niemann H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol Reprod.* 1992; 31: 63-67.
- Pellicer A, Mari M, de los Santos MJ, Simón C, Remohí J, Tarín JJ. Effects of aging on the human ovary: the secretion of immunoreactive alpha-inhibin and progesterone. *Fertil Steril.* 1994; 61: 663-668.
- Peng XR, Hsueh AJ, LaPolt PS, Bjersing L, Ny T. Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. *Endocrinology.* 1991; 129: 3200-3207.
- Peters H, Byskov A. G, Grinsted J. Follicular growth in fetal and prepubertal ovaries of humans and other primates. *Clinics in Endocrinology and Metabolism.* 1978; 7: 469- 485.
- Petters RM, Wells KD. Culture of pig embryos. *Reprod Fertil Suppl.* 1993; 8: 1-73.
- Phy J, Stocco DM, Prien SD. Differences in steroidogenic acute regulatory protein expression from the luteinizing-granulosa cells of patients undergoing in vitro fertilization with embryo transfer: implications for cycle outcomes. *Am J Obstet Gynecol.* 2002; 186: 872–875.
- Pincus G, Enzmann EV. The cooperative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro: I. The activation of ovarian eggs. *J Exp Med.* 1935; 62: 665-675.
- Porter RN, Smith W, Craft IL, Abdulwahid NA, Jacobs HS. Induction of ovulation for in-vitro fertilisation using buserelin and gonadotropins. *Lancet.* 1984; 2: 1284-1285.

- Quinn P, Warnes GM, Kerin JF, Kirby C. Culture factors affecting the success rate of in vitro fertilization and embryo transfer. *Ann N Y Acad Sci.* 1985a; 442: 195-204.
- Quinn P, Kerin JF, Warnes GM. Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril.* 1985b; 44: 493-498.
- Racowsky C. 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 Fertil.* 1985; 74: 9-21.
- Renaud RL, Macler J, Dervain I, Ehret MC, Aron C, Plas-Roser S, Spira A, Pollack H. Echographic study of follicular maturation and ovulation during the normal menstrual cycle. *Fertil Steril.* 1980; 33: 272-276.
- Revelli A, Delle Piane L, Casano S, Molinari E, Massobrio M, Rinaudo P. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009; 40: 1-13.
- Richards JS. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev.* 1994; 15: 725-751.
- Richards JS. New signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate action in endocrine cells. *Mol Endocrinol.* 2001; 15: 209-218.
- Richards JS, Ireland JJ, Rao MC, Bernath GA, Midgley AR Jr, Reichert LE Jr. Ovarian follicular development in the rat: hormone receptor regulation by estradiol, follicle stimulating hormone and luteinizing hormone. *Endocrinology.* 1976; 99: 1562-1570.
- Richards JS, Russell DL, Robker RL, Dajee M, Alliston TN. Molecular mechanisms of ovulation and luteinization. *Mol Cell Endocrinol.* 1998; 145: 47-54.
- Robker RL, Richards JS. Hormone-induced proliferation and differentiation of granulosa cells: a coordinated balance of the cell cycle regulators cyclin D2 and p27Kip1. *Mol Endocrinol.* 1998; 12: 924-940.
- Roest J, van Heusden AM, Mous H, Zeilmaker GH, Verhoeff A. The ovarian response as a predictor for successful in vitro fertilization treatment after the age of 40 years. *Fertil Steril.* 1996; 66: 969-973.
- Russell JB, Knezevich KM, Fabian KF, Dickson JA. Unstimulated immature oocyte retrieval: early versus midfollicular endometrial priming. *Fertil Steril.* 1997; 67: 616-620.
- Saito H. ART registry system and present statue of ART in Japan. *Acta Obstet Gynaec Jpn.* 2010; 62:

739 -745.

- Saldeen P, Kallen K, Sundstrom P. The probability of successful IVF outcome after poor ovarian response. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2007; 86: 457-461.
- Sauer MV. The impact of age on reproductive potential: lessons learned from oocyte donation. *Maturitas.* 1998; 30: 221-225.
- Seifer DB, Gardiner AC, Ferreira KA, Peluso JJ. Apoptosis as a function of ovarian reserve in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1996; 66: 593-598.
- Seifer DB, DeJesus V, Hubbard K. Mitochondrial deletions in luteinized granulosa cells as a function of age in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2002; 78: 1046-1048.
- Schipper I, Hop WC, Fauser BC. The follicle-stimulating hormone (FSH) threshold/window concept examined by different interventions with exogenous FSH during the follicular phase of the normal menstrual cycle: duration, rather than magnitude, of FSH increase affects follicle development. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83: 1292-1298.
- Schroeder AC, Eppig JJ. The developmental capacity of mouse oocytes that matured spontaneously in vitro is normal. *Dev Biol.* 1984; 102: 493-497.
- Schroeder AC, Eppig JJ. Developmental capacity of mouse oocytes that undergo maturation in vitro: effect of the hormonal state of the oocyte donor. *Gamete Res.* 1989; 24: 81-92.
- Schultz RM, Wassarman PM. Biochemical studies of mammalian oogenesis: Protein synthesis during oocyte growth and meiotic maturation in the mouse. *J Cell Sci.* 1977; 24: 167-194.
- Schwartz D, Mayaux MJ. Female fecundity as a function of age. *Federation CECOS. N Engl J Med.* 1982; 306: 404-406.
- Shalgi R, Kraicer P, Rimon A, Pinto M, Soferman N. Proteins of human follicular fluid: the blood-follicle barrier. *Fertil Steril.* 1973; 24: 429-434.
- Shioya Y, Kuwayama M, Fukushima M, Iwasaki S, Hanada A. In vitro fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured in vitro. *Theriogenology.* 1988; 30: 489-496.
- Shimada M, Terada T. FSH and LH induce progesterone production and progesterone receptor synthesis in cumulus cells: a requirement for meiotic resumption in porcine oocytes. *Mol Hum Reprod.* 2002; 8: 612-618.
- Shimada M, Nishibori M, Isobe N, Kawano N, Terada T. Luteinizing hormone receptor formation in

- cumulus cells surrounding porcine oocytes and its role during meiotic maturation of porcine oocytes. *Biol Reprod.* 2003; 68: 1142-1149.
- Shimada M, Nishibori M, Yamashita Y, Ito J, Mori T, Richards JS. Down-regulated expression of a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin-like repeats-1 by progesterone receptor antagonist is associated with impaired expansion of porcine cumulus-oocyte complexes. *Endocrinology.* 2004a; 145: 4603-4614.
- Shimada M, Yamashita Y, Ito J, Okazaki T, Kawahata K, Nishibori M. Expression of two progesterone receptor isoforms in cumulus cells and their roles during meiotic resumption of porcine oocytes. *J Mol Endocrinol.* 2004b; 33: 209-225.
- Shimada M, Nishibori M, Yamashita Y. Effects of adding luteinizing hormone to a medium containing follicle stimulating hormone on progesterone-induced differentiation of cumulus cells during meiotic resumption of porcine oocytes. *Animal Sci.* 2004c; 75: 515-523.
- Shimada M, Hernandez-Gonzalez I, Gonzalez-Robayna I, Richards JS. Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor. *Mol Endocrinol.* 2006; 20: 1352-1365.
- Shterev AD, Dokumov SI. Serum LH and FSH levels in women with polycystic ovary syndrome before and after ovarian wedge resection. *Endocrinology.* 1982; 20: 203-207.
- Simpson ER, Boyd GS. The cholesterol side-chain cleavage system of bovine adrenal cortex. *Eur J Biochem.* 1967; 2: 275-285.
- Sirard MA, Desrosier S, Assidi M. In vivo and in vitro effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. *Theriogenology.* 2007; 68 Suppl 1:S71-S76.
- Sirois J, Richards JS. Purification and characterization of a novel, distinct isoform of prostaglandin endoperoxide synthase induced by human chorionic gonadotropin in granulosa cells of rat preovulatory follicles. *J Biol Chem.* 1992; 267: 6382-6388.
- Söderström-Anttila V, Mäkinen S, Tuuri T, Suikkari AM. Favourable pregnancy results with insemination of in vitro matured oocytes from unstimulated patients. *Hum Reprod.* 2005; 20: 1534-1540.
- Sorensen RA, Wassarman PM. Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev Biol.* 1976; 50: 531-536.

- Stephens PC, Edwards RG. Laparoscopic recovery of preovulatory human oocytes after priming of ovaries with gonadotrophins. *Lancet*. 1970; 1: 683-689.
- Stephens PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*. 1978; 12: 366.
- Sternlicht AL, Schultz RM. Biochemical studies of mammalian oogenesis: kinetics of accumulation of total and poly(A)-containing RNA during growth of the mouse oocyte. *J Exp Zool*. 1981; 215: 191-200.
- Strauss 3rd JF, Miller WL. Molecular basis of ovarian steroid synthesis. In: Hillier SG, ed. *Ovarian endocrinology*. Blackwell Scientific Publications. Oxford. UK; 1991: 25-72.
- Sugiura K, Pendola FL, Eppig JJ. Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism. *Dev Biol*. 2005; 279: 20-30.
- Suikkari AM. In-vitro maturation: its role in fertility treatment. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2008; 20: 242-248.
- Suikkari AM, Tulppala M, Tuuri T, Hovatta O, Barnes F. Luteal phase start of low-dose FSH priming of follicles results in an efficient recovery, maturation and fertilization of immature human oocytes. *Hum Reprod*. 2000; 15: 747-751.
- Su YQ, Nyegaard M, Overgaard MT, Qiao J, Giudice LC. Participation of mitogen-activated protein kinase in luteinizing hormone-induced differential regulation of steroidogenesis and steroidogenic gene expression in mural and cumulus granulosa cells of mouse preovulatory follicles. *Biol Reprod*. 2006; 75: 859-867.
- Su YQ, Sugiura K, Wigglesworth K, O'Brien MJ, Affourtit JP, Pangas SA, Matzuk MM, Eppig JJ. Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development*. 2008; 135: 111-121.
- Takao Y, Honda T, Ueda M, Hattori N, Yamada S, Maeda M, Fujiwara H, Mori T, Wimalasena J. Immunohistochemical localization of the LH/HCG receptor in human ovary: HCG enhances cell surface expression of LH/HCG receptor on luteinizing granulosa cells in vitro. *Mol Hum Reprod*. 1997; 3: 569-578.
- Takahashi T, Morrow JD, Wang H, Dey SK. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E(2) directs oocyte maturation by differentially influencing multiple signaling pathways. *J Biol Chem*. 2006; 281: 37117-37129.
- Tan SJ, Lu KH. Effects of different oestrous stages of ovaries and sizes of follicles on generation of

- bovine embryos in vitro. *Theriogenology*. 1990; 33: 335.
- Tan SL, Royston P, Campbell S, Jacobs HS, Betts J, Mason B, Edwards RG. Cumulative conception and livebirth rates after in-vitro fertilisation. *Lancet*. 1992; 339: 1390-1394.
- Tatone C, Carbone MC, Falone S, Aimola P, Giardinelli A, Caserta D, Marci R, Pandolfi A, Ragnelli AM, Amicarelli F. Age-dependent changes in the expression of superoxide dismutases and catalase are associated with ultrastructural modifications in human granulosa cells. *Mol Hum Reprod*. 2006; 12: 655-660.
- Teissier MP, Chable H, Paulhac S, Aubard Y. Recombinant human follicle stimulating hormone versus human menopausal gonadotrophin induction: effects in mature follicle endocrinology. *Hum Reprod*. 1999; 14: 2236-2241.
- Teissier MP, Chable H, Paulhac S, Aubard Y. Comparison of follicle steroidogenesis from normal and polycystic ovaries in women undergoing IVF: relationship between steroid concentrations, follicle size, oocyte quality and fecundability. *Hum Reprod*. 2000; 15: 2471-2477.
- Templeton A, Morris JK, Parslow W. Factors that affect outcome of in-vitro fertilisation treatment. *Lancet*. 1996; 348: 1402-1406.
- te Velde ER, Pearson PL. The variability of female reproductive ageing. *Hum Reprod Update*. 2002; 8: 141-154.
- Tian WN, Braunstein LD, Apse K, Pang J, Rose M, Tian X, Stanton RC. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cell death. *Am J Physiol*. 1999; 276: C1121-C1131.
- Timeva T, Milachich T, Antonova I, Arabaji T, Shterev A, Omar HA. Correlation between number of retrieved oocytes and pregnancy rate after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. *Sci. World J*. 2006; 6: 686-690.
- Trounson A, Wood C, Kausche A. In vitro maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. *Fertil Steril*. 1994; 62: 353-362.
- Trounson A, Anderiesz C, Jones GM, Kausche A, Lolatgis N, Wood C. Oocyte maturation. *Hum Reprod*. 1998; Suppl 3: 52-62.
- Trounson A, Anderiesz C, Jones G. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reproduction*. 2001; 121: 51-75.

- Tsuji K, Sowa M, Nakano R. Relationship between human oocyte maturation and different follicular sizes. *Biol Reprod.* 1985; 32: 413-417.
- van de Leemput EE, Vos PL, Zeinstra EC, Bevers MM, van der Weijden GC, Dieleman SJ. Improved in vitro embryo development using in vivo matured oocytes from heifers superovulated with a controlled preovulatory LH surge. *Theriogenology.* 1999; 52: 335-349.
- Van Noord-Zaadstra BM, Looman CW, Alsbach H, Habbema JD, te Velde ER, Karbaat J. Delaying childbearing: effect of age on fecundity and outcome of pregnancy. *BMJ.* 1991; 302: 1361-1365.
- Van Tol HT, van Eijk MJ, Mummery CL, van den Hurk R, Bevers MM. Influence of FSH and hCG on the resumption of meiosis of bovine oocytes surrounded by cumulus cells connected to membrana granulosa. *Mol Reprod.* 1996; 45: 218-224.
- Veleva Z, Jarvela IY, Nuojuua-Huttunen S, Martikainen H, Tapanainen JS. An initial low response predicts poor outcome in in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection despite improved ovarian response in consecutive cycles. *Fertil Steril.* 2005; 83: 1384-1390.
- Veck LL. Atlas of the human oocyte and early conceptus. vol. 2. Williams and Wilkins. Baltimore. USA; 1986: 121.
- Wassarman PM, Albertini DF. The mammalian ovum. The physiology of reproduction. vol. 1. Raven Press. New York. USA; 1994: 79-122.
- Westergaard L, Christensen IJ, McNatty KP. Steroid levels in ovarian follicular fluid related to follicle size and health status during the normal menstrual cycle in women. *Hum Reprod.* 1986; 1: 227-232.
- Willis DS, Watson H, Mason HD, Galea R, Brincat M, Franks S. Premature response to luteinizing hormone of granulosa cells from anovulatory women with polycystic ovary syndrome: relevance to mechanism of anovulation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83: 3984-3991.
- Wood, T. The Pentose Phosphate Pathway, Academic Press. Orlando. USA; 1985:147.
- Wong WY, Richards JS. Induction of prostaglandin H synthase in rat preovulatory follicles by gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology.* 1992; 130: 3512-3521.
- Wynn P, Picton HM, Krapez JA, Rutherford AJ, Balen AH, Gosden RG. Pretreatment with follicle stimulating hormone promotes the numbers of human oocytes reaching metaphase II by in-vitro maturation. *Hum Reprod.* 1998; 13: 3132-3138.

- Yamashita Y, Okamoto M, Kawashima I, Okazaki T, Nishimura R, Gunji Y, Hishinuma M, Shimada M. Positive feedback loop between prostaglandin E2 and EGF-like factors is essential for sustainable activation of MAPK3/1 in cumulus cells during in vitro maturation of porcine cumulus oocyte complexes. *Biol Reprod.* 2011; 85: 1073-1082.
- Yamashita Y, Shimada M, Okazaki T, Maeda T, Terada T. Production of progesterone from de novo-synthesized cholesterol in cumulus cells and its physiological role during meiotic resumption of porcine oocytes. *Biol Reprod.* 2003; 68:1193-1198.
- Yamauchi N, Nagai T. Male pronuclear formation in denuded porcine oocytes after in vitro maturation in the presence of cysteamine. *Biol Reprod.* 1999; 61: 828-833.
- Yazawa T, Kawabe S, Kanno M, Mizutani T, Imamichi Y, Ju Y, Matsumura T, Yamazaki Y, Usami Y, Kuribayashi M, Shimada M, Kitano T, Umezawa A, Miyamoto K. Androgen/androgen receptor pathway regulates expression of the genes for cyclooxygenase-2 and amphiregulin in periovulatory granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2013; 369: 42-51.
- Yokota Y, Sato S, Yokota M, Ishikawa Y, Makita M, Asada T, Araki Y. Successful pregnancy following blastocyst vitrification: case report. *Hum Reprod.* 2000; 15: 1802-1803.
- Yoshida M, Bamba K, and Kojima Y. 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.* 1989; 35: 86-91.
- Yuan K, Kong H, Guan Y, Yang J, Xu G. A GC-based metabonomics investigation of type 2 diabetes by organic acids metabolic profile. *Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007; 50: 236-40.
- Zacchariae F. Permeability of the blood liquor barrier. *Acta Endocrinol.* 1958; 27: 339.
- Zeleznik AJ, Midgley AR Jr, Reichert LE Jr. Granulosa cell maturation in the rat: increased binding of human chorionic gonadotropin following treatment with follicle-stimulating hormone in vivo. *Endocrinology.* 1974; 95: 818-825.
- Zhang M, Su YQ, Sugiura K, Xia G, Eppig JJ. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. *Science.* 2010; 330: 366-369.
- Zhen XM, Qiao J, Li R, Wang LN, Liu P. The clinical analysis of poor ovarian response in in-vitro-fertilization embryo-transfer among Chinese couples. *J Assist Reprod Genet.* 2008; 25: 17-22.
- Zoller LC, Weisz J. A quantitative cytochemical study of glucose-6-phosphate dehydrogenase and

delta 5-3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in the membrana granulosa of the ovulable type of follicle of the rat. *Histochemistry*. 1979; 62: 125-135.