

ネコ卵母細胞の体外発育能に及ぼす卵巣保存
温度と発情周期の影響に関する研究

直井 秀明
2010年

目次

要旨	1
第1章 緒論	4
第2章 研究1: 異なる温度で保存した卵巣由来ネコ卵母細胞の発育能	
緒言	7
材料および方法	8
結果	12
考察	13
第3章 研究2: ネコ卵母細胞の形態的品質並びに体外受精・体細胞核移植後の 発育能に与える発情周期の影響	
緒言	16
材料および方法	17
結果	21
考察	23
第4章 総括	26
図表	33
謝辞	40
参考文献	41

要旨

現在、ネコ科動物は 36 の野生種が確認されているが、絶滅危惧種あるいは危急種としてその多くが分類されている。科学技術のみでは「絶滅危惧種の保護」は決して達成されないであろうが、「保護を促進する手段」としては、大いに可能性がある。これらに関する研究では、絶滅危惧種ネコ科動物のモデルとしてイエネコが用いられている。イエネコの補助生殖技術(ART)は野生ネコ科動物の保護に大きな影響を与える可能性があるため、イエネコの ART は、ここ 10 年程で研究され発展してきた。本研究では、野生ネコ科動物の保護に寄与するため、イエネコの卵巣の短期保存並びに体外受精およびクローンネコ作出のためのドナーとなる卵母細胞の発情周期に関する研究を行った。

研究 1 では、ネコ卵巣由来卵母細胞の成熟能および発生能に保存温度および保存期間が与える影響を調査するため、2 つの試験を行った。試験 1 では、卵巣を 4℃、23-25℃、および 38℃のグループに分け 24 時間生理食塩水中に保存し、その後卵巣から卵母細胞をグループごとに回収した。次に、形態的に正常な卵母細胞を選び、24 時間成熟培養した。卵母細胞が MII に達した割合は、室温および 38℃のグループ(それぞれ 20.0%と 2.4%)に比較して、低温保存 (4℃) グループ(53.4%)が有意に高かった。試験 2 では、生理食塩水に入れた卵巣を室温でそれぞれ 0、6、12、18 時間保存し、その後保存時間の合計が 24 時間となるよう、それらを 4℃(低温保存)で保存した。保存後、形態的に正常な卵母細胞を成熟培養し、凍結融解精子により受精後、体外培養した。室温でそれぞれ 0、6、12、18 時間保存した卵巣由来卵母細胞が形態的に正常な割合は、それぞれ 35.3%、30.0%、

26.4%および 14.7%であり、成熟培養後 MII に達した卵母細胞の割合は、それぞれ 63.2%、36.4%、26.5%および 11.9%であった。この試験結果より、低温保存前の室温保存時間が増加するにつれて、形態的に正常な卵母細胞数や、成熟培養後 MII に達する卵母細胞は減少する事がわかった。また、低温保存前に室温で 6 時間保存した卵巢由来卵母細胞だけが、体外成熟および体外受精後に胚盤胞期胚に発育した。これらの結果より、24 時間の室温以上(>23°C)における卵巢保存が卵母細胞の成熟能を低下させる事が示唆された。さらに、卵母細胞の品質と発育能は、低温保存前の室温保存時間の長さに影響することが明らかとなった。

研究 2 では、体外受精胚およびクローン胚作製に用いる卵母細胞を供給するドナーネコの発情周期が、卵母細胞の回収時の品質と体外受精(IVF)および体細胞核移植(SCNT)後の発生能に与える影響を調査した。卵胞と黄体の有無により、卵巢を発情休止期、卵胞期または黄体期に分類した。卵母細胞の回収後に、卵母細胞の細胞質および卵丘細胞の形態的状态により、卵母細胞を 4 つのグレードに分類した。198 頭のネコ卵巢より、合計 16,558 個の卵母細胞を得た。休止期卵巢からの卵母細胞の総数および高品質(グレード I)の卵母細胞数(それぞれ 111.1 個と 19.0 個)は、卵胞期 (67.1 個と 11.4 個の卵母細胞)に比較して有意に高かった。さらに、グレード I の割合において、卵胞期と黄体期間(14.9% : 20.2%、 $P < 0.05$)に有意な差が認められた。IVF 後の分割率および胚盤胞発生率は、卵巢の発情周期に関係なく卵母細胞回収時の品質が低下するに従い有意に低下した。さらに、発情周期間に、IVF および SCNT 胚の分割率や胚盤胞発生率に有意な差は認められなかった。これらの結果より、ドナーネコ卵巢の発情周期は、

IVF および SCNT 後の体外発育に有意な影響は与えないが、回収時卵母細胞の品質が IVF 胚の発育に影響することが判明した。

これらのことより、卵巣保存時間および温度が与える卵母細胞の品質と発育能の影響、並びに、ドナーネコ卵巣の発情周期が卵母細胞の品質および発育能へ与える影響が明らかとなった。このことはイエネコの ART および野生ネコ科動物の保護に有用な情報を提供するものと考えられた。

第 1 章

緒論

ネコ科動物は、約9,000年間にわたり人間と共存してきた。しかしながら現在、野性ネコ科動物のほとんどの種が絶滅の危機に瀕している。現在のところ36種のネコ科野生動物が確認されているが、それらの多くが絶滅危惧種あるいは危急種として2003IUCN(国際自然保護連合)レッドリストに上っている。例えば、最も小型のヤマネコの1種であるアフリカワイルドキャット (*Felis silvestris libica*) は、イエネコ(*Felis silvestris catus*) との交雑に脅かされている。これらの種の絶滅を防ぐ最も望ましい方法は、それらの生息地の保存であるが、現実的には、難しい目標でもある(29)。一方で、受精卵移植(ET) や凍結保存、さらに体外受精を用いるネコ補助生殖技術

(ART) は、この10年間で急速に発展している(9)。これら研究の大部分では、イエネコが絶滅の危機に瀕したネコ科動物の身近な研究モデル種として機能している。科学技術のみでは「絶滅危惧種の保護」は決して達成されないであろうが、バイオテクノロジーによってその保護プログラムが促進できる可能性は大いにある(15)。近年、イエネコおよび野生ネコ両方のネコ科動物における体外受精技術に関する研究が発展し、絶滅危機にさらされたネコ科の保護に役立つ可能性が示されている(39)。例えば、体外受精は少なくともヤマネコ種の1/3に成功しており、また、インディアンデザートキャット (*Felis silvestris ornata*)胚のイエネコへの移植、およびトラ (*Panthera tigris*)の同種移植によって産子が得られている(39)。

近年、イエネコの体外成熟(IVM)、体外受精 (IVF)、体外培養(IVC)技術の発展により、ネコ卵母細胞を一時的に 4°Cで保存した

後に体外成熟できることがわかった(51)。4°Cで72時間まで保存された卵巣内ネコ卵母細胞が体外成熟能を持ち続けていることが示されており、24時間4°Cで保存した卵巣由来の卵母細胞をIVM、IVF、IVCすることで産子が得られている(14,51)。このことは一時的な4°Cでの卵巣保存技術により、絶滅危惧種のネコ科動物が野外で急死した場合に卵巣を取り摘出することで、卵母細胞を利用できる機会を創出できることを示唆している。しかし、野外で生活する絶滅危機に瀕するネコ科動物の死後、すぐに卵巣を回収し、4°Cに保存する事は現実的には困難である。死後や摘出後に卵巣を保存する時間と温度によって、卵巣から回収した卵母細胞は影響を受けていると思われるが、低温保存前に様々な期間、4°Cより高い温度で保存した卵巣由来卵母細胞の回収に関する報告はほとんどない。そこで、研究1では、卵母細胞の成熟能へのネコ卵巣の保存温度の影響を調べ、低温保存前に室温で様々な時間保存した卵巣由来卵母細胞の成熟能と発育能を検討した。

過去20年間で、「冷凍動物園」と呼ばれる「ゲノムリソース銀行」の概念は強くなり、徐々に受け入れられてきた。ゲノムリソース銀行の主な目的は、ARTによって、生物の多様性の減少を防ぐか、または少なくとも低下させることである(29)。現在、胎子線維芽細胞や成体の体細胞と除核卵母細胞を融合させる技術によって、クローン産子が生み出されている(25,28,44,49)。SCNTは遺伝的多様性を保つための有益な手段であり、それにより種の継続の機会を得ることができる(41)。絶滅の危機に瀕しており、ヒツジの近縁種であるムフロンについては、実際に、草原で発見した2頭のムフロンの死体から集めた顆粒層細胞を除核したヒツジの卵母細胞に核移植し、ヒツジに移植にすることで2頭を妊娠させる事に成功している

(30)。今後もクローン技術は、いくつかの絶滅危惧種を保護するために使用されると思われる。しかしながら、体細胞由来のクローン産子の生産には、さまざまな要因が影響する。例えば、レシピエント卵母細胞は、ドナー核を再プログラムする独特かつ複雑な細胞であり、クローンの成否要因の一つでもある(32)。また、現在までに、季節(10,46)や、培養条件(20)、卵母細胞の形態的な品質(19,40)などの要素がネコ卵母細胞の成熟能と体外発育能に影響を及ぼす事が示されている。さらに、ドナーの発情周期がネコ卵母細胞の成熟能および発育能について影響することがわかってきている(10,21,24)。これらの要因の中で、成熟能に最も影響を与える要因は、培養した卵母細胞の質であると示唆されている(26)。しかし、ドナーの発情周期と、卵母細胞の質および発育能間の関係についての報告は少ない。また、SCNT に使用されるレシピエント細胞質の由来は、胚盤胞発生率と胎子生存率に影響する事が明らかとなっている(47)。しかしながら、レシピエント細胞質として用いた卵母細胞の発情周期がネコ SCNT 胚の発生能に影響するかどうかは、不明なままである。そこで、研究 2 では、様々な発情周期の卵巣由来の卵母細胞を用い、形態的な品質についての分布を調べ、IVF と体細胞核移植(SCNT)後の卵母細胞の発育にドナーネコの発情周期が与える影響を調べた。

第2章

研究 1

異なる温度で保存した卵巢由来ネコ卵母細胞の發育能

緒言

近年、IVF 技術は絶滅の危機にさらされたネコ科動物の保護に関する補助技術となりうる事が示唆されている(39)。また、イエネコは、野生ネコの ART 開発のための貴重なモデル動物である(9)。イエネコでは、摘出卵巣由来卵母細胞の約 50%から 65%が、成熟培養によりMII 期に成熟し、20%から 30%の成熟卵母細胞が IVF 後に胚盤胞に発育する(19,24,46)。さらに、他の種と異なり、ネコ卵母細胞には、一時的に 4°Cで保存後に体外成熟ができる(51)。4°Cで 72 時間まで保存された卵巣内ネコ卵母細胞が体外成熟能を持ち続けていることが示されており、24 時間 4°Cで保存した卵巣由来の卵母細胞を IVM、IVF、IVC することで産子が得られている(14,51)。一時的な卵巣保存により、絶滅の危機にさらされたネコ科動物が野外で急死した場合に卵巣から卵母細胞を救う機会が創出できる。しかしながら、野外で生存する絶滅危惧種のネコ科動物の死後、直ちに卵巣を回収し、4°Cに保存する事は困難である。死後や摘出後に卵巣が保たれる時間と温度によって、卵巣から回収した卵母細胞が影響を受けていると思われるが、低温保存前に様々な期間、4°Cより高い温度で保存した卵巣由来卵母細胞の回収に関する報告はほとんどない。

本研究は、卵母細胞の成熟能へのネコ卵巣の保存温度の影響を調べ、低温保存前に室温で様々な時間保存した卵巣由来卵母細胞の成熟能および発生能を検討した。

材料および方法

卵巣の保存と卵母細胞の培養

以前に Karja ら(24)によって報告された手技に従ってネコ卵母細胞を成熟させた。すなわち、動物病院で様々な発情周期を示す成熟メスから卵巣を卵巣子宮摘出術により採取した。摘出後、卵巣を生理食塩水中に入れ、実験室に持って来るまでの2時間38°Cに保ち、次に24時間、様々な温度で保存した。保存後、卵巣を50 µg/mL ゲンタマイシン(Sigma, St. Louis, MO, USA)添加調整リン酸緩衝食塩水(m-PBS; Nihonzenyaku, Fukushima, Japan)中で洗い、各卵巣を37°CのmPBSを入れた90 mmのシャーレ中でメスを用いて細切し、卵丘・卵母細胞複合体(COCs)を分離した。均一で暗色の卵細胞質、および2層以上の卵丘細胞が付着した形態的に正常なCOCsを培養に用いた。24時間、COCsを100 µLドロップで成熟培養した。成熟培養液は、4 mg/mLのウシ血清アルブミン(BSA; Sigma)、0.1 IU/mL ヒト閉経期尿性性腺刺激ホルモン (Teikoku Zoki, Tokyo, Japan)、10 IU/mL ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(KawasakiMitaka K. K., Tokyo, Japan)、1 µg/mL 17β-エストラジオール(Sigma)および50 µg/mL ゲンタマイシン添加 Earle's salt (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)添加 TCM199 から成る。使用前に、成熟培養液を2時間、38°C 5%CO₂ の湿潤気相中で平衡させた。なお、すべての培養を5%CO₂ の38°Cの湿潤インキュベーター内行った。

卵母細胞の減数分裂の評価

成熟培養後に、減数分裂の評価のためにCOCsを固定、染色した。卵母細胞を酢酸とエタノール(1:3 v/v)により48時間から72

時間固定し、アセト・オルセイン(45%の酢酸の中に 1%のオルセイン含有)で染色し、位相差顕微鏡で調べた。それぞれの卵母細胞の正確な成熟ステージは、その染色体構造と核膜における変化により基づいて評価した。核崩壊を起こしているか、または形が明らかに不規則であった卵母細胞は、変性卵と判定した。

体外受精と体外培養

Karja ら(24)の報告に従って精子を凍結保存した。受精日に、凍結精子の入ったストローを、5 秒間空気中に保ち、30 秒間 30°Cの温水中に入れ融解させた。融解後、精子の運動性が 50%以上のもののみを IVF に用いた。凍結-融解精子を 137 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ピルビン酸ナトリウム(Sigma)、および 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ゲンタマイシン添加ブラケット・オリファント(BO)液で 2 回 5 分間 500 \times g で遠心洗浄した(2)。上清を除去し、BO 液 500 μL で精液を希釈した。精子の濃度を BO 液内で 4×10^6 精子/mL に調整し、次に、精子懸濁液を 6 mg/mL BSA、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ヘパリン(Novo Nordisk A/S, Osaka, Japan)添加 BO 液にて 2×10^6 精子/mL の最終濃度へ希釈した。受精のため、成熟卵母細胞を 100 μL の精子ドロップへ 3-5 個の COCs を移し、12 時間媒精した。

12 時間媒精後、精子ドロップ中で、ピペットを用いて卵母細胞から卵丘細胞を機械的に除去した。続いて卵母細胞(卵子)を、4 mg/mL BSA および 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ゲンタマイシン添加 Earle's salt 液(MK-1)で洗浄した(22)。洗浄後、ミネラルオイルで覆った 500 μL の培養液で(5-20 卵子/500 μL)3 日間卵子を培養した。媒精して 3 日目に、2 細胞期以上へ分割した胚を 5% (v/v)牛胎子血清 (FBS) と 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ゲンタマイシン添加 MK-1 培地 100 μL ・ドロップ (1-5 胚/ド

ロップ)で培養した。桑実胚、胚盤胞への発育能を評価するため、分割胚のみをさらに4日間培養した。

総細胞数の評価

培養終了後、分割胚をすべて 3.7% (w/v)パラホルムアルデヒド(Wako Purechemical Co., Osaka, Japan)および 1% (v/v) トリトン X-100 (Sigma)添加リン酸緩衝液(PBS; ギブコ)中に室温で 15 分間固定を行った後、0.3% (w/v)ポリビニルピロリドン(Sigma)添加 PBS 中に 15 分間浸漬させた。次に、スライドガラス上に作った 90% (v/v) グリセロール (Wako Pure Chemical) および 1.9 μ M ビスベンザミド(Hoechst 33342; Sigma) 添加 PBS のマイクロドロップ中へ胚を入れた。続いて、胚の周囲にワセリン/パラフィンを四箇所置き、その上にカバーガラスを乗せ 4°Cで一晩静置した。1 胚あたりの細胞数を、365nm 波長励起フィルターを付けた蛍光顕微鏡で観察記録した。

試験方法

試験 1 では、卵母細胞の成熟能に与える卵巣の保存温度の影響を試験した。実験室に搬入後、各卵巣 (13 頭)をメスで 3 分割した。分割した卵巣は、等しく 3 つの処置群へ分け、4°C(低温群)、23-25°C (室温群)、38°C(高温群)の生理食塩水中で 24 時間保存した。卵巣を保存後、COCs を卵巣より回収し、前述のように形態的に正常な COCs を選択し、24 時間成熟培養液中で培養した。成熟培養後、減数分裂の状態を評価するために、すべての卵母細胞を固定、染色した。

試験 2 では、低温保存(4°C)前に、様々な時間室温保存した卵

巢由来卵母細胞の成熟能および発育能を調査した。実験室に卵巣を搬入後、各卵巣対(21頭)をメスで2つに分割した。分割した卵巣を、4つの処置群へ無作為に振り分けた。振り分けた卵巣を、低温保存前に室温生理食塩水中で0, 6, 12, 18時間保存した。各時間室温で卵巣を保存した後、合計保存時間が24時間となる様にさらに4°Cの生理食塩水中に保存した。保存後、卵巣より卵母細胞を回収し、その総数を記録した。その後の培養には、正常なCOCsのみを用いた。COCsを、前述の様に、体外で成熟、凍結融解精液を用いた媒精および培養を行った。

統計処理

データは平均±標準誤差で表示した。減数分裂の各ステージに達した卵母細胞の割合、総卵母細胞数に対する形態的に正常な卵母細胞の割合、分割胚の割合、桑実胚や胚盤胞のステージに発育した胚の割合を分散分析(ANOVA)の前に arc sin 変換を行った。変換したデータは、Statview プログラム(Abacus Concepts, Inc., USA)を用いた Fisher's protected least significant difference test (PLSD test)を行った。P 値が 0.05 より小さいものを有意と判定した。

結果

試験 1 では、24 時間異なった温度で保存した卵巣から回収した形態的に正常な卵母細胞を体外成熟した場合、低温保存(4℃) 群(53.4%)の卵母細胞は、室温および高温度群に比べて(20.0%および 2.4%)有意に高い割合で減数分裂を再開し MII 期に達した(表 1)。

試験 2 では、低温保存前の室温での保存時間が増えるに従い、保存卵巣から回収した形態的に正常な卵母細胞の割合は徐々に低下した(図 1)。卵巣を室温で 12 時間以上保存すると、形態的に正常な卵母細胞の割合(14.7%-26.4%)は、室温保存していない卵巣由来のもの(35.3%)より有意に低下した。同様に、低温保存前の室温保存時間が増加するに従い、**II** に達した形態的に正常な卵母細胞の割合は、徐々に低下した(表 2)。室温保存していない卵巣由来卵母細胞と比較して、卵巣を 6 時間以上室温保存すると、IVM/IVF 後に分割した卵母細胞の割合は、有意に低下した(表 3)。低温保存前に室温で保存すると、6 時間保存した卵巣由来卵母細胞からのみ IVM/IVF/IVC 後に胚盤胞胚が得られた。

考察

卵母細胞の成熟能を維持する卵巣の保存温度は、動物種によって異なる。例えば、牛では 25°C で保存した卵巣由来の卵母細胞は、37°C で保存した場合よりも高い発育能を有する(56)。馬の卵巣を 25°C と 35°C で 5-8 時間または 3-15 時間保存しても、卵母細胞の成熟能には影響しない(5,17,43)。しかしながら、室温保存に比較して低温保存(4°C)は有害であることが示唆されている(31)。15°C 以下で 6 時間保存したブタ卵巣の卵母細胞は、MII には到達しない(33)。これらの哺乳類の卵母細胞とは対照的に、72 時間 4°C で保存しても、ネコ卵巣由来卵母細胞は成熟能を持ち続けている(51)。以前の研究で、38°C で 2 時間保存したネコ卵巣由来卵母細胞と、4°C で 24 時間保存したものでは成熟能に有意な差はなかったと報告されている(35)。さらに、本研究では、4°C で 24 時間保存した卵巣由来卵母細胞の成熟能は、室温や 38°C で保存したものよりも有意に高かった。Wood らは(53)、4°C の生理食塩水中でネコ卵巣を保存すると、顆粒層細胞や卵母細胞の著しい核濃縮や空胞変性、膜の損傷増加に起因する死後変化を防ぐと報告している。一方、35°C でブタ卵巣を長時間(12 時間)保存すると、卵母細胞の DNA 崩壊の割合が増加し、卵母細胞の成熟率が低下する事が報告されている(33)。それゆえ、室温以上(>23°C)での卵巣保存は、ネコ卵母細胞の成熟能を減少させると示唆される。

本研究により、保存卵巣から回収した卵母細胞のうち、低温保存前の室温での保存時間が延長するに伴い、形態的に正常な卵母細胞の割合が低下することがわかった。形態的に正常な COCs の選択は、Wood と Wildt(19)が用いた基準に従い、暗黒色の卵母細胞質と 2 層以上の卵丘細胞の存在を基に行った。さらに、卵母細胞の質や発育能

に与える室温保存期間の影響を正確に評価するために、同じドナー由来の卵巣を4つの試験群に分けた(53)。本試験では、発情周期の様々なステージの卵巣を供試したが、低温保存前に室温で保存することによって、形態的に正常なCOCsの回収割合が影響されることがわかった。加えて、形態的に正常な卵母細胞のMII期への成熟割合は、低温保存前の室温保存時間の延長に伴い徐々に低下するということが本試験によりわかった。ウマ卵巣を5時間以上室温保存することにより、顆粒層細胞のアポトーシスが増加するとPedersenら(36)が報告している。低温での卵巣保存は卵母細胞のDNA崩壊開始が遅れる一方、高温での保存によって卵胞pHの変化によるDNA崩壊核を持つ卵母細胞の割合が増加する事がわかっている(33)。4°Cで保存したネコ卵巣は、12時間の保存までは顆粒層細胞のアポトーシスの増加は見られないことがわかっている(19)。代謝や恒温動物に存在する酵素は、体温で最も効果的に働くので、低温での卵巣保存によって産生副産物の蓄積や、アポトーシスの過程が遅延することが示唆される(33,37,52)。それゆえ、本研究により、摘出後のネコ卵巣の室温保存によって、卵胞の卵母細胞のDNA崩壊が促進され、卵母細胞の成熟能が低下する事が示唆された。

近年、24-27時間4°Cで保存した卵巣から採取したネコ卵母細胞より作成した体外胚から産子が得られている(14)。4°Cで72時間保存したネコ卵母細胞は、体外で核成熟能があるが、それらの卵母細胞の受精能および発育能は、24時間低温保存後ではより低下することがWolfeとWildt(51)によって報告されている。顆粒層細胞の時間依存性のDNA変性は、ネコ卵巣の低温保存時でさえ卵母細胞の発育能の損失よりも先行して起こることがJewgenowら(19)によって示されている。本研究では、卵巣を低温保存前に12時間または18時

間室温で保存すると、卵母細胞の IVF 後に分割能は著しく低下した。対照的に、6 時間保存した卵巣由来の卵母細胞は胚盤胞にまで発育した。これらの結果から、IVM/IVF/IVC 後に胚盤胞にまで分割、発育する卵母細胞の発育能は、低温保存前の室温保存時間の影響を受けることが示唆された。

本研究により、高い保存温度によって、24 時間保存した卵巣由来卵母細胞の成熟能が悪影響を受け、低温保存前の室温保存時間は卵母細胞の質と成熟能に影響する。卵母細胞の発育能を維持するためには、室温での卵巣の保存時間は 6 時間以下に限られる。突然死んだネコ科絶滅危惧種のメス由来の卵母細胞を活用できるようにするためには、死後 6 時間以内に卵巣を取り出し、4℃に保存するべきであることが示唆された。

第 3 章

研究 2

ネコ卵母細胞の形態的品質並びに体外受精・体細胞核移植後の
発育能に与える発情周期の影響

緒言

近年、ネコ科動物の体外受精技術の進歩によって、絶滅の危機にさらされたネコ科動物の保護が可能となってきた(39)。これまでに、季節(10,11,46)や、培養条件(20)、卵母細胞の形態的な品質(19,40,53,54)などの要素がイエネコ卵母細胞の成熟能と体外発育能に影響を及ぼすという事が示されている。また、ドナーの発情周期がネコ卵母細胞の成熟能および発育能について影響することがわかっている(10,11,21,23,24)。これらの要因の中で、成熟能に最も影響を与える要因として、培養した卵母細胞の質であると示唆されている(26)。しかし、ドナーの発情周期と、卵母細胞の質および発育能との関係についての報告はほとんどない。

胎子線維芽細胞や成体の体細胞と除核卵母細胞を融合させる技術によって、クローン産子が生み出されている(25,28,44,49)。クローン技術は、絶滅危惧種を保護するために有用な技術の一つである。しかしながら、体細胞由来のクローン産子作出には、さまざまな要因に影響される。レシピエント卵母細胞は、ドナー核を再プログラムする細胞であり、クローン作出に影響する重要な要因の一つである(32)。これまでに、体細胞核移植(SCNT)に使用されるレシピエント細胞質が胚盤胞発生率と胎子生存率に影響している事が示されている(47)。しかしながら、レシピエント細胞質として用いた卵母細胞の発情周期がネコ SCNT 胚の発生能に影響するかどうかは、不明なままである。

本研究は、様々な発情周期の卵巢由来卵母細胞の、形態的な品質についての分布を調べ、IVF と SCNT 後の卵母細胞の発育にドナーの発情周期が与える影響を検討するために行った。

材料および方法

卵母細胞の回収

卵巣は、1月から6月(2003年から2006年)までの期間に地域の動物病院から提供され、卵母細胞の回収前に24時間、4°Cの生理食塩水で保存した。卵巣の発情周期におけるステージは、1)休止期：直径2mm以上の卵胞がない卵巣。2)黄体期：片側または両側に1つ以上の黄体(CL)が存在している卵巣。3)卵胞期：少なくとも1つ以上直径2mm以上の卵胞がある卵巣とした。卵母細胞を分離させるため、m-PBSを入れた90 mmのシャーレ内で各卵巣を手術用メスで細切した。卵母細胞を、TCM199 Earle's salt (Invitrogen)に0.4% (w/v) BSA、0.1 IU/mL ヒト閉経期尿性性腺刺激ホルモン、10 IU/mL ヒト絨毛性腺刺激ホルモン、1 µg/mL 17β-エストラジオール、50 µg/mL ゲンタマイシンを添加した新鮮な成熟培養液へ回収した。

卵母細胞の分類と成熟培養

休止期(n=41)、卵胞期(n=79)および黄体期(n=78)の卵巣より回収した卵母細胞を、以下の4グレードに分けた。1) グレード I：暗褐色で均一な卵細胞質をもち、2層以上の卵丘細胞が緊密に付着した卵母細胞。2) グレード II：暗褐色で均一な卵細胞質をもち、2層未満の卵丘細胞が緊密に付着した卵母細胞。3) グレード III：卵母細胞細胞質の色素が薄くなっており、細胞質顆粒が均一でなく、放線冠がまばらであるもの。4) グレード IV：卵母細胞細胞質の色が薄く著明に不規則な形をしており、崩壊を起こしているか、または変性しているもの。4つのグレードに分類した後、グレード I、II および III の一部の卵母細胞を100-µL ドロップの成熟培養液で24時間培養し

た。すべての培養を 38°C, 5% CO₂ の加湿インキュベーターで行った。

体外受精と培養

Karja ら(23,24)の方法により、精子を凍結保存した。受精日に、凍結精子を入れたストローを、5 秒間空気で静置した後に、30 秒間 30°C の温湯中で融解させた。融解後に、精子運動性が >50% であるものを IVF に供試した。凍結融解精子を、137 µg/mL ピルビン酸ナトリウムおよび 50 µg/mL がゲンタマイシン添加 BO 液(2)中で 500 ×g で 5 分間遠心することにより、2 回洗浄した。精子濃度を BO 液中で 4×10^6 sperm/mL に調整した後に、6 mg/mL BSA、20 µg/mL ヘパリン添加 BO 液を追加し、最終濃度が 2×10^6 sperm/mL となるよう精子懸濁液を希釈した。

24 時間の成熟培養後に、休止期 (n=12)、卵胞期(n=35)および黄体期(n=14)卵巣由来卵母細胞を(卵母細胞 3-5 個毎に)精子懸濁液 100 µL ドロップに移し 12 時間媒精を行った。12 時間媒精した後、精液ドロップ中で、卵母細胞に付着した卵丘細胞を小口径ピペットによって機械的に除去した。次に、卵子を 0.4%BSA, 50 µg/mL ゲンタマイシン添加調整 Earle's salt 液(MK-1) (22)中で洗浄した。洗浄後、卵子を 3 日間ミネラルオイル下で培養液 500 µL (5-20 卵子/500µL)中で培養した。媒精後 3 日目に、2 細胞期以上へ分割した胚を 5% (v/v)牛胎子血清 (FBS) および 50 µg/mL ゲンタマイシン添加 MK-1 培地 100 µL ドロップ (1-5 胚/ドロップ)で培養した。桑実胚、胚盤胞への発育能を評価するため、分割胚のみをさらに 4 日間培養した。

体細胞核移植

ドナー細胞の初代培養はFahrudinら(8)の報告に準じネコ子宮組織より作成した。組織を細切し、15分間、0.25% (w/v) トリプシン-EDTA中に入れて分散させ、次に、5%FBS、50 µg/mLゲンタマイシンを添加した修正ダルベッコイーグル培地(DMEM; Invitrogen)中で5分間、500×gで遠心処理することにより洗浄した。次に細胞懸濁液を、5%FBSを添加したDMEMを入れた35 mmの培養皿に移し、5%CO₂を含む38°Cの加湿インキュベーターで培養した。コンフルエントになると、細胞を5分間トリプシン処理し、回収細胞を5分間、500×gで遠心処理によって洗浄した。次に、5%(v/v)のジメチルスルホキシド(DMSO、Wako Pure Chemical)を含んだPBSで凍結するか、または新しい35 mmのシャーレに移した。ドナー細胞は、1から3継代したものをドナー核として用いた。移植に用いる前にトリプシン処理により、ドナー細胞の単細胞浮遊液を準備した。

IVFでは、回収時卵母細胞の品質の低下に伴い、胚の分割率や胚盤胞発生率が有意に低下した。このことから、休止期(n=8)、卵胞期(n=9)および黄体期(n=10)の卵巣由来のグレードIの卵母細胞のみをSCNTに用いた。成熟培養から24時間後、小口径ピペットを用い、卵母細胞を裸化した。極体を放出した卵母細胞のみをSCNTに使用した。裸化した卵母細胞を、除核前に20分間、5 µg/mLヘキスト33342(Sigma) と0.3%BSAを添加したPBSで培養した。透明帯に細いガラス針で部分的に切れ込みを入れ、第1極体付近にスリットを作った。第1極体とその周囲のMIIの染色体を含むと推定される細胞質を、針で絞ることによって押し出した。除去した細胞質を数秒間UV光に暴露し、染色体の除去を確認した。その後、単離した体細胞を除核卵母細胞の围卵腔に移した。卵母細胞操作には、5 µL/mLサイ

トカラシンBと0.3%BSAを添加したPBSを用いた。プラチナ電極線のチャンバー内に、Zimmerman細胞融合液(50)を満たし、BTXエレクトロセルマニユピレーター2001(BTX、米国)を用いて1 kv/cmの直流パルスを50 μ sec流して細胞融合を行った。電氣的融合の成否は、顕微鏡で検査した。次に、融合胚を、10 μ g/mLカルシウムイオノフォアA23187(Sigma)へ5分間暴露し、10 μ g/mL シクロヘキサミド(Wako Pure Chemical) 添加MK-1培地中で5時間培養した。

再構築胚を、0.4%BSA添加MK-1培地で培養した。培養3日目に、すべての分割胚を新しい5%FBS添加MK-1培養液に移し、胚盤胞への発育能を調べるためにさらに4日間培養した。

統計処理

供試した卵母細胞の総数に対して、形態的な各グレードの数の割合は、分散分析(ANOVA)の前に arc sin 変換を行い、変換したデータを Statview プログラム(Abacus Concepts, Inc., USA)を用いて Fisher's protected least significant difference test (PLSD test)により解析した。また、各発情期の卵巢由来卵母細胞数については、ANOVA 検定を行った。分割率および胚盤胞発生率は、カイ二乗検定で分析した。P 値が 0.05 より小さいものを有意と判定した。

結果

卵母細胞の分類

198 頭の卵巣から合計 16,558 個の卵母細胞を得た。休止期、卵胞期と黄体期卵巣から回収した卵母細胞の合計平均(±標準誤差)数は、それぞれ 111.1 ± 11.8 、 67.1 ± 6.3 および 85.9 ± 8.4 であった。卵胞期卵巣由来卵母細胞数と比較し、休止期由来の卵母細胞数は有意に多かった。同様に、休止期卵巣由来のグレード I の平均卵母細胞数(19.0 ± 2.7)は、卵胞期由来数(11.4 ± 1.5)より有意に高かった。3 つの発情期の間において、グレード II、III および IV に分類した卵母細胞の割合には有意な差は認められなかったが、グレード I の卵母細胞の割合については、卵胞期および黄体期間に有意な差が認められた(14.9% : 20.2%)(図 2)。

IVF 胚の体外発育能

61 頭の卵巣からそれぞれ合計 404、535 および 360 個の卵母細胞を採取し、グレード I、II および III に分類後、体外成熟、受精、培養した(表 4)。回収時にグレードが低かった卵母細胞は、分割率および胚盤胞発生率が有意に低下した。休止期の卵巣由来でグレード II の胚盤胞形成率は、卵胞期の卵巣由来のものより有意に高かった。他のグレードに関して、発情期のステージ間には、分割率および胚盤胞発生率において有意差はなかった。

SCNT 胚の体外発育能

27 頭の卵巣からそれぞれ合計 364 個の除核 MII 卵母細胞に線維芽細胞を移植し、206 個(56.6%)の再構築胚が融合した。体外培養

後に、合計 35 個(17.0%)の SCNT 胚が胚盤胞期に発育した。表 5 に示した様に、発情期のステージ間には、SCNT 胚の分割率および胚盤胞発生率において有意差はなかった。

考察

本研究では、グレード I の平均卵母細胞数は、卵胞期卵巣に比較して、休止期卵巣で有意に多かった。そのうえ、本試験結果より、総回収卵母細胞に対するグレード I の卵母細胞の割合は、ドナーの発情周期の影響を受ける事が明らかになった。これらの結果は、高品質（グレード I）の卵母細胞数はドナーの発情周期の影響を受け、卵胞期や排卵直後卵巣に比較して、間期と休止期卵巣からより多くの卵母細胞を回収できると報告した Freistedt ら(10,11)の報告に一致している。しかしながら、Spindler と Wildt(46)は、一年を通して卵巣から回収した高品質な卵母細胞の割合は、卵巣の発情周期の影響を受けないと示唆している。この点については、卵母細胞の分類基準や卵巣の収集期間、収集後の卵巣保存時間の違いによるものと推察される。

本研究では、回収時の卵母細胞の質が IVF 胚の発育に影響することが示された。また、以前の報告でも、体外成熟能や IVF 後の発育能において、培養に用いたネコ卵母細胞の重要性が示されている(19,26,40,53,54)。本試験結果より、グレード I 卵母細胞と比較して同様の卵細胞質であるが卵丘細胞の層が薄いグレード II 卵母細胞の分割率と胚盤胞形成率は低い事が判明した。卵母細胞を囲む卵丘細胞は、培地の中に減数分裂を活性化する物質を分泌し、卵母細胞の質を高めていることを示唆する報告がある(3,13)。それゆえ、本試験結果によっても、体外成熟中の卵母細胞を囲む卵丘細胞の存在がその後のネコ胚発育に重要な要素である事が示された。

本研究では、IVF 胚の分割率と発育率に及ぼす卵巣の発情周期の影響は認められなかった。しかしながら、これまでの報告では

卵巣の発情周期がIVMとIVF後のネコ卵母細胞の発育能に影響を及ぼすと示唆されている(10,11,23,24)。Freistedtら(10,11)は、黄体期と卵胞期由来グレードIの卵母細胞が胚盤胞期まで発育する割合は、休止期卵巣由来の卵母細胞のそれらより高いと報告している。しかしながら、本研究結果では、IVF後のグレードIの卵母細胞の発育能には、卵巣の発情周期は影響しないということが示された。Freistedtら(10,11)の研究では、体外培養前に、8時間未満室温で保存するか、もしくは4°Cで24時間未満保存していた。低い保存温度がネコ卵母細胞の減数分裂の成熟能と体外発育能に影響することが示されていることから(23,24)、ドナー発情周期による影響が緩和したものと推察された。従って、本研究結果におけるIVF後の卵母細胞の発育能の違いは、卵巣の保存温度と保存時間が異なることが一部起因しているように推察された。

本研究結果より、レシピエント卵母細胞を提供する卵巣の発情周期は、再構築胚の発育能には影響しないことが示された。これまでSCNTに使用されるレシピエント細胞質は、胚盤胞発生に有意に影響し、ドナーの年齢およびレシピエント卵母細胞の成熟時間がSCNT胚の発育能に影響する事が示唆されている(32)。対照的に、ネコSCNT胚の発育はレシピエント細胞質に供試される卵母細胞によって影響されないと、Gomezら(14,38)によって報告されている。彼らは、成熟培養液へのEGF添加によるネコ卵母細胞のIVMシステムの改良によって、体外成熟細胞質の質を体内成熟卵母細胞と同等にできることを示唆した。IVF胚の分割率や胚盤胞発生率は、回収時の卵母細胞の質の低下に伴い有意に低下することから、本研究では、グレードIの卵母細胞のみをSCNTに用いた。しかしながら、本研究ではEGF等の成長因子を成熟培養液中に添加しなかったが、

レシピエント卵母細胞を提供する卵巢の発情周期は、再構築胚の発育能には影響しないことが示された。このことから、卵巢の発情周期は SCNT ネコ胚の発育には影響しないことが示唆された。

これらのことより、回収卵母細胞数、グレード I 卵母細胞の平均数および割合は卵巢の発情周期の影響を受けることが示された。ドナーの発情周期は、IVF と SCNT 後の卵母細胞の体外発育に対して明らかな影響はなく、IVF 胚の発育には回収卵母細胞の質が影響することが判明した。このことは、ネコ卵母細胞の発育能に影響する最も重要な要因は、培養に用いた卵母細胞の質であることを示唆している。

第 4 章

総括

多くの種が絶滅するに従って、生物学的多様性の損失が地球上のすべての生命に悪影響を与えているとされている(45)。すべての種の絶滅を防ぐ最も望ましい方法は、それらの生息地の保存することであるが、現実的には難しい目標でもある(29)。ネコIVFの研究が発表されて以来(16)イエネコのART は大きく進展した(39)。最近、体細胞クローンにより、イエネコ産子が作出されている(44)。また、体外受精は少なくともヤマネコ種の1/3に成功しており、インディアンデザートキャット胚のイエネコへの移植、およびトラの同種移植によって産子が得られている(39)。

様々な要因の中で、卵巢の輸送、保存時間および特に輸送中の温度は、卵母細胞の成熟に影響を与える(34,56)と報告されている。さらに、動物種によって適切な卵巢の保存温度は異なる。例えば、牛では、25°Cで保存した卵巢由来の卵母細胞は、37°Cで保存した時よりも高い発育能を有する(56)。また、馬の卵巢を25°Cと35°Cで5-8時間と3-15時間保存しても、卵母細胞の成熟能には影響しない(5,17,43)が、室温保存に比較して低温保存(4°C)は成熟能を低下させる(31)。15°C以下で6時間保存したブタ卵巢の卵母細胞は、MIIには到達しない(33,52)。一方、これらの哺乳類の卵母細胞とは対照的に、72時間4°Cで保存しても、ネコ卵巢由来卵母細胞は成熟能をもち続けている(51)。以前の研究では、38°Cで2時間保存したネコ卵巢由来卵母細胞と、4°Cで24時間保存したものでは成熟能に有意な差はなかった(8,35)。また、4°Cで2時間または24時間卵巢を保存しても、卵母細胞の成熟能に差はないが、卵巢の48時間保存では有意に減少した(7)。研究1では、4°Cで24時間保存した卵巢由来卵母細胞

胞の成熟能は、室温や 38°C で保存したものよりも有意に高かった。Wood らは(53)、4°C の生理食塩水中でネコ卵巣を保存すると、顆粒層細胞や卵母細胞の著しい核濃縮や空胞変性、膜の損傷増加によって見られる死後変化を防ぐと報告している。高温状態(35°C)で卵巣を長時間保存(12 時間)すると、ブタ卵母細胞の DNA 崩壊の割合が増加し、卵母細胞の成熟率が低下する事が示されている(33,52)。それゆえ、室温以上(>23°C)での卵巣保存は、ネコ卵母細胞の成熟能を低下させると示唆された。

本研究により、保存卵巣から回収した卵母細胞のうち、低温保存前の室温保存時間の延長に伴い、形態的に正常な卵母細胞の割合は低下することが判明した。形態的に正常な COCs の選択は、Wood と Wildt が用いた基準に従い、一様な暗褐色の卵母細胞と 2 層以上の卵丘細胞の存在を基に行った(19,53,54)。さらに、卵母細胞の質や発育能に与える室温保存期間の影響を正確に評価するために、卵胞発育波が卵胞-卵母細胞の品質に影響を与える報告があることから、同じドナー由来の卵巣を 4 つの試験群に分けた(53)。本試験では、発情周期の様々なステージの卵巣を供試し、低温保存前に室温で保存することによって、形態的に正常な COCs の回収割合に影響することがわかった。加えて、形態的に正常な卵母細胞の MII への成熟割合は、低温保存前の室温保存時間の延長に伴い徐々に低下することも判明した。Wolfe と Wildt は、イエネコにおける胚盤胞発育が密接に卵成熟に関連し、卵母細胞の成熟は卵巣が保持された温度の影響を受け、4°C で 72 時間まで保存した卵巣から得られた卵母細胞は MII 期に達したが、胚盤胞への発育が低下した(51)。ウマ卵巣を 5 時間以上室温保存することにより、顆粒層細胞のアポトーシスが増加すると Pedersen ら(36)が報告している。また、Aman と

Parks(1)は、温度の変動が、ウシ成熟卵母細胞の細胞骨格構造と染色体構造に直接的に影響すると報告している。低温での卵巣保存は卵母細胞の DNA 崩壊開始が遅れる一方、高温での保存によって、卵胞 pH の変化により DNA 変性核を持つブタ卵母細胞の割合が増加する事が報告されている(33)。さらに、4°Cで保存したネコ卵巣は、12時間の保存までは顆粒層細胞のアポトーシスの増加は見られないことも示唆されている(19)。Holt と Picard(18)は、卵巣を輸送する間に、35-38°Cで細胞の自己融解酵素が発生しうると報告している。代謝や恒温動物に存在する酵素は、体温で最も効果的に働くので、低温での卵巣保存によって産生副産物の蓄積や、アポトーシスの過程が遅延することが示唆されている(33,37,52)。それゆえ、本試験結果により、摘出後 4°C以上の高温である室温保存によって、卵胞の卵母細胞の DNA 崩壊が促進され、卵母細胞の成熟能が低下する事が示唆された。

近年、24-27 時間 4°Cで保存した卵巣から採取したネコ卵母細胞より作成した体外受精胚から産子が得られている(14)。4°Cで 72 時間保存したネコ卵母細胞には、体外で成熟能があるが、卵母細胞の受精能および発育能は、24 時間低温保存後では有意に低下することが Wolfe と Wildt (51)によって報告されている。顆粒層細胞の時間依存性 DNA 変性は、ネコ卵巣の低温保存下でさえ卵母細胞の発育能の損失よりも先行することが Jewgenow ら(19)によって示されている。本研究では、卵巣を低温保存前に 12 時間または 18 時間室温で保存すると、卵母細胞の IVF 後に分割能は著しく低下した。対照的に、6 時間保存した卵巣由来の卵母細胞は胚盤胞に発育した。これらの結果から、IVM/IVF/IVC 後に胚盤胞期に分割、発育する卵母細胞の能力は、低温保存前の室温保存時間の影響を受けることが示唆され

た。結論として、高い保存温度が、24 時間保存した卵巣由来卵母細胞の成熟能に有害な影響を与え、低温保存前の室温保存時間が卵母細胞の質と成熟能に影響を与えることがわかった。卵母細胞の発育能を維持するためには、室温での卵巣の保存時間は 6 時間以下に限られる。急死したネコ科絶滅危惧種のメス由来の卵母細胞を救出できるようにするためには、死後 6 時間以内に卵巣を取り出し、4℃で保存するべきであることが結論付けられた。

1997年にWilmutら(49)によるドリー誕生の報告以降、SCNTを用いた絶滅危惧種の保護が議論されている(42)。近年、ラット(57)や羊、ネズミ、牛、ヤギ、ブタ、ウサギ、ネコ(44)、ラバ(55)および馬(12)で、除核した卵母細胞に体細胞由来の核を移植する方法でクローンが作られている。その中でも、野外で死体で発見された野生の羊種であるムフロンの細胞からクローン産子を得たという報告(30)は、準絶滅危惧種である動物のクローン産子を得た点と、死んでい
るドナーからドナー核を得た点において大いに注目すべき報告である。さらに、様々な哺乳類由来の体細胞核をウシ、ウサギ、およびヒツジの細胞質へ移植することにより、再構築胚が発育することが明らかになってきている(4,6,27,30,48)。再構築胚を作る上で、イエネコの卵母細胞質は、絶滅危惧ネコ科動物のSCNTのための有用なレシピエントである(14)。また、卵母細胞の成熟能に最も影響を与える要因は、培養した卵母細胞の質であると示唆されている(26)。しかしながら、レシピエント細胞質として用いた卵母細胞の発情周期が卵母細胞の質およびネコSCNT胚の発生能に影響するかどうかは、不明なままであった。

そこで研究 2 では、IVFと体細胞核移植後の卵母細胞の発育にドナーの発情周期が与える影響を調査した。グレードIの平均卵母細

胞数は、卵胞期卵巣に比較して、休止期卵巣でより多かった。その
うえ、本試験結果より、総回収卵母細胞数に対するグレードIの卵母
細胞の割合は、ドナーの発情周期の影響を受ける事が明らかになっ
た。これら結果は、高品質（グレードI）卵母細胞数はドナーの発情周
期の影響を受け、卵胞期や排卵直後卵巣に比較して、間期と休止期
卵巣からより多くの卵母細胞を回収できると報告した
Freistedt(10,11)の報告に一致している。しかし、Spindlerと
Wildt(46)は、一年を通して卵巣から回収した高品質な卵母細胞の割
合は、卵巣の発情周期の影響を受けないと提起している。グレードI
の卵母細胞の割合におけるこの食い違いは、卵母細胞の分類基準や
卵巣の回収期間、回収後の卵巣保存時間の違いによるものと推察さ
れた。

さらに、本研究では、回収時の卵母細胞の質が IVF 胚の発育
に影響する事が示された。また、以前の報告でも、体外成熟能や IVF
後の発育能において、培養に用いたネコ卵母細胞の重要性が示され
ている(19,26,40,53,54)。本試験結果より、グレード I 卵母細胞と比
較して同様の卵細胞質であるが卵丘細胞の層が薄いグレード II 卵母
細胞の分割率と胚盤胞形成率は、低いことがわかった。卵母細胞を
囲む卵丘細胞は、成熟培養中に減数分裂を活性化する物質を分泌し、
卵母細胞の質を高めていることが示唆されている(3,13)。それゆえ、
本試験結果によっても、IVM 期間の卵母細胞を囲む卵丘細胞の存在
がその後のネコ胚発育に重要な要素であることが示された。

本研究では、IVF 胚の分割率と胚盤胞発生率に対する、卵巣
の発情周期の明らかな影響は認められなかった。卵巣の発情周期が
IVM と IVF 後のネコ卵母細胞の発育能に影響を及ぼすと示されてい
る(10,11,24)。Freistedt ら (10,11) によって、黄体期と卵胞期由来

グレード I の卵母細胞が胚盤胞期まで発育する頻度は、休止期卵巣由来の卵母細胞のそれらより高いと報告されている。しかしながら、本研究結果では、IVF 後のグレード I の卵母細胞の発育能には、卵巣の発情周期は影響しないということが示された。Freistedt ら(10,11)の研究では、体外培養前に、8 時間未満室温で保存するか、もしくは 4°C で 24 時間未満保存していた。低い保存温度がネコ卵母細胞の減数分裂の成熟能と体外発育能に影響することが示されていることから(23,24)、ドナー発情周期による影響が緩和したものと推察された。従って、本研究結果における IVF 後の卵母細胞の発育能の違いは、卵巣の保存温度と保存時間が異なることが一部起因しているように推察された。

本研究結果より、レシピエント卵母細胞を提供する卵巣の発情周期は、再構築胚の発育能には影響しないことが示された。これまで SCNT に使用されるレシピエント細胞質は、胚盤胞発生に有意に影響し、ドナーの年齢およびレシピエント卵母細胞の成熟時間が SCNT 胚の発育能に影響することが示唆されている(32)。対照的に、ネコ SCNT 胚の発育はレシピエント細胞質に供試される卵母細胞によって影響されないと、Gomez ら(14,38)によって報告されている。彼らは、成熟培養液への EGF 添加によるネコ卵母細胞の IVM システムの改良によって、体外成熟細胞質の質を体内成熟卵母細胞と同等にできることを示唆した。IVF 胚の分割率や胚盤胞発生率は、回収時の卵母細胞の質の低下に伴い有意に低下することから、本研究では、グレード I の卵母細胞のみを SCNT に用いた。しかしながら、本研究では EGF 等の成長因子を成熟培養液中に添加しなかったが、レシピエント卵母細胞を提供する卵巣の発情周期は、再構築胚の発育能には影響しないことが示された。このことから、卵巣の発情周

期は SCNT ネコ胚の発育には影響しないことが示唆された。研究 2 の結論として、回収卵母細胞数、グレード I 卵母細胞の平均数および割合は卵巣の発情周期の影響を受けることが示された。ドナーの発情周期は、IVF と SCNT 後の卵母細胞の体外発育に対して明らかな影響はなく、IVF 胚の発育には回収卵母細胞の質が影響することが判明した。このことは、ネコ卵母細胞の発育能に影響する最も重要な要因は、培養に用いた卵母細胞の質であることを示唆している。

研究 1 では、ネコ卵巣由来卵母細胞の成熟能および発生能に保存温度および保存期間が与える影響を調査することにより、24 時間の 4℃以上の高温での卵巣保存が卵母細胞の成熟能を低下させる事が示唆され、また卵母細胞の品質と発育能は、低温保存前の室温保存時間の長さに影響することが明らかとなった。研究 2 では、ドナーネコの発情周期が、卵母細胞の回収時の品質と IVF および SCNT 後の発生能に与える影響を調査し、ドナーネコ卵巣の発情周期は、IVF および SCNT 後の体外発育に有意な影響は与えないが、回収時卵母細胞の品質が IVF 胚の発育に影響することが明らかとなった。このことはイエネコの ART および野生ネコ科動物の保護に有用な情報を提供するものと考えられた。

最後に、本研究が希少な野生生物の保存プログラムの一助となりうることを期待している。

图表

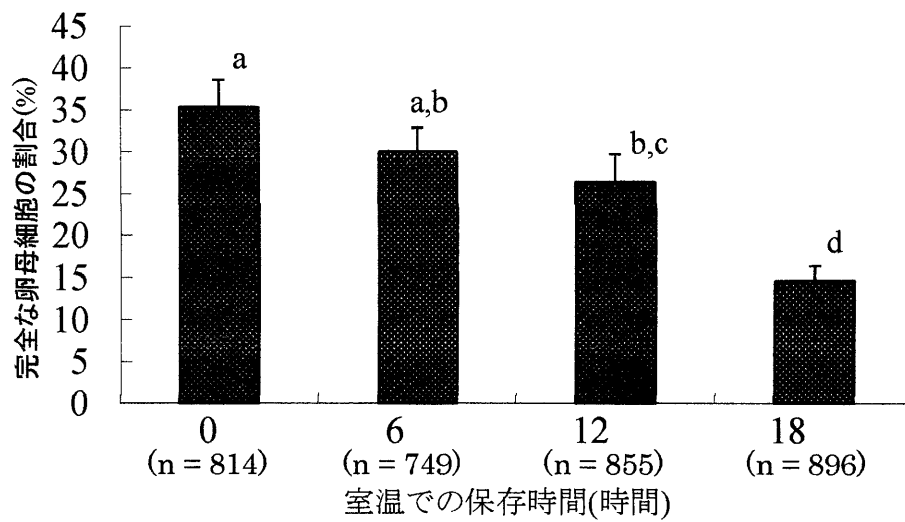


図 1

室温で様々な期間に保存したネコ卵巢由来の形態的に正常な卵母細胞の割合(平均±標準誤差)。21 頭からの卵巢を、低温保存(4℃)開始前に室温(23-25℃)で、それぞれ 0、6、12、18 時間保存した。異符号 (a-d)は有意な差を示す(P<0.05)。供試した卵母細胞数を () 内に表示。

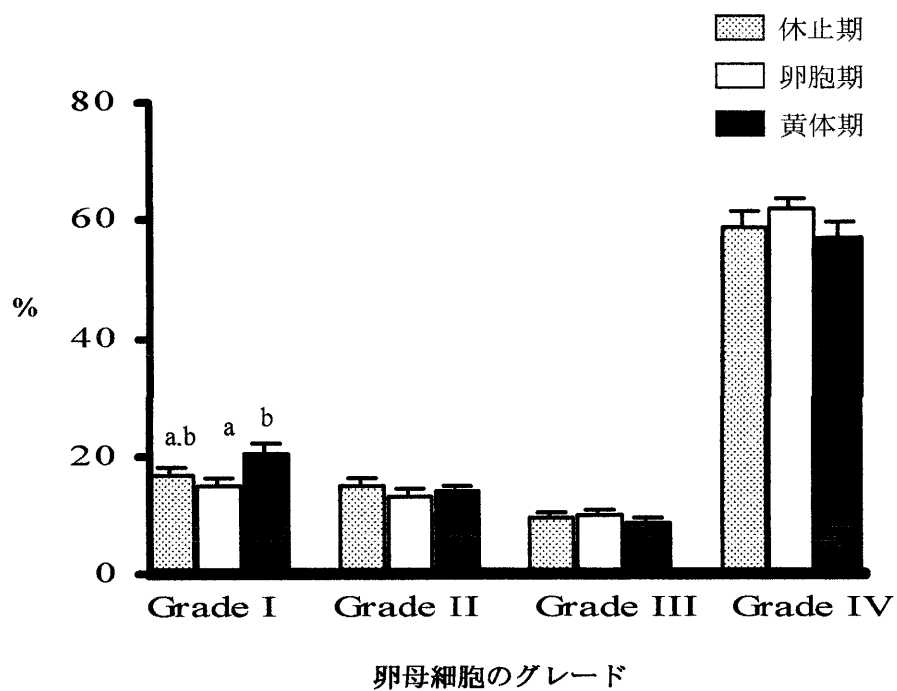


図 2

各発情期の卵巢由来の様々な品質のネコ卵母細胞の分布(平均±標準誤差)。同じグレード内および同じ発情周期の異符号は有意な差を示す($P < 0.05$)。

表1. 24時間様々な温度で保存したネコ卵巣由来の形態的に正常な卵母細胞の体外成熟能*

保存温度(°C)	卵母細胞数		変性卵母細胞数 (mean ± SEM)	
	卵母細胞数	卵母細胞数 (mean ± SEM) **	GVBD	MII
4	110	73 (63.1 ± 7.7) ^a	60 (53.4 ± 6.4) ^a	14 (16.0 ± 8.3)
23 - 25	71	25 (28.3 ± 10.0) ^b	12 (20.0 ± 8.6) ^b	11 (22.5 ± 9.7)
38	68	9 (6.6 ± 5.1) ^b	3 (2.4 ± 2.0) ^b	9 (26.4 ± 11.6)

*卵巣を等しく3つの処置グループに分配し、4°C、23 - 25°C、または38°Cで24時間、生理食塩水中に保存した。

**GVBD：卵核胞崩壊、MII：第2減数分裂中期。

^{a,b} 異符号間に有意差あり ($P < 0.05$)。

表 2. 室温で様々な時間保存したネコ卵巣由来の形態的に正常な卵母細胞の体外成熟能*

室温での保存時間 (時間)	卵母細胞数		卵母細胞数 (mean ± SEM)**		変性卵母細胞数 (mean ± SEM)
	卵母細胞数	GVBD	GVBD	MII	
0	186	150 (80.4 ± 4.5) ^a	111 (63.2 ± 5.7) ^a	15 (9.9 ± 4.2)	
6	130	92 (63.6 ± 5.9) ^b	51 (36.4 ± 6.3) ^b	21 (25.1 ± 6.7)	
12	108	66 (67.0 ± 6.1) ^{a,b}	31 (26.5 ± 4.9) ^{b,c}	13 (10.3 ± 3.6)	
18	65	26 (46.3 ± 9.3) ^b	8 (11.9 ± 4.8) ^c	15 (26.7 ± 7.4)	

* 卵巣を無作為に4つの処置グループに割り当てた。卵巣を室温で0、6、12または18時間保存後、合計保存時間が24時間となる様にさらに低温保存(4°C)した。

** GVBD：卵核胞崩壊、MII：第2減数分裂中期。

^{a,c} 異符号間に有意差あり ($P < 0.05$)。

表 3. 室温で様々な時間保存したネコ卵巣由来の形態的に正常な卵母細胞の体外発育*

室温での保存時間 (時間)	卵母細胞数	No. (mean ± SEM) of embryos developed to		胚盤胞の総細胞数 (mean ± SEM)
		>2-cell	胚盤胞	
0	73	34 (49.0 ± 10.1) ^a	11 (9.3 ± 4.3)	124.0 ± 24.3
6	77	30 (30.4 ± 7.1) ^b	4 (4.3 ± 3.7)	152.0 ± 13.0
12	81	4 (3.5 ± 2.4) ^c	1 (0.5 ± 0.5)	-
18	54	1 (3.3 ± 3.3) ^c	1 (3.3 ± 3.3)	-

*卵巣を無作為に4つの処置グループに割り当てた。卵巣を室温で0、6、12または18時間保存後、合計保存時間が24時間となる様にさらに低温保存(4°C)した。

^{a-c} 異符号間に有意差あり ($P < 0.05$)。

表 4. 各品質における卵母細胞の体外受精後の発育能に及ぼす発情周期の影響*

卵母細胞の グレード	卵巢の 発情周期	卵母細胞数	胚数 (%)	
			分割胚	胚盤胞
Grade I	休止期	101	53 (52.5)	29 (28.7)
	卵胞期	202	105 (52.0)	49 (24.3)
	黄体期	101	51 (50.5)	26 (25.7)
	合計	404	209 (51.7) ^a	104 (25.7) ^a
Grade II	休止期	151	63 (41.7)	26 (17.2) ^A
	卵胞期	254	89 (35.0)	21 (8.3) ^B
	黄体期	130	49 (37.7)	17 (13.1) ^{A,B}
	合計	535	201 (37.6) ^b	64 (12.0) ^b
Grade III	休止期	110	5 (4.5)	3 (2.7)
	卵胞期	180	7 (3.9)	1 (0.6)
	黄体期	70	1 (1.4)	0 (0)
	合計	360	13 (3.6) ^c	4 (1.1) ^c

* 24時間 4℃で保存した卵巢由来の卵母細胞を体外成熟、体外受精、および体外培養に用いた。

同列間(a - c)または各グレード内の発情周期間(A - B)の異符号間に有意差あり($P < 0.05$)。

表 5. 体細胞核移植(SCNT)後のレシピエント卵母細胞の発生能に与える発情周期の影響*

卵巣の 発情周期	SCNT 数	融合卵母 細胞数(%)**	SCNT 胚数(%)***	
			分割	胚盤胞
休止期	114	71 (62.3)	47 (66.2)	13 (18.3)
卵胞期	124	69 (55.6)	47 (68.1)	14 (20.3)
黄体期	126	66 (52.4)	49 (74.2)	8 (12.1)

*回収時にグレード I の卵母細胞のみを試験に用いた。

** SCNT に用いた卵母細胞数に対する割合。

***融合した卵母細胞に対する割合。

謝 辞

本稿を終了するにあたり、各研究についてご指導とご助言を賜りました、山口大学臨床繁殖学研究室 音井威重教授、山口大学農学部獣医学科 山本芳実教授、田浦保穂教授、佐藤宏教授および鹿児島大学農学部獣医学科 高木光博准教授に心から感謝申し上げます。

また、本研究のための貴重なデータ取得に御協力を戴きました桑の山 獣医科岸本彦生先生、山本動物病院 山本幾治郎先生、ひらた動物病院 平田真一先生ならびにファミリー動物病院 新田直正先生に篤く御礼申し上げます。

さらに、本研究をとりまとめる上で意義深い討論を交わし、親交を深め、互いに励まし合った山口大学大学院連合獣医学研究科の同級生ならびに後輩のみなさんおよび大学院への進学を許してくださった職場のみなさんに、心から感謝の意を表します。

参考文献

1. Aman RR, Parks JE. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of in vitro-matured bovine oocytes. *Biol Reprod* 1994;50: 103-110.
2. Brackett BG, Oliphant G. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol Reprod* 1975;12: 260-274.
3. Byskov AG, Yding Andersen C, Hossaini A, Guoliang X. Cumulus cells of oocyte-cumulus complexes secrete a meiosis-activating substance when stimulated with FSH. *Mol Reprod Dev* 1997;46: 296-305.
4. Chen DY, Wen DC, Zhang YP, Sun QY, Han ZM, Liu ZH, Shi P, Li JS, Xiangyu JG, Lian L, Kou ZH, Wu YQ, Chen YC, Wang PY, Zhang HM. Interspecies implantation and mitochondria fate of panda-rabbit cloned embryos. *Biol Reprod* 2002;67: 637-642.
5. Del Campo MR, Donoso X, Parrish JJ, Ginther OJ. Selection of follicles, preculture oocyte evaluation, and duration of culture for in vitro maturation of equine oocytes. *Theriogenology* 1995;43: 1141-1153.
6. Dominko T, Mitalipova M, Haley B, Beyhan Z, Memili E, McKusick B, First NL. Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species. *Biol Reprod* 1999;60: 1496-1502.
7. Evecen M, Cirit U, Demir K, Karaman E, Hamzaoglu AI, Bakirer G. Developmental competence of domestic cat oocytes from ovaries stored at various durations at 4 degrees C temperature. *Anim Reprod Sci* 2009;116: 169-172.
8. Fahrudin M, Otoi T, Karja N, Murakami M, Suzuki T. The effects of donor cell type and culture medium on in vitro development of domestic cat embryos reconstructed by nuclear transplantation. *Asian-Aust J Anim Sci* 2001;14: 1057-1061.
9. Farstad W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. *Anim Reprod Sci* 2000;60-61: 375-387.
10. Freistedt P, Stojkovic M, Wolf E. Efficient in vitro production of cat embryos in modified synthetic oviduct fluid medium: effects of season and ovarian status. *Biol Reprod* 2001;65: 9-13.
11. Freistedt P, Stojkovic P, Wolf E, Stojkovic M. Energy status of nonmatured and in vitro-matured domestic cat oocytes and of different stages of in vitro-produced embryos: enzymatic removal of

- the zona pellucida increases adenosine triphosphate content and total cell number of blastocysts. *Biol Reprod* 2001;65: 793-798.
12. Galli C, Lagutina I, Crotti G, Colleoni S, Turini P, Ponderato N, Duchi R, Lazzari G. Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. *Nature* 2003;424: 635.
 13. Geshi M, Takenouchi N, Yamauchi N, Nagai T. Effects of sodium pyruvate in nonserum maturation medium on maturation, fertilization, and subsequent development of bovine oocytes with or without cumulus cells. *Biol Reprod* 2000;63: 1730-1734.
 14. Gomez MC, Jenkins JA, Giraldo A, Harris RF, King A, Dresser BL, Pope CE. Nuclear transfer of synchronized african wild cat somatic cells into enucleated domestic cat oocytes. *Biol Reprod* 2003;69: 1032-1041.
 15. Goodrowe KL, Walker SL, Ryckman DP, Mastromonaco GF, Hay MA, Bateman HL, Waddell WT. Piecing together the puzzle of carnivore reproduction. *Anim Reprod Sci* 2000;60-61: 389-403.
 16. Goodrowe KL, Wall RJ, O'Brien SJ, Schmidt PM, Wildt DE. Developmental competence of domestic cat follicular oocytes after fertilization in vitro. *Biol Reprod* 1988;39: 355-372.
 17. Guignot F, Bezard J, Palmer E. Effect of time during transport of excised mare ovaries on oocyte recovery rate and quality after in vitro maturation. *Theriogenology* 1999;52: 757-766.
 18. Holt WV, Pickard AR. Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. *Rev Reprod* 1999;4: 143-150.
 19. Jewgenow K, Wood TC, Wildt DE. DNA degradation in mural granulosa cells of non- and slightly atretic follicles of fresh and cold-stored domestic cat ovaries. *Mol Reprod Dev* 1997;48: 350-355.
 20. Johnston LA, Donoghue AM, O'Brien SJ, Wildt DE. Influence of temperature and gas atmosphere on in-vitro fertilization and embryo development in domestic cats. *J Reprod Fertil* 1991;92: 377-382.
 21. Johnston LA, O'Brien SJ, Wildt DE. In vitro maturation and fertilization of domestic cat follicular oocytes. *Gamete Res* 1989;24: 343-356.
 22. Kanda M, Miyazaki T, Nakao H, Tsutsui T. Development of in vitro fertilized feline embryos in a modified Earle's balanced salt solution: influence of protein supplements and culture dishes on fertilization

- success and blastocyst formation. *J Vet Med Sci* 1998;60: 423-431.
23. Karja NW, Otoi T, Murakami M, Fahrudin M, Suzuki T. In vitro maturation, fertilization and development of domestic cat oocytes recovered from ovaries collected at three stages of the reproductive cycle. *Theriogenology* 2002;57: 2289-2298.
 24. Karja NW, Otoi T, Murakami M, Yuge M, Fahrudin M, Suzuki T. Effect of protein supplementation on development to the hatching and hatched blastocyst stages of cat IVF embryos. *Reprod Fertil Dev* 2002;14: 291-296.
 25. Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 1998;282: 2095-2098.
 26. Katska-Ksiazkiewicz L, Rynska B, Kania G, Smorag Z, Gajda B, Pienkowski M. Timing of nuclear maturation of nonstored and stored domestic cat oocytes. *Theriogenology* 2003;59: 1567-1574.
 27. Lanza RP, Cibelli JB, Diaz F, Moraes CT, Farin PW, Farin CE, Hammer CJ, West MD, Damiani P. Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning* 2000;2: 79-90.
 28. Lee BC, Kim MK, Jang G, Oh HJ, Yuda F, Kim HJ, Hossein MS, Kim JJ, Kang SK, Schatten G, Hwang WS. Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature* 2005;436: 641.
 29. Leibo SP, Songsasen N. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology* 2002;57: 303-326.
 30. Loi P, Ptak G, Barboni B, Fulka J, Jr., Cappai P, Clinton M. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nat Biotechnol* 2001;19: 962-964.
 31. Love LB, Choi YH, Love CC, Varner DD, Hinrichs K. Effect of ovary storage and oocyte transport method on maturation rate of horse oocytes. *Theriogenology* 2003;59: 765-774.
 32. Miyoshi K, Rzucidlo SJ, Pratt SL, Stice SL. Improvements in cloning efficiencies may be possible by increasing uniformity in recipient oocytes and donor cells. *Biol Reprod* 2003;68: 1079-1086.
 33. Murakami M, Karja NW, Wongsrikeao P, Agung B, Taniguchi M, Naoi H, Otoi T. Development of cat embryos produced by intracytoplasmic injection of spermatozoa stored in alcohol. *Reprod Domest Anim*

- 2005;40: 511-515.
34. Nakao H, Nakatsuji N. Effect of storage conditions of bovine ovaries and oocytes on the success rate of in vitro fertilization and culture. *J Reprod Dev* 1992;38: 11-13.
 35. Otoi T, Murakami M, Ooka A, Karja NW, Suzuki T. Effects of size and storage temperature on meiotic competence of domestic cat oocytes. *Vet Rec* 2001;148: 116-118.
 36. Pedersen HG, Watson ED, Telfer EE. Effect of ovary holding temperature and time on equine granulosa cell apoptosis, oocyte chromatin configuration and cumulus morphology. *Theriogenology* 2004;62: 468-480.
 37. Petrucci. R. "Principles and Modern Applications, 4 edition." *General Chemistry*, 1985.
 38. Pope C, Gomez M, King A, Harris R, Dresser B. Embryos produced in vitro after recovery of oocytes from cat ovaries stored at 4 C for 24 to 28 hours retain the competence to develop into live kittens after transfer to recipients. *Theriogenology* 2003;59: 308.
 39. Pope CE. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. *Theriogenology* 2000;53: 163-174.
 40. Pope CE, McRae MA, Plair BL, Keller GL, Dresser BL. In vitro and in vivo development of embryos produced by in vitro maturation and in vitro fertilization of cat oocytes. *J Reprod Fertil Suppl* 1997;51: 69-82.
 41. Ryder OA. Cloning advances and challenges for conservation. *Trends Biotechnol* 2002;20: 231-232; discussion 233.
 42. Ryder OA. The potential use of 'Cloning' in the conservation effort. *Zoo Biology* 1997;16: 295-300.
 43. Shabpared V, Squires E, Seidel G, Jasko. D. Methods for collecting and maturing equine oocytes in vitro. *Theriogenology* 1993;40: 1161-1175.
 44. Shin T, Kraemer D, Pryor J, Liu L, Rugila J, Howe L, Buck S, Murphy K, Lyons L, Westhusin M. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* 2002;415: 859.
 45. Soule ME. Conservation: tactics for a constant crisis. *Science* 1991;253: 744-750.
 46. Spindler RE, Wildt DE. Circannual variations in intraovarian oocyte but not epididymal sperm quality in the domestic Cat. *Biol Reprod*

- 1999;61: 188-194.
47. Wells DN, Misica PM, Day TA, Tervit HR. Production of cloned lambs from an established embryonic cell line: a comparison between in vivo and in vitro-matured cytoplasts. *Biol Reprod* 1997;57: 385-393.
 48. White KL, Bunch TD, Mitalipov S, Reed WA. Establishment of pregnancy after the transfer of nuclear transfer embryos produced from the fusion of argali (*Ovis ammon*) nuclei into domestic sheep (*Ovis aries*) enucleated oocytes. *Cloning* 1999;1: 47-54.
 49. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997;385: 810-813.
 50. Wolfe B, Kraemer D. Methods in bovine nuclear transfer. *Theriogenology* 1992;37: 5-15.
 51. Wolfe BA, Wildt DE. Development to blastocysts of domestic cat oocytes matured and fertilized in vitro after prolonged cold storage. *J Reprod Fertil* 1996;106: 135-141.
 52. Wongsrikeao P, Otoi T, Karja NW, Agung B, Nii M, Nagai T. Effects of ovary storage time and temperature on DNA fragmentation and development of porcine oocytes. *J Reprod Dev* 2005;51: 87-97.
 53. Wood TC, Montali RJ, Wildt DE. Follicle-oocyte atresia and temporal taphonomy in cold-stored domestic cat ovaries. *Mol Reprod Dev* 1997;46: 190-200.
 54. Wood TC, Wildt DE. Effect of the quality of the cumulus-oocyte complex in the domestic cat on the ability of oocytes to mature, fertilize and develop into blastocysts in vitro. *J Reprod Fertil* 1997;110: 355-360.
 55. Woods GL, White KL, Vanderwall DK, Li GP, Aston KI, Bunch TD, Meerdo LN, Pate BJ. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science* 2003;301: 1063.
 56. Yang N, Lu K, . IG. In vitro fertilization (IVF) and culture (IVC) of bovine oocytes from stored ovaries. *Theriogenology* 1990;33: 352.
 57. Zhou Q, Renard JP, Le Fric G, Brochard V, Beaujean N, Cherifi Y, Fraichard A, Cozzi J. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science* 2003;302: 1179.