

黒毛和種リピートブリーダー牛における
受胎性向上に関する研究

山口大学大学院連合獣医学研究科

小野 哲嗣

2016年9月

目次

要 旨	2
第 1 章	5
緒 言	6
第 2 章	11
研 究 1	12
緒 言	13
材料および方法	14
結 果	17
考 察	18
研 究 2	20
緒 言	21
材料および方法	23
結 果	28
考 察	30
第 3 章	34
総 括	35
謝 辞	41
参考文献	42
図 表	53

要旨

畜産業における雌家畜の繁殖障害(不妊症)は、畜産物の生産性を停滞させ農家経営の不安定を招く。近年、牛における不妊症の診断は、超音波画像診断、ホルモン測定等の普及により正確なものとなり、加えて人工授精(Artificial Insemination; AI) や胚移植(Embryo Transfer; ET)などの技術進歩により、優秀な能力を持つ個体の保存、量産といった育種改良の観点も備わり、その治療実績は上がっている。同時に、*in vitro* における牛の内分泌機構や生殖器の細胞学的または形態学的な変化や機能といった繁殖生理の研究、解明も進んでいる。しかしながら、臨床的に診断や治療が困難な繁殖障害は存在し、生殖器においてもその機能や形態的变化機構が詳細に明らかにされている訳ではない。

牛のリピートブリーダー(Repeat Breeder; RB)は、卵巣や子宮に異常を認めず正常な発情周期を営むにも関わらず3回以上のAIを試みても妊娠せず、その原因も不明とされる。RB牛の繁殖性を向上させる方法としてETの応用が知られているが、その報告はホルスタイン種などの乳用牛が主であり黒毛和種肉用牛での報告は少ない。そこで、研究1では、黒毛和種RB牛へのET受胎率における産歴と季節の影響を評価した。ETは、RB牛と診断された155頭の未經産育成牛(2歳未満)及び172頭の経産牛(8歳未満)に実施し、その内、57頭に新鮮胚、270頭に凍結胚を移植した。新鮮胚移植牛群と凍結胚移植牛群の受胎率に差は認められず、育成牛群と経産牛群の間にも受胎率、流産率、死産率、正常分娩率にお

いて差は認められなかった。経産牛群の夏季(6~8月)において、春季(3~5月)、冬季(12~2月)に比べ受胎率が有意に低下した($P<0.05$)。一方で、育成牛群では季節間での受胎率に差は認められなかった。黒毛和種 RB 牛における ET 受胎率に使用する胚(新鮮胚・凍結胚)や産歴は影響しない事が示されたが、暑熱ストレスは、経産 RB 牛の繁殖性に影響する可能性が示唆された。

一方で、牛卵巢における卵胞形成や卵子発育過程は不明な点が多く、牛生体(*in vivo*)でのアプローチには限界がある。*in vitro*において牛卵丘-卵母細胞複合体(COCs)を三次元培養すると卵胞様形態(AFLS)を形成し発育する事が知られており、その技術確立は卵胞発育のメカニズムを知る上でのモデルとなる。研究 2 では、牛卵丘-卵母細胞複合体(COCs)のコラーゲンゲル包埋培養からの卵胞様形態(AFLSs)形成におけるジブチル cAMP dbcAMP とヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)の効果を評価した。COCs 培養 4 日から 8 日目間の dbcAMP 添加群の AFLSs の平均直径は、対照群に比べて、その添加濃度(0.5-2.0mM)に関係なく増加が認められた。hCG 添加群の培養 4 日目の AFLSs 直径は、無添加対照群に比べて、その添加濃度(1-100IU/mL)に関係なく低下する傾向が認められた。hCG を 10IU/mL 添加した群において、培養 4 日目の培養液中の抗ミュラー管ホルモン(AMH)濃度の増加が認められたが、プロゲステロン(P4)濃度やエストラジオール(E2)濃度に差は認められなかった。dbcAMP や hCG 添加の有無に関わらず、培養終了後の AFLSs から採取したほぼ全ての卵母細胞の核に成熟分裂を認めた。本試験の結果から dbcAMP は AFLS の形成を促し、hCG は阻害する事が示唆された。さらに、hCG 添加による培養 4 日目までの AFLS 内の顆

粒層細胞の黄体化は認められないと考えられた。

これら得られた結果は、ET が、黒毛和種 RB 牛の受胎性向上に貢献し、AI に代わる手法となる事が示され、さらに、牛 COCs を用いた 3 次元卵胞培養への 1.0mMdbc 添加培養は AFLS の形成を促進することが示された。今後この卵胞発育モデルを用いた RB 牛の原因追求が期待される。

第 1 章

緒言

畜産業における家畜の繁殖は、継続的に肉や乳、皮などの畜産物を生産するための根幹であり、その障害は、畜産農家の生産性を停滞させ経営に悪影響を及ぼす。繁殖障害の原因には、生殖器の先天的または後天的な解剖学的異常、ホルモン分泌の異常、感染、飼養管理不良や発情観察不良などの人為的要因があげられるが、その結果、雌畜では不妊症となる。雌畜の不妊症に対する治療は、ホルモン剤、抗生物質投与等の化学療法その他、外科的処置も行われているが、その治療方針が正確な診断に基づいて行われなければ治癒(受胎)を達成させる事は困難である。古くから繁殖障害の診断は、畜主への問診に加え膣検査や直腸検査などの繁殖機能検査等により行われ、近年では、超音波画像診断、ホルモン測定等の普及により、より正確なものとなった。加えて人工授精(Artificial Insemination; AI) や胚移植(Embryo Transfer; ET)などの技術進歩により、優秀な能力を持つ個体の保存、量産といった育種改良の観点も備わって、繁殖障害の治療実績は上がっている。特に雌牛の繁殖障害の診断および治療技術は高いもので、様々なホルモン処置による治療や人為的操作法が臨床現場で実用化され、受胎率向上に貢献している。同時に、牛の内分泌機構や生殖器の細胞学的または形態学的な変化や機能といった繁殖生理の研究、解明も進んでいる。しかしながら、臨床的に診断困難な繁殖障害は存在し、生殖器においてもその機能や形態的变化機構が詳細に明らかにされている訳ではない。

リピートブリーダー(Repeat Breeder; RB)は、雌牛にとってもっとも重要な繁殖障害の1つと考えられる。RB 牛は、臨床的な発情周期や生殖器異常を認めないにも関わらず、3 回以上 AI を行っても妊娠しない牛と定義されている³²。RB の原因は、生殖器の先天性または後天性の解剖学的異常や生殖細胞、胚の異常、生殖器感染、内分泌異常、栄養代謝障害、発情発見や受精適期の見逃しや受精技術等の人為的問題、頸管粘液の精子受容性不良や精子免疫など様々な要因について報告^{26,31,40,49,53,51}があるが、不明な点も多い。一方で、正常な雌牛においても受精後の胚や胎子の死滅は認められており、受精後 7~8 日の桑実胚や 11~13 日の脱出胚盤胞の時期までの死滅(早期胚死滅)が多いとされるが、RB 牛の早期胚死滅率は正常牛より高いとされ、牛では一般に、発情周期の半ばを過ぎて胚死滅が起こると黄体の退行が遅れて発情周期が延長するとされるが、受精後 11~13 日目以前で胚の死滅が起こった場合に発情周期は延長せず、その診断は臨床的に困難となる⁶。受精後の RB 牛への性腺刺激ホルモン放出ホルモン(Gonadotropin-releasing hormone; GnRH)やヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(Human chorionic gonadotropin; hCG)などのホルモン投与治療が、RB 牛の受胎率を向上させた報告^{42,69}もあるが、ホルモン治療のみでは RB 牛の受胎性を必ずしも向上できるわけではない。

一方で、RB 牛の受胎率向上に有効な手法として ET が注目されている^{23,67}。乳牛では、高泌乳や負のエネルギーバランス、暑熱ストレスにより内分泌異常や子宮内環境の悪化した結果、卵子品質や胚発生率の低下が起こるとされ、結果、早期胚死滅率が高くなり RB の原因となると考えられている。しかし、桑実胚や胚盤胞期などの発生の進んだ胚は、卵母細胞

胞や発生前期の胚に比べ暑熱ストレスに強く、ET では、この時期の胚を移植する為、卵子成熟や胚の発生前期段階をバイパスする事によって高い受胎率が得られると考えられている^{25,52}。一方で、これら ET や RB の研究報告は、ホルスタイン種に代表される乳牛において盛んに行われているが、わが国固有の肉用牛として生産される黒毛和種牛での報告は限られており、黒毛和種雌牛の RB における ET の受胎率を正確に評価した報告は少ない。

牛卵巢における卵胞形成の過程は、様々な内分泌様式²¹や細胞間、および細胞間隙間における相互作用⁵⁸などにより複雑であるが、多くの哺乳動物においてそのメカニズムについて未だ不明な点が多い。近年、牛生体(*in vivo*)における超音波画像診断検査やホルモン動態を調査することにより、卵胞選択等のメカニズムの解明が行われているが、牛生体でのアプローチには限界がある。一方、*in vitro* において卵母細胞とその周囲の卵丘顆粒層細胞の三次元構造を維持し培養すると、COCs は卵胞様形態(AFLS)を形成し発育する事が知られている³³。*in vitro* における卵胞発育モデルの作成は、卵胞成長や卵子発育のメカニズムを知る上で重要な技術であり、卵丘卵母細胞複合体(COCs)の3次元培養について、マウス^{10,16,27}、ラット¹³、ハムスター⁶¹、ウシ^{3,33,37}、そしてブタ³⁸において報告されている。AFLS の形成は、卵母細胞を取り囲み栄養を供給する卵丘細胞の増殖や分化に依存する¹²。卵丘細胞と卵母細胞は相互に作用し、卵丘細胞は卵母細胞への物質供給や内分泌ホルモンの伝達を仲介し、卵母細胞はパラクリン因子を分泌する事により卵丘細胞の増殖を促進する³⁶。ゆえに、AFLS の形成と維持には卵母細胞と卵丘細胞の相互作用が必要であり、COCs の三次元培養では、その構造を維持する環境を作る事が重要と考えられている。コラーゲ

ンゲルや寒天培地を用いてCOCsを包埋する三次元培養方法が、Wandjiら⁷⁶やTelferら⁷²によって報告されており、コラーゲンゲルは、培養中に卵丘細胞が卵母細胞から剥がれ落ちることを防ぎ、AFLSの形成を助ける^{14,15}。

一方で、COCs三次元培養は、卵母細胞の体外成熟培養(IVM)に比べて8~14日間程度の長期間の培養が必要となる^{1,33,78}。長期間の培養は、卵母細胞の減数分裂再開による成熟および退行を起こす為、COCsの三次元培養において減数分裂阻害物質の添加は必須とされている⁴⁶。減数分裂の抑制因子として、卵胞液中の卵母細胞成熟抑制因子⁷⁴、ヒポキサンチン²⁴、アデノシン⁴⁵、また、顆粒膜細胞から分泌される減数分裂休止因子(meiosis-arresting factor ; MAF)⁶³などが報告されている。その中でも主要な調整因子としてサイクリックAMP(cAMP)があり、卵母細胞内で高濃度のcAMPは減数分裂休止を維持し、低濃度では減数分裂の再開を引き起こす³⁰。また、ジブチリルcAMP(dbcAMP)は、cAMPの塩基部分と糖部分に脂溶性のブチリル基を導入した化合物であり、細胞膜の透過性が高いため細胞外から投与してもcAMP合成が促進されたのと同じ効果をもたせることができる。豚のIVMにおけるdbcAMP添加は卵子内のcAMP濃度を高くし、多精子侵入率を低下させる事による胚盤胞発生率の増加を認めた報告がある⁷。ゆえに、dbcAMPはcAMPの増強因子であると言え、体外培養下において減数分裂再開を抑制することも報告されている⁶⁶。

ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)は、妊娠初期の婦人の尿中に多量に出現する性腺刺激ホルモンで、分子量約36700の糖タンパクホルモンである。黄体形成ホルモン(LH)様活性を

有し、生体への少量投与により内因性の卵胞刺激ホルモン(FSH)と共同して卵胞を发育させ、また多量投与で成熟卵胞に働いて排卵を誘起する⁷⁹。そのため、臨床の現場においては黄体形成強化や卵胞嚢腫の治療に使用されることが多い^{22,73}。また、FSHとLHの作用連携は、初期の前胞状卵胞における卵胞腔形成と卵母細胞の減数分裂を促進する¹⁸。LHは、FSHの影響下で顆粒層細胞のアロマターゼ活性を高めるアンドジェン産生を促進する²⁸。また、FSHは、初期胞状卵胞の培養において卵胞存続と顆粒層細胞増殖を刺激する³³。さらに、FSHは、アデニルシクラーゼ活性化により顆粒層細胞に作用し、cAMP蓄積促進すると考えられている⁴³。Shenら⁶⁵は、dbcAMPは、FSHよりも豚COCsにおける卵胞様形成を誘導するとも報告している。しかしながら、*in vitro*における卵胞や卵母細胞の发育の研究は、主にマウスにおいて行われており、牛におけるAFLS形成と卵母細胞发育におけるホルモン供給や減数分裂抑制物質の効果について正確に評価した報告は少ない。

そこで本研究では、RB牛に対するETの効果をも、未だ詳細な報告の少ない黒毛和種で検討すると共に、RB牛の原因を究明する為の*in vitro*での卵胞发育モデル確立を目指したCOCs三次元培養法について検討した。黒毛和種RB牛におけるETの効果では、ET受胎率における受卵牛の産歴やET実施季節による影響を調査した。そして、牛COCsのコラーゲン包埋による三次元培養では、dbcAMPまたはhCG添加による培養後8日間のAFLS形成と培養終了後の卵母細胞の減数分裂への効果を検討した。

第 2 章

研究 1

黒毛和種リピートブリーダー牛の受精卵移植後の受胎率に及ぼす産歴と季節 の影響

緒言

リピートブリーダーは、牛の繁殖障害でもっとも重要な1つと考えられている。リピートブリーダー(RB)牛は、臨床的な発情周期や生殖器異常を認めないにも関わらず、3回以上的人工授精(AIs)を行っても妊娠しない牛と定義されている³²。リピートブリーダーは、発情発見失宜、内分泌異常、感染等、様々な原因があると報告される^{40,49,53}が、不明な点も多い。性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)やヒト絨毛性性腺刺激ホルモン等のホルモン治療はRB牛の受胎率を増加させる報告がある^{42,69}が、その効果も限られたものである。一方で、受精卵移植(ET)は、卵子や早期胚の性質を生かし高泌乳や暑熱ストレスによる悪影響を小さくする為、搾乳牛において受胎率の向上に繋がるとされる⁷⁵。ゆえに、ETは、RB搾乳牛の繁殖性向上に効果的な手法とされる^{23,67}。これらの報告は、ETが、肉用牛におけるRBでも良好な妊娠率を達成する可能性を示唆している。しかしながら、ETの研究は、主に乳用牛にて行われており、肉用RB牛におけるETの受胎率を正確に評価した報告は少ない。

本研究は、黒毛和種RB牛におけるETの効果及び、ET受胎率における受卵牛の産歴やET実施季節による影響を評価した。

材料および方法

1) 受精卵牛とその管理

受精卵移植は、RBと判断された未経産牛155頭(<2才)および経産牛172頭(<8才)に実施された。RB牛は、3回以上の人工授精を行い妊娠の認めなかった牛とした。全てのRB受精卵牛は、鹿児島県肉用牛改良研究所または鹿児島県内農場で日本飼養基準に従って飼養される肉用牛であった。RB未経産牛及びRB経産牛の平均AI回数は、それぞれ 6.6 ± 0.3 (3-16)回、 5.6 ± 0.2 (3-14)回で、日々の繁殖検診での農家記録から選出した。子宮内膜炎等の子宮疾患や卵巣嚢腫などの卵巣の異常が臨床的に認められない牛を供した。全工程を山口大学および鹿児島県肉用牛研究所で行った。なお、受精卵移植は、RB牛の飼養者の許可を得て行った。

2) 過排卵処置および採卵

採卵は、磯部らの報告³⁹に従い実施され、全ての受精卵は、鹿児島県肉用牛研究所で飼養される黒毛和種ドナー牛(2-15才)より回収された。過排卵処置は、発情周期10-14日目に開始し、卵胞刺激ホルモン(FSH; 共立製薬)18AUを用い3日間の減量投与方法により行った。また、FHS処置5回目及び6回目に、375 mgのプロスタグランジンF2A類縁体(クロプロステノールC; フジタ製薬)を投与した。発情発見後12時間と24時間の2回に分けて、黒毛和種雄牛

の凍結融解精液を用いて人工授精した。受精卵は、最初の人工授精日(0日)から7日目にバルーンカテーテルを用いて非外科的に回収され、採卵後の受精卵の評価は、THE INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY⁵⁷の基準に従って分類した。受精卵は、GOOD (CODE 1)または、FAIR (BETWEEN CODES 1 AND 2)、POOR (CODE 2) DEGENERATEDの品質に分類された。桑実胚または胚盤胞期であるGOODまたはFAIRに分類された受精卵のみを凍結および移植に供した。

3) 受精卵の凍結および移植

受精卵の凍結および移植は、磯部らの方法³⁹に従い実施された。凍結液には、5%(V/V)エチレングリコール(EG; 和光純化学工業)、6%(V/V)プロピレングリコール(PG; ナカライテスク)を含むリン酸緩衝生理食塩液(PBS; Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)に、1mg/mL D-グルコースおよび36mg/mL ピルビン酸ナトリウム (Invitrogen Corp.)、0.1Mスクロース(ナカライテスク)、0.5%セリシン(和光純化学工業)、20%牛胎児血清(Thermo, Fisher Scientific, Worcester, MA, USA)を添加したものを使用した。凍結液に移した受精卵は、0.25mLプラスチックストロー(フジタ製薬)に充填され、15分間平衡化された。ストローをアルコールバスプログラムフリーザー(ET-1;フジタ製薬)に移し、-6.5°C、5分、予冷した。続けて、液体窒素(LN₂)で予冷したピンセットでストローを挟む事で植氷した。5分後、ストローを0.3°C/分の割合で - 30°Cまで冷却してから液体窒素で凍結し、移植まで保存した。ストローの融解は34°Cの温水に浸す事で行い、その後、直ちに受卵牛に移植した。

新鮮卵(57個)または凍結卵(270個)が、各々発情周期6-8日目の黄体の存在する卵巣側の子宮角に非外科的に移植され、発情周期は、ホルモン治療によるコントロールはなかった。移植は、3名の訓練された技師より行い、受胎確認は、移植後30-40日に経直腸超音波画像診断(5.0-MHz Transducer, Honda Hs-101v; Honda Electronics Co., Aichi, JAPAN)にて行った。

4)統計処理

受胎率、流産率、死産率、正常分娩率の比較は、カイニ乗検定にて行った。移植後の受胎率への季節的影響の評価は、春(3月～5月)、夏(6月～8月)、秋(9月～11月)、冬(12月～2月)の四季についてそれぞれ比較した。2009年から2014年までの平均気温の最小値および最大値は、春で12.5℃～20.8℃、夏で24.0℃～28.5℃、秋で15.9℃～26.1℃、冬で9.8℃～10.6℃であった。値は、 $P < 0.05$ で有意差ありと判断した。

結果

受精卵の凍結による受胎率へ影響を評価する為に、未経産および経産牛を含めた受胎率を調査したところ、受胎率は、新鮮卵移植群で 31.6%(18/57)、凍結卵移植群受胎率で 31.9%(86/270)であり、各群間に有意な差は認められなかった。

移植後の受胎率、流産率、死産率、正常分娩率は、未経産牛群と経産牛群はほぼ同様の数値を示し、有意な差は認められなかった(表 1)。受精卵移植における季節的影響を調査する為に、四季ごとの受胎率を調査した。経産牛において、夏期の受胎率は、春と冬に比べて有意に低かった($P < 0.05$)(表2)。しかし、未経産牛において季節間の受胎率に差は認められなかった。未経産牛および経産牛を合わせた受胎率では、夏期が春期に比べて減少する事が認められた。

考察

受精卵移植により、リピーターブリーダーの受胎率向上と繁殖生産性を維持する事が知られている⁷⁰。本研究でも、AIでは妊娠しなかった肉用RB牛において、ETにより凡そ30%の受胎率が認められた。この結果は、リピーターブリーダー対策に受精卵移植が人工授精に代わるツールとして利用できるとしたこれまでの報告^{23,67}と一致する。さらに、我々は、産歴が、受胎率、流産率、死産率、正常分娩率に影響しない事を示した。一般的に、未経産牛は、経産牛に比べて栄養的な負荷が少なく、分娩後の子宮や体系変化もないためレシピエントに適しているとされる¹¹。しかしながら、新鮮胚や凍結胚移植における受胎率は、レシピエントの産歴に影響しない報告もある³⁵。本研究の結果からも、肉用RB牛のETにおいて、未経産牛が経産牛より受胎し易いとは言えないと考えられた。

卵母細胞と早期胚は、暑熱ストレスの感受性が高い事が知られている²⁵。暑熱ストレスが子宮内環境に影響し、子宮への血流減少と子宮内温度上昇を起こす報告がある⁵⁹。これらの暑熱ストレスによる子宮環境変化は、胚発育を阻害し早期胚死滅を増加させる⁵⁶。しかしながら、3日目かそれ以上の受精卵は、卵母細胞や早期胚よりも暑熱ストレスに抵抗性を持つと考えられている。ETはAIに比べて、特に暑い季節の搾乳牛群における繁殖性を向上させる事がいくつか報告されている^{4,8,17}。ゆえに、ETは、卵胞発育や早期胚発育期の熱感作による悪影響をバイパスするための解決策となっている。本研究では、ET受胎率における季節的影響が、未経産と経産牛では異なる事を示した。未経産牛において、ET受胎率への季節的影響は認められなかった。反対に、経産牛において、暑い季節のET受胎率に有意な低下が観察された。未経産牛と経産牛で季節的影響に差が認められた原因は、不明であるが、Sartoriら⁶²は、経産牛は、環境温度上昇に対応した体温上昇が未経産より高くなると報告している。暑熱ストレスの引き金となる環境温度の上昇は、経産牛における負のエネルギーバランスを増悪すると示唆する報告がある⁵⁵。また、早期胚発育の傷害が、負の

エネルギーバランスや低栄養状態に関係している事が知られている⁴¹。さらに、肉用牛においても1年を通して栄養要求量は変化する事が知られており⁴⁴、経産牛における栄養要求の変化は、未経産よりもより多いと考えられる。ゆえに、暑熱ストレスが、直接的に、そして、エネルギーバランス変化を介して間接的に経産牛の繁殖成績に影響したと思われる。しかしながら、RB牛へのETにおける季節的影響を同定するには、肉用牛におけるエネルギーバランスと産歴の関係性を評価しなければならず、今後の課題である。

結論として、RB肉用牛における受精卵移植は、産歴や新鮮胚または凍結胚の使用による受胎率の差は認められない事が示唆された。さらに、暑い季節は、経産牛の受胎率に影響する。しかしながら、受精卵移植は、AIでは受胎しないRB肉用牛における代替処置となると考えられた。

研究 2

牛卵丘－卵母細胞複合体からの卵胞様形態形成におけるジブチリル cAMP
とヒト絨毛性性腺刺激ホルモンの添加効果

緒言

卵丘-卵母細胞複合体(COCs)の 3 次元培養は、卵胞発育の調整機構を研究する為の価値ある手法とされている。*in vitro*において卵母細胞とその周囲の卵丘顆粒層細胞の三次元構造を維持し培養すると、COCs は卵胞様形態(AFLS)を形成し発育する事が知られている³³。AFLS の形成は、卵母細胞を取り囲み栄養を供給する卵丘顆粒層細胞の増殖や分化に依存する¹²。また、卵丘細胞と卵母細胞は相互に作用し、卵丘細胞は卵母細胞への物質供給や内分泌ホルモンの伝達を仲介し、卵母細胞はパラクリン因子を分泌する事により卵丘細胞の増殖を促進する³⁶。ゆえに、AFLS の形成と維持には、卵母細胞と卵丘顆粒層細胞の相互作用が必要と考えられている。

培養液中の卵母細胞は減数分裂再開による退行を起こす為、減数分裂阻害物質の添加は、小卵母細胞の 3 次元培養に必須とされている⁴⁶。減数分裂を抑制していた卵胞環境から卵母細胞を取り出すと減数分裂が再開する事が知られている⁵⁴。卵母細胞の減数分裂の主要な調整因子としてサイクリック AMP(cAMP)があり、高濃度の cAMP は減数分裂阻害し、cAMP 濃度の低下は減数分裂の再開を引き起こす³⁰。卵胞内減数分裂阻害の調整する物質の候補として幾つか同定されているが、ヒポキサンチンやジブチル cAMP dbcAMP)は、*in vitro*において成熟分裂を妨げる事が知られている^{15,24}。

卵胞刺激ホルモン(FSH)や黄体形成ホルモン(LH)は相補的な効果を持っており、FSH と

LH の作用連携は、初期胞状卵胞における卵胞腔形成と卵母細胞の減数分裂能の獲得を促進する¹⁸。LH は、FSH の影響下で顆粒層のアロマターゼ活性を高めるアンドジェンの産生を促進する²⁸。さらに、FSH は、初期胞状卵胞の培養において顆粒層細胞増殖を刺激し卵胞を存続させる³³。FSH は、アデニルシクラーゼ活性化と cAMP 蓄積促進によって顆粒層細胞に作用すると考えられている⁴³。

Shen ら⁶⁵ は、cAMP 誘導体の dbcAMP は、FSH よりも豚 COCs における卵胞様形成を誘導すると報告している。しかしながら、in vitro における卵胞や卵母細胞の発育の研究は、主にマウスにおいて行われており、牛における卵胞様形成と卵母細胞発育におけるホルモン供給や減数分裂抑制物質の効果について正確に評価した報告は少ない。

一方、1-5mm 大の卵胞から採取した COCs は、それより小さな卵胞より採取したものよりも採取培養しやすいことから、COCs の培養系で、卵胞発育と卵子形成に必要な成長因子やホルモン環境を検討するには、1-5mm 大の卵胞からの卵母細胞の培養の方がより簡便である。しかしながら、1-5mm 大卵胞から採取した COCs を使用した卵胞様形態や卵母細胞発育の研究は少ない。

本研究は、dbcAMP およびヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)を添加した牛 COCs のコーラージェル包埋下培養において、培養 8 日目の AFLS 形成と卵母細胞の減数分裂能を評価した。

材料および方法

1) 牛卵母細胞の採取とコラーゲンゲル包埋培養

牛の卵母細胞は、Abakushina らの方法¹に従い採取および培養した。牛卵巣は、食肉処理場から速やかに実験室に持ち込まれ、COCs は、直径 1-5mm の卵胞から 18 ゲージ針を接続した 5ml ディスポーザブルシリンジを用いて吸引、採取された。COCs は、100IU/ml ペニシリン G カリウム(明治)および 0.1mg/ml 硫酸ストレプトマイシン(明治)、4mM ヒポキサントン(コージン)を添加した修正リン酸緩衝生理食塩液(m-PBS;日本全薬工業株式会社)に採取された。次いで卵丘細胞が付着し細胞質が形態的に均一な COCs のみを選別し、5%牛胎子血清および 50 μ g/mL ゲンタマイシン(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、4mM ヒポキサントン、5 μ g/mL インスリン(Sigma-Aldrich)、0.02AU/mL 卵胞刺激ホルモン(FSH;川崎製薬)を添加した TCM199 培養液[25mMHEPES 緩衝 TVM199 培地(Earle's salts)(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)]で 2-3 回洗浄を行った。COCs は、0.3%コラーゲン酸溶液(Cellmatrix Type I; 新田ゼラチン株式会社)、10 倍濃度 TCM199(日水製薬株式会社)、22mg/mLNaHCO₃と 47.7mg/mLHEPES を含む 0.05NNaOH 溶液が 8:1:1(v:v:v)の割合となる

ように混合したコラーゲンゲルに包埋された。包埋された COCs は、600 μ LTCM199 培養液中で、38.5°C、5%CO₂ の気相条件下で 8 日間培養された。培養中、4 日目に培養液の半量を交換した。

2) AFLS 直径および卵母細胞の減数分裂能の測定

コラーゲンゲル包埋下 COCs の AFLS 形成は、培養開始から 2 日ごとに倒立顕微鏡にて観察し、その直径は顕微鏡に設置されたカメラ画像((Leica DFC; Leica Microsystems, Tokyo, Japan)から測定した(図 1)。計測は、20 倍対物および 10 倍接眼レンズで設定したマイクロメーターにより行い、直径は、AFLS の短径と直径の平均値から算出した。

培養 8 日目の卵母細胞の減数分裂能は、Abakushina らの方法¹に従って評価した。AFLS 形成は卵丘細胞の増殖と卵母細胞の生存性に関係している³³。このことから、培養終了 8 日目に AFLS 形成を伴うコラーゲンゲルからのみ卵母細胞を回収した。回収した COCs は、3.7%パラホルムアルデヒドと 1%TritonX-100(Sigma-Aldrich)を添加したリン酸緩衝生理食塩液(PBS;Invitrogen)により裸化および固定、浸透化された。その後、卵母細胞をスライドガラスに移し、90%グリセロール(和光純薬工業株式会社)と 1.9 μ M ビズベンズイミダゾール(Hoechst 33342; Sigma-Aldrich)を添加した PBS を少量滴下し 4°C で一晩静置した。蛍光染色

した核は、蛍光顕微鏡(Nikon Optiphot-2; Nikon Corp., Tokyo, Japan)を用い観察した。卵母細胞の減数分裂ステージは、Roth および Hansen らの報告⁶⁰に従い次の通り分類した: 卵核胞(GV)ー完全な卵核胞; 卵核胞の崩壊(GVBD)ー染色体内のクロマチン編成と凝集; 減数第一分裂中期(MI)ー減数分裂紡錘体上に染色体の整列; 減数第一分裂後期から第一分裂終期(AT)ー紡錘体中間帯によって引き伸ばされた双極紡錘体上に位置する 2 つの分離した染色体群; 減数第二分裂中期(MII)ー一次極体の放出と染色体。また、断片化や明らかに形状が不規則な卵母細胞は、退行と定義した。

3) ホルモン測定

培養液中のプロゲステロン(P4)、エストラジオール(E2)、抗ミュラー管ホルモン(AMH)の濃度測定は、ELISA キット((EIA-1561 for P4 and EIA-2693 for E2, DRG Diagnostic, Marburg, Germany, and AMH Gen II ELISA for AMH, Beckman Coulter Inc., CA, USA)を用いて行った。測定感度は、P4 で 0.045-40ng/mL、E2 で 9.7-2000pg/mL、AMH で 0.05-22ng/mL であった。

4) 実験計画

実験 1:本実験の目的は、8 日間の COCs 培養での減数分裂能と AFLS 形成における

dbcAMP の効果を評価する事で、これまでの研究で、我々は、複数の COCs をグループ培養した場合、単独培養に比較して平均 AFLS 直径が小さくなるが、AFLS 形成率が高くなる事を報告している。ゆえに、1つのコラーゲンゲルに3つの COCsを包埋し、異なる濃度(0.5,1.0,2.0mM)の dbcAMP を添加した TCM199 培養液を用いて 8 日間培養した。対照として、dbcAMP を添加しない TCM199 培養液を用いて同様に COCs を培養した。

実験 2:本実験の目的は、8 日間の COCs 培養での AFLS 形成における hCG の効果を評価

する事で、実験 1 において、1.0mM の dbcAMP を添加した TCM199 培養液による COCs 培養で最適な AFLS 形成を認めた事から、COCs は、1.0mM dbcAMP 添加 TCM199 培養液を用いて培養した。1つのコラーゲンゲルに3つの COCsを包埋し、異なる濃度(1,10,100 IU/mL)の hCG を添加した TCM199 培養液を用いて 8 日間培養した。対照として、hCG を添加しない TCM199 培養液を用いて同様に COCs を培養した。

実験 3:hCG 添加による顆粒層細胞からのホルモン分泌の関係性の評価は、培養 4 日目に AFLS 形成が認められた COCs が含まれる培養液中のプロジェステロン、エストラジオール、AMH の濃度をそれぞれ測定する事で行った。実験 2 において、COCs から AFLS 形成は、hCG を添加の有無や hCG 添加濃度に関わらず培養 4 日目に最大直径に達することが認められた事から、プロジェステロン、エストラジオール、AMH 濃度は、培養 4 日目に測定したものをを用い比較を行った。なお、TCM199 培養液への hCG 添加は、0(コントロール),1,10,100IU/mL とし、COCs は、コラーゲンゲル 1 つにつき 1 つを包埋して培養した。

5) 統計処理

AFLS 形成率や各培養日の AFLS 直径、プロジェステロン、エストラジオール、AMH 濃度は、Stat View プログラム(Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA, USA)を用いて、分散分析法(PLSD test)による検定により分析した。核成熟率は、カイニ乗検定により分析した。値は、 $P < 0.05$ の時に有意差ありと判定した。

結果

実験 1: COCs 培養での減数分裂能と AFLS 形成における dbcAMP の効果

表1に示すように、COCs 培養 8 日後の AFLS 形成率は、1.0mM dbcAMP 添加群が、0.5mM 添加群や対照群に比べ有意に高かった。しかしながら、培養 8 日後の AFLS から採取した卵母細胞の減数分裂能に、各群間で有意な差は認められなかった。dbcAMP 添加群の培養 4 日目から 8 日目までの平均 AFLS 直径は、dbcAMP を添加しない対照群に比べて有意に高くなり($P<0.05$)、dbcAMP 添加濃度に関わらなかった(図 2)。

実験 2: COCs 培養での減数分裂能と AFLS 形成における hCG の効果

hCG 添加 TCM199 培地での COCs 培養において、hCG100 IU/mL 添加群の AFLS 形成率が、他の濃度添加群に比べて有意に低下した(表 2)。しかしながら、培養 8 日後 AFLS から採取した卵母細胞の減数分裂能に、各群間で有意な差は認められなかった。hCG1.0 IU/mL 添加群の培養 4 日から 8 日目までの平均 AFLS 直径は、hCG を添加しない対照群に比べて有意に小さくなった($P<0.05$)(図 3)。さらに、培養 4 日目以降の AFLS 直径は、対照群に比べ hCG の添加濃度に関わらず hCG 添加群で小さくなる傾向が認められた。

実験 3:hCG 添加による AFSL のホルモン分泌の評価

培養4日後にAFSL形成が認められた培養液中のプロゲステロン濃度やエストラジオール濃度において、各群間で有意な差は認められなかった(図 4)。しかしながら、hCG10 IU/mL 添加群の AMH 濃度(1.81 ng/mL)は、対照群(1.57 ng/mL)および hCG100 IU/mL 添加群(1.60 ng/mL)に比べて有意に高かった($P<0.05$)。

考察

コラーゲン包埋培養法は、細胞間接合を維持し卵胞発育を補助する事で3次元培養を実現する¹⁴。本研究において、我々は、1-5mm直径の卵胞から採取したCOCsを、卵丘顆粒層細胞の3次元組織の維持し培養する事により、AFLSを形成可能であることを示した。さらに、1.0mM dbcAMPを添加する事は、AFLSの形成率を上げ、その直径も大きくなる事を示した。放線冠細胞は、多くの細胞内プロセスを伴うが、透明帯を貫通したギャップ結合を介して卵母細胞との物質交換を維持する⁵。ギャップ結合チャンネルは、cAMPのような因子を顆粒層細胞から卵母細胞に伝達する事で減数分裂休止を仲介する事が報告されている²⁰。卵母細胞内のcAMPの殆どは、卵丘細胞で合成されたcAMPがギャップ結合を通して卵母細胞に運ばれる事に由来している⁶⁴。本研究で使用したdbcAMPは、cAMPよりも細胞膜を通過しやすく、細胞膜を通過した後のdbcAMPは、酵素による脱アシル化によってcAMPに変換される²。また、dbcAMPは、卵母細胞とその周囲の細胞間のギャップ結合を介した物質交換を維持、活性化することが知られている¹⁴。ゆえに、本研究での1.0mM dbcAMP添加によりAFLS形成率が増加した理由の1つに、卵母細胞と卵丘細胞間のギャップ結合を介した物質交換を活性化させた事が考えられた。一方で、今回、COCsのコラーゲン包埋培養の基礎培地として4mMヒポキサンチンを含むTCM199培養液を使用している。本研究結果では、dbcAMP添加によるCOCsの培養は、4から8日目の平均AFLS直径をその添加

濃度に関わらず増加させおり、dbcAMP およびヒポキサンチンは、共に胞状形成を刺激するが、ヒポキサンチンは卵胞発育に影響しない Hartshome らの報告³⁴と一致する。

卵胞発生は、卵巣内の細胞-細胞間や細胞-細胞外質間の相互作用と同様に、様々な内分泌およびパラクリン、オートクリン的な因子に制御される複雑な発達過程がある事が知られている^{21,58}。ゆえに、卵胞発育・発達における FSH と LH の画一的な作用を同定する事は難しい。一方で、FSH は、マウスの前胞状卵胞の培養において卵胞生存と顆粒層細胞増殖に必須である事が知られている⁶⁸。牛において卵母細胞と卵丘細胞の形態を維持した 3 次元培養系における FSH 添加は、顆粒層細胞の増殖を刺激し、その結果、AFLS 形成と卵母-卵丘細胞のギャップ結合を介した物質交換を促すことが報告されている³³。また、*in vitro* の卵胞培養時に低濃度の LH 添加は、胞腔形成性と卵母細胞の減数分裂の反応性を向上させる¹⁸。反対に、マウスの前胞状卵胞の培養において、FSH を含む培養条件下で LH 添加を行うと卵胞の発育に悪影響が出る事が知られている⁵⁰。本研究では、FSH を含む TCM199 培養液を基礎にして、コラーゲン包埋した牛 COCs 培養からの AFLS 形成における hCG 添加の効果を実験したが、COCs の 3 次元培養における hCG 100IU/mL 添加は、ALFS 形成を阻害する事を示した。さらに、hCG 添加群は、対照群に比べて培養 4 から 8 日目の平均 AFLS 直径の減少が認められた。Xu ら⁷⁷は、適切な発育段階前の前胞状卵胞への LH 暴露は、卵胞内でのシグナル消失に繋がると報告している。ゆえに、本研究の結果も同様に、hCG 添加による卵母細胞と卵丘細胞のギャップ結合を介した物質交換を消失させた事が示唆された。

以前、我々は、直径 1-5mm 卵胞から採取した GV ステージの卵母細胞を 14 日間コラーゲン包埋培養し、ほぼ全ての卵母細胞で GVBD ステージへの分化を認めたことを報告した¹。本研究において、直径 1-5mm 卵胞から採取した COCs は、同様の培養法を用いて 8 日間培養された。今回の実験で形成された AFLS から抽出したほぼ全ての卵母細胞が、培養後に GVBD ステージへ分化し、その減数分裂能は、dbcAMP や hCG 添加による影響は無かった。GVBD 抑制因子は、卵丘細胞を通した抑制因子の継続的な輸送により、卵母細胞の GVBD 分化を妨げる。COCs 内のギャップ結合の欠損は、卵丘細胞から卵母細胞への減数分裂阻害シグナル伝達が阻害される事によって卵母細胞の減数分裂再開を起こす⁷¹。卵母細胞において高濃度の細胞内 cAMP は cAMP 依存性プロテインキナーゼ活性により減数分裂休止を持続させる報告がある³⁰。しかしながら、cAMP が必ずしも卵母細胞の減数分裂休止や再開に関係している訳ではない報告もある¹⁹。本研究において、AFLS の平均直径は、dbcAMP 添加に関わらず培養期間の経過に付随して次第に減少が認められた。3 次元構造は、卵母細胞を取り巻き栄養供給する卵丘顆粒層細胞に依存する¹²。ゆえに、培養中の AFLS の形態変化は、卵母細胞と顆粒層細胞のギャップ結合の消失に関係し、その結果、高率な減数分裂再開を認めたと考えられた。

高いエストロゲンレベルは発育卵胞の閉鎖を招き⁹、そして、プロゲステロンの上昇は顆粒層細胞の黄体化に起因する、もしくは、卵母細胞の劣化の指標となる事が報告されている²⁹。Xuら⁷⁷は、前胞状卵胞の 3 次元培養時の FSH および LH 暴露は、培養 7 日から 14 日目の培養液中 E2 や P4 濃度に影響しないと報告している。本研究において、培養 4 日後

の AFLS 形成培養液中の E2 および P4 濃度は、hCG 添加濃度に影響されない事が示された。しかしながら、hCG 10IU/mL 添加群において、培養液中の AMH 濃度の上昇が認められた。牛の卵巣において、AMHは発育卵胞の卵丘細胞を含む顆粒層細胞内に限局する事が知られている⁴⁸。AMH 濃度は、閉鎖卵胞内では顕著に減少し、プロゲステロン濃度と負の相関があり、卵胞内の AMH の低下は黄体化に関係している⁴⁷。同様に、本研究結果から、AFLS 内の顆粒層細胞は培養 4 日目まで増殖を認め、hCG 添加による黄体化は刺激されていない事が示唆された。

結論として、本研究の結果は、1.0mM dbcAMP 添加により、AFLS 形成および平均直径に正の影響を与え、hCG 添加は AFLS 形成を阻害する事を証明した。培養終了時に AFLS から採取したほぼ全ての卵母細胞が、GVBD ステージに分化し、dbcAMP や hCG 添加は、減数分裂能に影響しなかった。しかしながら、hCG 添加による培養 4 日目までの AFLS 内の顆粒層細胞の黄体化は認められなかった。

第 3 章

総括

雌牛の繁殖障害(不妊症)は、生殖器の先天的または後天的な解剖学的異常、ホルモン分泌の異常、感染、飼養管理不良や発情観察不良などの人為的要因などが、原因に挙げられる。解剖学的異常を除けば、臨床的には、それらの原因により卵巣機能疾患や子宮疾患となり、発情周期の乱れや無発情などの異常を認める場合もある。これらの代表的な疾患として卵巣嚢腫や子宮内膜炎などが挙げられるが、発情周期の観察や繁殖機能検査等により診断、治療が古くから行われている。同時に、AI や ET などの技術に加えて血中ホルモン測定法や超音波画像診断法の進歩により、牛の繁殖障害の診断、治療はより正確なものとなっている。しかし、現状の畜産経営で問題となっている繁殖障害は、発情周期に異常を認めないにもかかわらず受胎しない RB などの診断が困難なものである。また、生殖器においてもその機能や形態的な変化のメカニズムが詳細に明らかにされている訳ではない。

研究1では、黒毛和種RB牛に対するET受胎率を調査したが、AIでは受胎の認められなかったRB牛の約30%に受胎が認められた。この結果は、乳用牛で報告されている結果と一致し²³、黒毛和種肉用牛においてもETがRB牛の受胎性を向上させ、AIに代わる応用性がある事が示された。さらに、黒毛和種牛においては、産歴が、受胎性やその後の流産、死産等に影響しない事を示した。乳用牛では、ETでは未経産牛が経産牛よりも受胎性が良く、その理由は、未経産牛は経産牛に栄養要求量が少なく分娩後の子宮感染や修復過程

がない為とされている¹¹。これは、品種に関係なく黒毛和種肉用牛においても当てはまると考えられるが、本研究結果からは、未経産牛が経産牛よりも受胎性がよいとは言えず、ETの受胎性に産歴が影響しないとする Hasler らの報告³⁵と一致する結果となった。

一方で、黒毛和種 RB 牛における ET 受胎率には、未経産と経産牛では季節的に差がある事が示され、夏季では経産牛の受胎率低下が認められた。反対に未経産牛では、季節による受胎率の差は認められておらず、RB 牛における経産牛と未経産牛での差の原因は不明である。Sartori ら⁶²は、経産牛は、環境温度上昇に対応した体温上昇が未経産より高くなると報告している。暑熱ストレスは、経産牛における負のエネルギーバランスを増悪するという報告があり⁵⁵、負のエネルギーバランスや低栄養状態は、胚死滅に関与している事が示唆されている⁴¹。肉用牛において1年を通して栄養要求量は変化する事が知られており⁴⁴、また、経産牛における栄養要求量の変化は、未経産牛の栄養要求量変化よりも高いと考えられることから、経産牛における暑熱ストレスは、直接的あるいは間接的に影響して、同環境条件における未経産牛よりも栄養要求量を増加させる事で、負のエネルギーバランスに陥り、それが夏季の受胎率低下に繋がったと考えられた。しかしながら、この季節的影響を同定するには、黒毛和種 RB 牛におけるエネルギーバランスと産歴の関係性を評価しなければならず、今後の課題である。

一方で、3日目もしくはそれ以上の受精卵は、卵母細胞や早期胚よりも熱抵抗性を持つと考えられており、その特性を生かして ET は、暑熱期の受胎率向上に応用される。実際、乳用牛の暑熱期において、ET が AI と比較して受胎性を向上させた報告がいくつか認められ

^{4,8,17}、ET は、卵胞発育や早期胚発育期の熱感作による悪影響をバイパスするための解決策と考えられている。本研究では、経産牛における夏季の ET 受胎率は低下したが、未経産牛において差がない事から ET が黒毛和種において暑熱期の受胎向上に貢献しないとは言えない。

以上より、ET が黒毛和種 RB 牛の対策になる事が示されたが、一方で、ET を活用した受胎改善は RB の根本的な原因を解決している訳ではなく、その要因については解明する必要がある。RB 牛の早期胚死滅率は正常牛より高いとされる⁶が、その原因の1つとして、内分泌異常が挙げられ、その中でも排卵後形成黄体の機能不全が示唆されている。排卵後 4 から 6 日目までに十分な血中 P4 濃度の上昇が認められない場合に受胎率が低下する。RB 牛は、健常牛に比べて黄体期の血中 P4 濃度のピークが低いことや排卵後の血中 P4 濃度の上昇が遅延することが知られており、その改善方法として、AI 後 4 日から 8 日目までに hCG 投与を行うことが、受胎率向上につながる報告もある。黄体機能不全は、FSH や LH の分泌不足や黄体における LH レセプター発現不足に起因するが、それには暑熱ストレスや低栄養状態も関係していると示唆されている。同様に、FSH や LH の分泌不足は、初期卵胞発育にも影響していると考えられるが、RB 牛は、正常な発情周期を営み、臨床的に無排卵や卵胞囊腫などの卵胞の異常は認めないため、*in vivo* での研究では RB 牛の卵胞発育動態を知る事には限界があると考えられる。牛卵巢における卵胞形成の過程は、様々な内分泌様式²¹や細胞間、および細胞間隙間における相互作用⁵⁸などにより複雑であるが、そのメカニズムを解明する事は初期卵胞発育に起因し、RB 牛の原因追及にも繋がると考えられ、

卵胞発育から初期黄体形成までの詳細な研究が必要である。

その研究の手法として、卵丘-卵母細胞複合体(COCs)の3次元培養は、卵胞発育の調整機構を研究する手法が活用できると考えられる。*in vitro* において卵母細胞とその周囲の卵丘顆粒層細胞の三次元構造を維持し培養すると、COCs は卵胞様形態(AFLS)を形成し発育する³³。また、直径 1-5mm の卵胞からの卵母細胞の培養する事は、卵胞発育と卵子形成に必要な成長因子やホルモン環境を容易に作製可能であり、生体のシミュレーションをする上で直径 1-5mm より小さい卵胞より採取したものよりも有益とされる。しかしながら、直径 1-5mm の卵胞から採取した COCs を使用した三次元培養法の報告は少ない。

研究 2 では、1-5mm 直径の卵胞から採取した COCs をコラーゲン包埋による 3 次元培養で、8 日間の AFLS 形成が可能であることを示した。さらに、培養液への 1.0mM dbcAMP 添加により AFLS 形成率を上げ、その直径も大きくなる事を示した。AFLS の形成には、卵母細胞を取り囲み栄養を供給する卵丘細胞の増殖や分化に依存し¹²、顆粒層細胞は透明帯を貫通したギャップ結合を介して卵母細胞との物質交換を維持する⁵。そして、卵母細胞内の cAMP の殆どは、卵丘細胞で合成された cAMP がギャップ結合を通して運ばれる事に由来している⁶⁴。dbcAMP は、cAMP よりも細胞膜を通過しやすく、細胞膜を通過した後は脱アシル化によって cAMP に変換される²。さらに、dbcAMP は、卵母細胞とその周囲の細胞間のギャップ結合を介した物質交換を維持、活性化することが知られている¹⁵。ゆえに、本研究での 1.0mM dbcAMP 添加により AFLS 形成率が増加した理由に、卵母細胞と卵丘細胞間のギャップ結合を介した物質交換を活性化させた事が考えられた。一方で、本実験では、8

日間の培養で AFLS 形成を認めた COCs から採取したほぼ全ての卵母細胞に GVBD 期への分化が認められ、その成熟分裂期に dbcAMP 添加による影響は無かった。高濃度の細胞内 cAMP は cAMP 依存性プロテインキナーゼ活性により卵母細胞の減数分裂休止を持続させる報告³⁰があるが、必ずしも核の休止や進行に関係している訳ではない報告もある¹⁹。本研究における培養 4 日目以降の AFLS 平均直径は、dbcAMP 添加の有無や濃度に関わらず次第に減少する傾向が認められた。COCs の 3 次元構造は、卵母細胞を取り巻き栄養供給する卵丘細胞に依存する¹²。ゆえに、培養中の AFLS の形態変化は、卵母細胞と顆粒層細胞のギャップ結合の消失に関係し、その結果、高率な減数分裂再開を認めたと考えられた。

また、本研究では、COCs 培養における hCG 添加は、100IU/ml では AFLS 形成率を下げ、その添加濃度に関わらず培養 4 日から 8 日目の AFLS 直径を減少させる事を示した。牛において卵母細胞と卵丘細胞の形態を維持した 3 次元培養系における FSH 添加は、顆粒層細胞の増殖を刺激し、その結果、AFLS 形成と卵母-卵丘細胞のギャップ結合を介した物質交換を促すことが報告されており³³、本研究でも牛 COCs 培養には FSH を含む TCM199 培養液を基礎にしている。一方で、マウスの初期胞状卵胞の培養において、FSH を含む培養条件下で LH 添加を行うと卵胞の発育に悪影響が出る事が知られている⁵⁰。また、Xu ら⁷⁷は、適切な発育段階前の初期胞状卵胞への LH 暴露は、卵胞内でのシグナル消失に繋がると報告している。本研究の結果も同様に、hCG 添加による卵母細胞と卵丘細胞のギャップ結合を介した物質交換を消失させた事が示唆された。

さらに、本研究では、培養4日後のAFLS形成した培養液中のE2およびP4濃度は、hCG添加濃度に影響されないが、hCG10IU/mL添加群において培養液中のAMH濃度の上昇が認められた。高濃度のE2は卵胞閉鎖を招き⁹、P4濃度の上昇は顆粒層細胞の黄体化に起因する。また、AMHは発育卵胞の顆粒層細胞内に局限する事が知られ⁴⁸、閉鎖卵胞内ではAMH濃度は顕著に減少し、プロゲステロン濃度と負の相関があるとされ、卵胞内のAMHの低下は黄体化に関係しているとされる⁴⁷。ゆえに、本研究結果は、AFLS内の顆粒層細胞増殖は培養4日目まで認め、hCG添加によるALFSの黄体化は起こっていない事が示唆された。

結論として、研究1では、黒毛和種RB牛におけるETは、産歴による受胎率の差は認められず、AIでは受胎しないRB牛の受胎性向上に貢献する事が示されたが、暑い季節は、経産牛の受胎率に影響する事が示唆された。さらに、研究2では、牛COCsのコラーゲン包埋による三次元培養法において、1.0mM dbcAMP添加はAFLS形成および平均直径に正の影響を与え、hCG添加はAFLS形成を阻害する事を示した。培養終了時の卵母細胞の核相は、GVBD期に分化し、dbcAMPやhCG添加が影響を与える事はなく、また、hCG添加による培養4日目までのAFLS内の顆粒層細胞の黄体化は認めない事が示唆された。以上のことから、黒毛和種RB牛の受胎性向上にAIに代わってETが貢献することが示され、牛COCsを用いた1.0mM dbcAMP添加培養は、卵胞発育モデルとなり得ることが考えられた。さらに、この卵胞発育モデルは、本研究のhCG添加の結果と共に、他のホルモン剤の添加効果の検証を重ねる事により、RB牛の原因追求に関する研究に役立つ事が期待される。

謝辞

本稿を終了するにあたり、各研究について終始暖かい激励とご指導、ご鞭撻を賜りました徳島大学生物資源産業学部 音井威重教授、山口大学共同獣医学部 高木光博教授に心より感謝申し上げます。

学位論文審査においては、貴重なご指導とご助言を頂いた鹿児島大学共同獣医学部 大和修教授、山口大学共同獣医学部 田浦保補教授、山本芳美教授、谷口雅康准教授に深謝致します。

また、本試験を進めるにあたり卵巣をご提供頂いた北九州食肉処理センターの皆様にく感謝いたします。

最後に、研究において試験牛の維持管理、実験室内外の諸作業にご尽力頂いた鹿児島県肉用牛改良研究所 磯部知弘先生、岡山県農業共済組合連合会 高岡亜沙子先生に感謝の意を表します。

参考文献

1. Abakushina, E. V., Morita, Y., Kaedei, Y., Tanihara, F., Namula, Z., Viet, V. L. and Otoi, T.(2011): Formation of an antral follicle-like structure of bovine cumulus–oocyte complexes embedded individually or in groups in collagen gels. *Reprod. Domest. Anim.*, 46, 423–427.
2. Abell, C. W. and Monahan, T. M. (1973): The role of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in the regulation of mammalian cell division. *J. Cell. Biol.*, 59, 549–558.
3. Alm, H., Katska-Ksiazkiewicz, L., Ryńska, B., and Tuchscherer, A. (2006): Survival and meiotic competence of bovine oocytes originating from early antral ovarian follicles. *Theriogenology*, 65, 1422-1434.
4. Ambrose, J. D., Drost, M., Monson, R. L., Rutledge, J. J., Leibfried-Rutledge, M. L., Thatcher, M. J., Kassa, T., Binelli, M., Hansen, P. J., Chenoweth, P. J., and Thatcher, W. W. (1999): Efficacy of timed embryo transfer with fresh and frozen in vitro produced embryos to increase pregnancy rates in heat-stressed dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 82, 2369-2376.
5. Anderson, E. and Albertini, D. F. (1976): Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *J. Cell. Biol.*, 71, 680–686.
6. Ayalon, N. (1978): A review of embryonic mortality in cattle. *J. Reprod. Fert.*, 54, 483-493.
7. Bagg MA, Nottle MB, Grupen CG, and Armstrong DT. (2006): Effect of dibutyryl cAMP on

- the cAMP content, meiotic progression, and developmental potential of in vitro matured pre-pubertal and adult pig oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 73, 1326-1332.
8. Baruselli, P. S., Ferreira, R. M., Sales, J. N., Gimenes, L. U., Sa Filho, M. F., Martins, C. M., Rodrigues, C. A., and Bo, G. A. (2011): Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. *Theriogenology*, 76, 1583-1593.
 9. Billig, H., Furuta, I. and Hsueh, A. J. (1993): Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology*, 133, 2204–2212.
 10. Boland, N.I., Humpherson, P.G., Leese, H.J., and Gosden, R.G., (1993): Pattern of lactate production and steroidogenesis during growth and maturation of mouse ovarian follicles in vitro. *Biol Reprod.*, 48, 798-806.
 11. Broadbent, P. J., Stewart, M., and Dolman, D. F. (1991): Recipient management and embryo transfer. *Theriogenology*, 35, 125-139.
 12. Brower, P. T., Gizang, E., Boreen, S. M. and Schultz, R. M. (1981): Biochemical studies of mammalian oogenesis: synthesis and stability of various classes of RNA during growth of the mouse oocyte in vitro. *Dev. Biol.*, 86, 373–383.
 13. Cain, L., Chatterjee, S. and Collins, T.J., (1995): In vitro folliculogenesis of rat preantral follicles. *Endocrinology*, 136, 3369-3377.
 14. Carroll, J., Whittingham, D. G. and Wood, M. J. (1991): Effect of dibutyryl cyclic adenosine monophosphate on granulosa cell proliferation, oocyte growth and meiotic maturation in

- isolated mouse primary ovarian follicles cultured in collagen gels. *J. Reprod. Fertil.*, 92, 197–207.
15. Carroll, J., Whittingham, D.G., and Wood, M.J. (1991): Growth in vitro and acquisition of meiotic competence after the cryopreservation of isolated mouse primary ovarian follicles. *Reprod. Fertil. Dev.*, 3, 593-599.
 16. Carroll, J., Whittingham, D.G., Wood, M.J., Telfer, E., and Gosden, RG. (1990): Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. *J. Reprod Fertil.*, 90, 321-327.
 17. Chebel, R. C., Demetrio, D. G., and Metzger, J. (2008): Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds. *Theriogenology*, 69, 98-106.
 18. Cortvrindt, R., Hu, Y. and Smitz, J. (1998): Recombinant luteinizing hormone as a survival and differentiation factor increases oocyte maturation in recombinant follicle stimulating hormone-supplemented mouse preantral follicle culture. *Hum. Reprod.*, 13, 1292–1302.
 19. Crosby, I. M., Moor, R. M., Heslop, J. P. and Osborn, J. C. (1985): cAMP in ovine oocytes: localization of synthesis and its action on protein synthesis, phosphorylation, and meiosis. *J. Exp. Zool.*, 234, 307–318.
 20. Dekel, N. (1988): Regulation of oocyte maturation. The role of cAMP. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 541, 211–216.
 21. Demeestere, I., Centner, J., Gervy, C., Englert, Y. and Delbaere, A. (2005): Impact of various

- endocrine and paracrine factors on in vitro culture of preantral follicles in rodents. *Reproduction*, 130, 147–156.
22. Dobson, H., Rankin, J.E., and Ward, W.R. (1977): Bovine cystic ovarian disease: plasma hormone concentrations and treatment. *Vet. Rec.*, 101, 459-461.
 23. Dochi, O., Takahashi, K., Hirai, T., Hayakawa, H., Tanisawa, M., Yamamoto, Y., and Koyama, H. (2008): The use of embryo transfer to produce pregnancies in repeat-breeding dairy cattle. *Theriogenology*, 69, 124-128.
 24. Downs, S. M., Coleman, D. L., Ward-Bailey, P. F. and Eppig, J. J. (1985): Hypoxanthine is the principal inhibitor of murine oocyte maturation in a low molecular weight fraction of porcine follicular fluid. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, 82, 454–458.
 25. Ealy, A. D., Drost, M., and Hansen, P. J. (1993): Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. *J. Dairy Sci.*, 76, 2899-2905.
 26. Elrod, C.C., and Butler, W.R. (1993): Reduction of fertility and alteration of uterine pH in heifers fed excess ruminally degradable protein. *J. Anim. Sci.*, 71, 694-701.
 27. Eppig, J.J. and Schroeder, A.C. (1989): Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization in vitro. *Biol Reprod.*, 41, 268-276.
 28. Evans, G., Dobias, M., King, G. J. and Armstrong, D. T. (1981): Estrogen, androgen, and progesterone biosynthesis by theca and granulosa of preovulatory follicles in the pig. *Biol.*

- Reprod., 25, 673–682.
29. Fauser, B. C. and Van Heusden, A. M. (1997): Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. *Endocr. Rev.*, 18, 71–106.
 30. Francis, S. H. and Corbin, J. D. (1994): Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *J. Rev. Physiol.* 56, 237–272.
 31. Graden, A.P., Durward Olds, Mochow C.R., and Mutter L.R. (1968): Causes of Fertilization Failure in Repeat Breeding Cattle. *J. Dairy. Sci.*, 51, 778-781.
 32. Gustafsson, H., and Emanuelson, U. (2002): Characterisation of the repeat breeding syndrome in Swedish dairy cattle. *Acta Vet. Scand.*, 43, 115-125.
 33. Harada, M., Miyano, T., Matsumura, K., Osaki, S., Miyake, M. and Kato, S. (1997): Bovine oocytes from early antral follicles grow to meiotic competence in vitro: effect of FSH and hypoxanthine. *Theriogenology*, 48, 743–755.
 34. Hartshorne, G. M., Sargent, I. L. and Barlow, D. H. (1994): Growth rates and antrum formation of mouse ovarian follicles in vitro in response to follicle-stimulating hormone, relaxin, cyclic AMP and hypoxanthine. *Hum. Reprod.*, 9, 1003–1012.
 35. Hasler, J. F. (2001): Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology*, 56, 1401-1415.
 36. Hirao, Y. (2012): Isolation of ovarian components essential for growth and development of mammalian oocytes in vitro. *J. Reprod. Dev.*, 58, 167–174.

37. Hirao, Y., Itoh, T., Shimizu, M., Iga, K., Aoyagi, K., Kobayashi, M., Kacchi, M., Hoshi, H., and Takenouchi, N. (2004): In vitro growth and development of bovine oocyte-granulosa cell complexes on the flat substratum: effects of high polyvinylpyrrolidone concentration in culture medium. *Biol Reprod.*, 70, 83-91.
38. Hirao, Y., Nagai, T., Kubo, M., Miyano, T., Miyake, M., and Kato, S. (1994): In vitro growth and maturation of pig oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 100, 333-339.
39. Isobe, T., Ikebata, Y., Onitsuka, T., Do, L. T., Sato, Y., Taniguchi, M., and Otoi, T. (2013): Cryopreservation for bovine embryos in serum-free freezing medium containing silk protein sericin. *Cryobiology*, 67, 184-187.
40. Kendall, N. R., Flint, A. P., and Mann, G. E. (2009): Incidence and treatment of inadequate postovulatory progesterone concentrations in repeat breeder cows. *Vet. J.*, 181, 158-162.
41. Kendrick, K. W., Bailey, T. L., Garst, A. S., Pryor, A. W., Ahmadzadeh, A., Akers, R. M., Eyestone, W. E., Pearson, R. E., and Gwazdauskas, F. C. (1999): Effects of energy balance of hormones, ovarian activity, and recovered oocytes in lactating Holstein cows using transvaginal follicular aspiration. *J. Dairy Sci.*, 82, 1731-1741.
42. Kharche, S. D., and Srivastava, S. K. (2007): Dose dependent effect of GnRH analogue on pregnancy rate of repeat breeder crossbred cows. *Anim. Reprod. Sci.*, 99, 196-201.
43. Kolena, J. and Channing, C. P. (1972): Stimulatory effects of LH, FSH and prostaglandins upon cyclic 3',5'-AMP levels in porcine granulosa cells. *Endocrinology*, 90, 1543-1550.

44. Laurenz, J. C., Byers, F. M., Schelling, G. T., and Greene, L. W. (1991): Effects of season on the maintenance requirements of mature beef cows. *J. Anim. Sci.*, 69, 2168-2176.
45. Miller, J.G. and Behrman, H.R. (1986): Oocyte maturation is inhibited by adenosine in the presence of follicle-stimulating hormone. *Biol. Reprod.*, 35, 833-837.
46. Miyano, T. (2005): JSAR Outstanding Research Award. In vitro growth of mammalian oocytes. *J. Reprod. Dev.*, 51, 169–176.
47. Monniaux, D., Clemente, N., Touze, J. L., Belville, C., Rico, C., Bontoux, M., Picard, J. Y. and Fabre, S. (2008): Intrafollicular steroids and anti-mullerian hormone during normal and cystic ovarian follicular development in the cow. *Biol. Reprod.*, 79, 387–396.
48. Monniaux, D., Drouilhet, L., Rico, C., Estienne, A., Jarrier, P., Touze, J. L., Sapa, J., Phocas, F., Dupont, J., Dalbies-Tran, R. and Fabre, S. (2013): Regulation of anti-Mullerian hormone production in domestic animals. *Reprod. Fertil. Dev.*, 25, 1–16.
49. Moss, N., Lean, I. J., Reid, S. W., and Hodgson, D. R. (2002): Risk factors for repeat-breeder syndrome in New South Wales dairy cows. *Prev. Vet. Med.*, 54, 91-103.
50. Murray, A. A., Swales, A. K., Smith, R. E., Molinek, M. D., Hillier, S. G. and Spears, N. (2008): Follicular growth and oocyte competence in the in vitro cultured mouse follicle: effects of gonadotrophins and steroids. *Mol. Hum. Reprod.*, 14, 75–83.
51. O'Farrell, K.J., Langley, O.H., Hartigan, P.J., and Sreenan, J.M.. (1983): Fertilisation and embryonic survival rates in dairy cows culled as repeat breeders. *Vet. Rec.*, 112, 95-97.

52. Payton, R.R., Romar, R., and Coy, P. Saxton AM, Lawrence JL, Edwards JL (2004): Susceptibility of bovine germinal vesicle-stage oocytes from antral follicles to direct effects of heat stress in vitro. *Biol. Reprod.*, 71, 1303-1308.
53. Perez-Marin, C. C., and Espana, F. (2007): Oestrus expression and ovarian function in repeat breeder cows, monitored by ultrasonography and progesterone assay. *Reprod. Domest. Anim.*, 42, 449-456.
54. Pincus, G. and Enzmann, E. V. (1935): The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro: I. The activation of ovarian eggs. *J. Exp. Med.*, 62, 665–675.
55. Rensis, F. D., and Scaramuzzi, R. J. (2003): Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow--a review. *Theriogenology*, 60, 1139-1151.
56. Rivera, R. M., and Hansen, P. J. (2001): Development of cultured bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range. *Reproduction*, 121, 107-115.
57. Robertson, I., and Nelson, R. E. (1998): Certification and identification of the embryo. In: Stringfellow DA, Seidel SM (eds), *Manual of the International Embryo Transfer Society*, 3rd edn, 103-134.
58. Rodgers, R. J., Irving-Rodgers, H. F. and Russell, D. L. (2003): Extracellular matrix of the developing ovarian follicle. *Reproduction*, 126, 415–424.
59. Roman-Ponce, H., Thatcher, W. W., Caton, D., Barron, D. H., and Wilcox, C. J. (1978): Thermal stress effects on uterine blood flow in dairy cows. *J. Anim. Sci.*, 46, 175-180.

60. Roth, Z. and Hansen, P. J. (2005): Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Reproduction*, 129, 235–244.
61. Roy, S.K. and Greenwald, G.S. (1985): An enzymatic method for dissociation of intact follicles from the hamster ovary: histological and quantitative aspects. *Biol Reprod.*, 32, 203-215.
62. Sartori, R., Sartor-Bergfelt, R., Mertens, S. A., Guenther, J. N., Parrish, J. J., and Wiltbank, M. C. (2002): Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J. Dairy Sci.*, 85, 2803-2812.
63. Sato, E., Ishibashi, T., and Iritani, A. (1982): Meiotic arresting substance separated from porcine ovarian granulosa cells and hypothetical arresting mechanism of meiosis. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 147, 161-173.
64. Schultz, R. M., Montgomery, R. R. and Belanoff, J. R. (1983): Regulation of mouse oocyte meiotic maturation: implication of a decrease in oocyte cAMP and protein dephosphorylation in commitment to resume meiosis. *Dev. Biol.*, 97, 264–273.
65. Shen, X., Miyano, T. and Kato, S. (1998): Promotion of follicular antrum formation by pig oocytes in vitro. *Zygote*, 6, 47–54.
66. Sirard, M.A. and First, N.L. (1988): In vitro inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. *Biol. Reprod.*, 39, 229-234.

67. Son, D. S., Choe, C. Y., Cho, S. R., Choi, S. H., Kim, H. J., Hur, T. Y., Jung, Y. G., Kang, H. G., and Kim, I. H. (2007): A CIDR-based timed embryo transfer protocol increases the pregnancy rate of lactating repeat breeder dairy cows. *J. Reprod. Dev.*, 53, 1313-1318.
68. Spears, N., Murray, A. A., Allison, V., Boland, N. I. and Gosden, R. G. (1998): Role of gonadotrophins and ovarian steroids in the development of mouse follicles in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, 113, 19–26.
69. Swanson, L. V., and Young, A. J. (1990): Failure of gonadotropin-releasing hormone or human chorionic gonadotropin to enhance the fertility of repeat-breeder cows when administered at the time of insemination. *Theriogenology*, 34, 955-963.
70. Tanabe, T. Y., Hawk, H. W., and Hasler, J. F. (1985): Comparative fertility of normal and repeat-breeding cows as embryo recipients. *Theriogenology*, 23, 687-696.
71. Tanghe, S., Van Soom, A., Nauwynck, H., Coryn, M. and de Kruif, A. (2002): Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol. Reprod. Dev.*, 61, 414–424.
72. Telfer, E.E. (1998): In vitro models for oocyte development. *Theriogenology*, 49, 451-460.
73. Torres, A., Chagas, e., Silva, J., Deloche, M.C., Humblot, P., Horta, A.E., and Lopes-da-Costa, L. (2013): Secondary corpora lutea induced by HCG treatment enhanced demi-embryo survival in lactating high-yielding dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.*, 48, 643-650.

74. Tsafiriri, A. and Channing, C.P. (1975): An inhibitory influence of granulosa cells and follicular fluid upon porcine oocyte meiosis in vitro. *Endocrinology*, 96, 922-927.
75. Vasconcelos, J. L., Demetrio, D. G., Santos, R. M., Chiari, J. R., Rodrigues, C. A., and Sa Filho, O. G. (2006): Factors potentially affecting fertility of lactating dairy cow recipients. *Theriogenology*, 65, 192-200.
76. Wandji, S.A., Eppig, J.J., and Fortune, J.E. (1996): FSH and growth factors affect the growth and endocrine function in vitro of granulosa cells of bovine preantral follicles. *Theriogenology*, 45, 817-832.
77. Xu, M., West-Farrell, E. R., Stouffer, R. L., Shea, L. D., Woodruff, T. K. and Zelinski, M. B. (2009): Encapsulated three-dimensional culture supports development of nonhuman primate secondary follicles. *Biol. Reprod.*, 81, 587-594.
78. Yamamoto, K., Otoi, T., Koyama, N., Horikita, N., Tachikawa, S., and Miyano, T. (1999): Development to live young from bovine small oocytes after growth, maturation and fertilization in vitro. *Theriogenology*, 52, 81-89.
79. Yavas, Y., Johnson, W.H., and Walton, J.S. (1999): Modification of follicular dynamics by exogenous FSH and progesterone, and the induction of ovulation using hCG in postpartum beef cows. *Theriogenology*, 52, 949-963.

图表

表 1. 黒毛和種リピートブリーダー牛への受精卵移植後の受胎率、流産率、死産率、正常分娩率における産歴の影響

産歴	移植頭数	受胎頭数(%)	受胎後成績頭数(%)		
			流産	死産	正常分娩
未経産	155	51 (32.9)	4 (7.8)	0 (0)	47 (92.2)
経産	172	53 (30.8)	3 (5.7)	1 (2.0)	49 (92.5)

受胎率は受胎頭数/移植頭数、流産率は流産頭数/受胎頭数、死産率は死産頭数/(受胎頭数 - 流産頭数)、正常分娩率は正常分娩頭数/受胎頭数で算出し、百分比で示した。

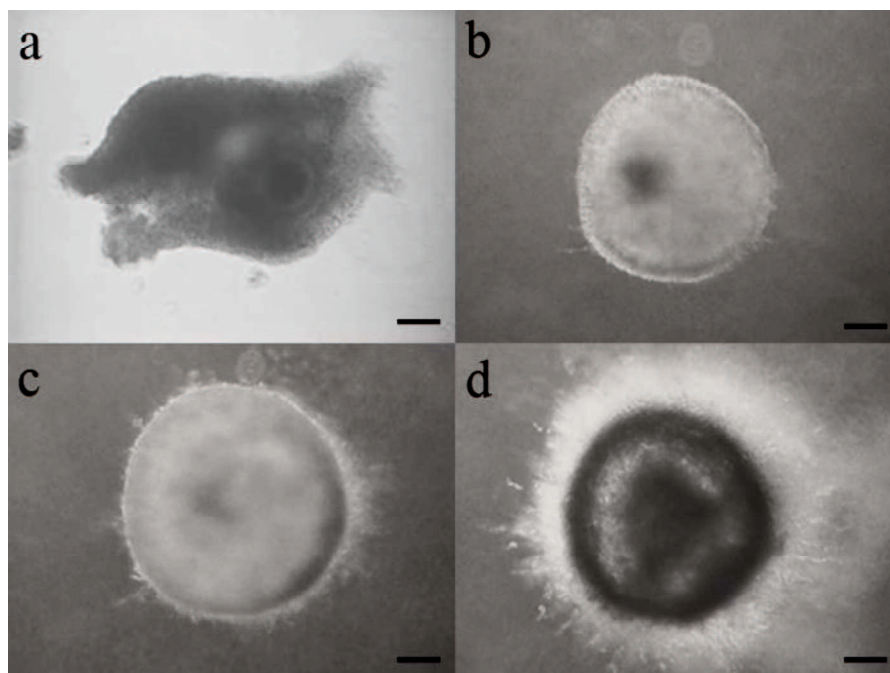
表 2. 黒毛和種リピートブリーダー牛への受精卵移植後の受胎率における季節の影響

産歴	季節ごとの受胎率 (妊娠頭数 / 移植頭数)			
	春	夏	秋	冬
未經産	44.7 (17/38)	32.1 (9/28)	27.0 (10/37)	28.8 (15/52)
経産	42.6 (23/54) ^a	17.1 (12/70) ^b	34.6 (9/26) ^{a,b}	40.9 (9/22) ^a
計	43.5 (40/92) ^a	21.4 (21/98) ^b	30.2 (19/63) ^{a,b}	32.4 (24/74) ^{a,b}

受精卵移植を行った時期は、それぞれ、春で3月から5月、夏で6月から8月、秋で9月から11月、冬で12月から2月であった。

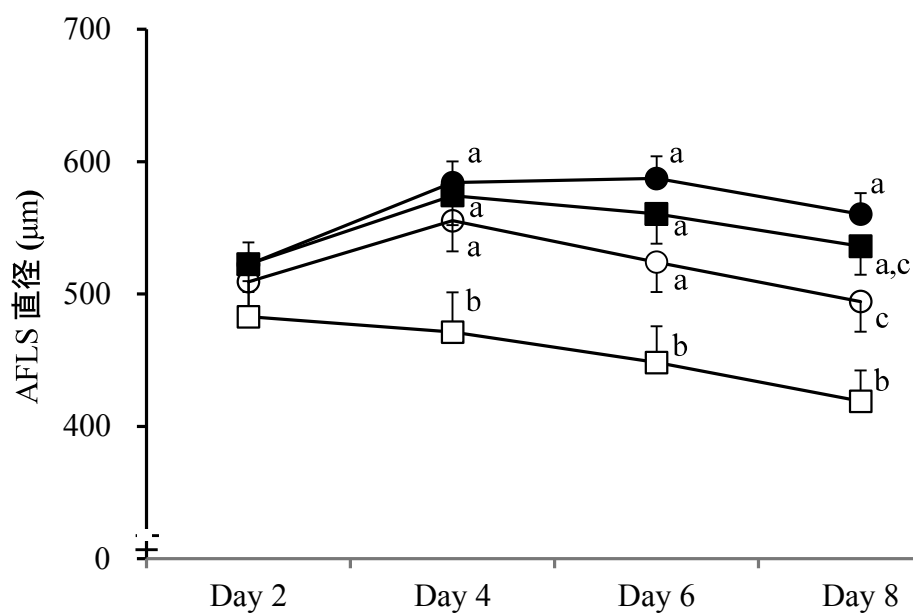
同行異符号(ab)間で有意差あり(P<0.05)。

図 1. ウシ卵丘卵母細胞複合体(COCs)からの卵胞様形態(AFLS)の形成過程



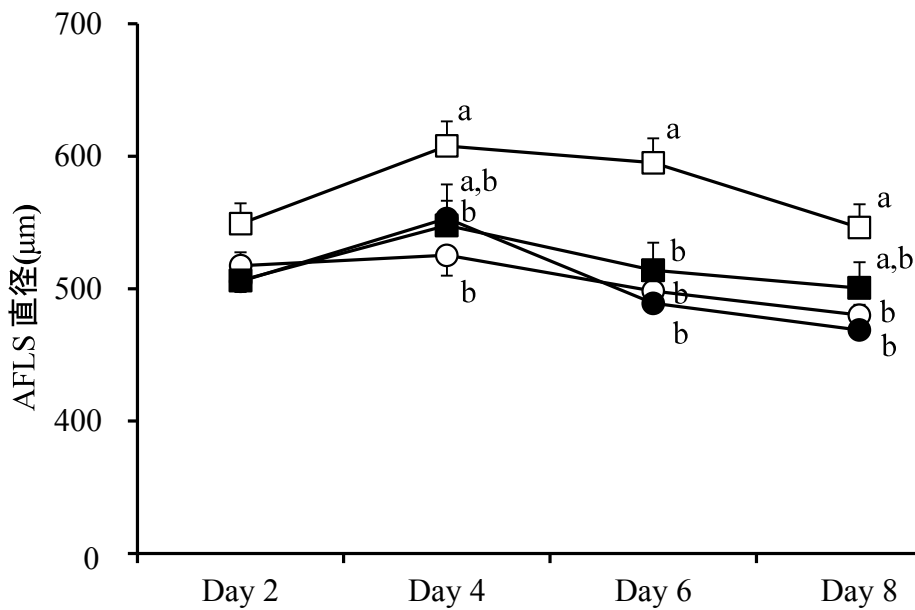
(a)ウシ卵丘卵母細胞複合体(培養0日目)(b)培養2日目(c)培養4日目(d)培養8日目。棒線幅は100 μ m。

図 2. dbcAMP 添加 COCs 培養時の卵胞様形態(AFLS)直径サイズ



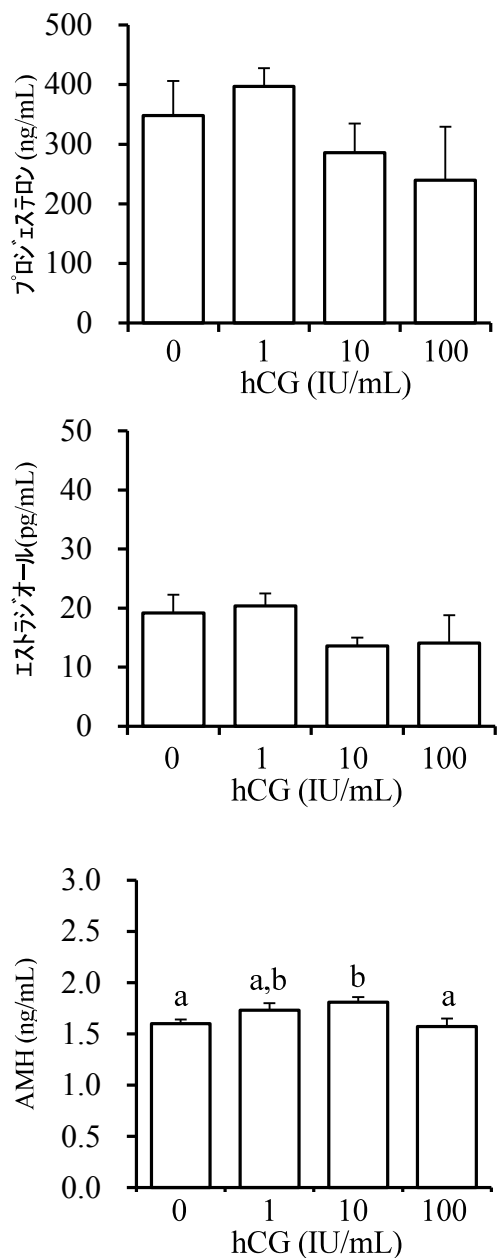
培養液中に添加した dbcAMP 濃度は、0mM(□)、0.5mM(○)、1.0mM(■)、2mM(●)。
それぞれの線グラフは、平均±標準誤差を表示した。
各培養日数の同列異符号(abc)間で、有意差あり(P<0.05)。

図 3. hCG 添加 COCs 培養時の卵胞様形態(AFLS)直径サイズ



培養液中に添加した hCG 濃度は、0IU/mL(□)、1IU/mL(○)、10 IU/mL(■)、100 IU/mL(●)。
それぞれの線グラフは、平均±標準誤差を表示した。
各培養日数の同列異符号(ab)間で、有意差あり(P<0.05)。

図 4. hCG 添加培養時の卵胞様形態(AFLS)形成群における培養液中のプロジェステロン、エストラジオール、AMH 濃度



培養液中に添加した hCG 濃度は、0IU/mL、1IU/mL、10 IU/mL、100 IU/mL。それぞれの棒グラフは、平均±標準誤差を表示した。同列異符号(ab)間で、有意差あり(P<0.05)。

表 3. dbcAMP 添加卵丘卵母細胞複合体(COCs)培養時の卵胞様形態(AFLS)形成割合と卵母細胞の核ステージ

dbcAMP 濃度 (mM)	培養 COCs 数	AFLS 数(%)	評価した 卵母細胞数	核ステージごとの卵母細胞数 (%)					
				GV	GVBD	MI	AT	MII	Deg
0	53	21 (41.3 ± 6.8) ^a	21	2 (9.5)	6 (28.6)	6 (28.6)	1 (4.8)	0 (0)	6 (28.6)
0.5	50	21 (41.0 ± 3.1) ^a	19	0 (0)	6 (31.6)	4 (21.1)	0 (0)	2 (10.5)	7 (36.8)
1.0	56	31 (61.7 ± 8.3) ^b	30	1 (3.3)	8 (26.7)	7 (23.3)	2 (6.7)	0 (0)	12 (40.0)
2.0	54	28 (52.9 ± 4.1) ^{a, b}	27	0 (0)	8 (29.6)	4 (14.8)	1 (3.7)	3 (11.1)	11 (40.7)

培養実験は 7 から 9 回繰り返した COCs 培養 8 日後の AFLS 形成数を示しており、割合は平均±標準誤差でを示した。核ステージの評価は、培養終了時の AFLS から回収した卵母細胞を用いて行った。核ステージの略語は以下の通り、GV; 卵核胞、GVBD; 卵核胞の崩壊、MI; 減数第一分裂中期、AT; 減数第一分裂後期から第一分裂終期、MII; 減数第二分裂中期、Deg; 退行。同列異符号(ab)間で有意差あり(P<0.05)。

表 4. hCG 添加卵丘卵母細胞複合体(COCs)培養時の卵胞様形態(AFLS)形成割合と卵母細胞の核ステージ

hCG 濃度 (IU/mL)	培養 COCs 数	AFLS 数(%)	評価した 卵母細胞数	核ステージごとの卵母細胞数 (%)					
				GV	GVBD	MI	AT	MII	Deg
0	53	29 (56.6 ± 5.1) ^a	29	2 (6.9)	11 (37.9)	2 (6.9)	0 (0)	1 (3.4)	13 (44.8)
1	52	25 (50.9 ± 6.3) ^a	25	0 (0)	13 (52.0)	3 (12.0)	2 (8.0)	1 (4.0)	6 (24.0)
10	50	22 (49.3 ± 5.2) ^a	22	0 (0)	8 (36.4)	2 (9.1)	1 (4.5)	0 (0)	11(50.0)
100	54	14 (25.4 ± 7.5) ^b	14	1 (7.1)	3 (21.4)	2 (14.3)	1 (7.1)	0 (0)	7 (50.0)

培養実験は 5 から 6 回繰り返した COCs 培養 8 日後の AFLS 形成数を示しており、割合は平均±標準誤差で示した。
核ステージの評価は、培養終了時の AFLS から回収した卵母細胞を用いて行った。核ステージの略語は以下の通り、GV; 卵核胞、GVBD; 卵核胞の崩壊、MI; 減数第一分裂中期、AT; 減数第一分裂後期から第一分裂終期、MII; 減数第二分裂中期、Deg; 退行。
同列異符号(ab)間で有意差あり(P<0.05)