

ウシおよびブタにおける未成熟卵母細胞からの
効率的な雌胚作出に関する研究

**Studies on production of female embryos from
immature oocytes in cow and pig**

山口大学大学院連合獣医学研究科

森田 康広

2016年 9月

目次

第 1 章

緒論

1.1 研究の背景	5
1.1.1 性制御について	5
1.1.2 減数分裂について	6
1.1.3 卵母細胞の成熟培養について	7
1.1.4 単為発生について	9
1.2 研究の目的	11

第 2 章

黒毛和種牛における授精タイミングが性比に与える影響

2.1 緒言	13
2.2 材料と方法	14
2.3 統計解析	14
2.4 結果と考察	15

第3章

牛におけるフラグミン・プロタミン微小粒子を用いた 卵丘卵母細胞複合体からの卵胞様構造物の作出

3.1 緒言	18
3.2 材料と方法	18
3.4 統計解析	19
3.5 結果と考察	20

第4章

ブタ卵母細胞の単為発生に及ぼす成熟培養時における Ca-EDTA 暴露時間の検討

4.1 緒言	23
4.2 材料と方法	24
4.2.1 卵母細胞の採材と体外成熟培養(IVM)	24
4.2.2 胚培養	25
4.2.3 核の品質評価	26
4.2.4 胚発育の評価	26
4.2.5 試験区	27
4.3 統計解析	27
4.4 結果	28
4.4.1 試験区1の結果	28
4.4.2 試験区2の結果	28
4.5 考察	29

第 5 章

考察 32

第 6 章

要約 38

謝辞 42

引用文献 43

図表 57

第 1 章

緒論

1.1 研究の背景

1.1.1 性制御

これまでに、人工授精の段階から性をコントロールしようという考え方から XY それぞれの精子を分別するという方法が試みられている。XY それぞれの精子の DNA 含量が数%~10%異なることを利用して、DNA 染色後レーザー光を照射して濃度を測定することにより性判別する方法（フローサイトメトリー法）であり、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウマ、チンチラなどの精子では判別が可能である。しかし、ヒトでは XY 精子の DNA 含量差が 2~3%しかなく判別が不可能である。

Johnson と Welch [1]は 8 種の動物種について精子の DNA 濃度差を測定しており、正しく判別される精子数は全体の 10%（35,000 個）程度であったが、最近では分別効率が飛躍的に改善されてウシの人工授精（子宮角内）ができるまでになってきている。Seidel ら[2]は、性判別精子を使った人工授精を実施して 95%と高い性判別率を得ている。しかし、妊娠率は性判別をした精子の方が非判別の精子に比較して約 10%程度低い。この原因として、性判別の過程で精子に高電圧がかかることから、性判別精子の運動性が低下することによるとされている。

つぎに受精胚での性判別については、初期胚の割球の一部から PCR 法により Y 染色体の有無を調べ性を判別する方法がある。この原理は DNA 診断によるものであり[3]、Y 染色体に由来する DNA を数 10 万~100 万倍にも増幅し、試料中の DNA が雄（Y 染色体）に由来するかどうかを判別する。ウシの場合、受精 6~7 日目の胚盤胞（約 100 細胞にまで発育した胚）を 2 分断した片方、または

胚の一部（栄養膜細胞）から切りとった数個の細胞を試料とする。これらの核から DNA を抽出し、雌雄共通の遺伝子配列と、Y 染色体特異の遺伝子配列の有無を調べる。性を判別した後で、胚を移植して目的とする産子が得られる。以上のような産子の性制御の方法があるが、精子、受精胚とも経費がかかり、高額な機器を備えた施設を必要とする。一方、授精のタイミングによって得られる産子の性比が変わる可能性が示唆されており、10%でも性の偏りがあれば畜産物の生産において簡便であり有益である。授精のタイミングによる性比への影響についてはさまざまな調査、研究が行われてきたが、多くの要因が産子の性比に影響を与えていると考えられ、報告ごとで結果が異なっている[4,5]。

1.1.2 減数分裂

減数分裂は一般に2回の連続した有糸分裂からなり、染色体数は半減する。染色体数の半減化の過程で相同染色体が対合し、それに伴って交叉が起きるが、2娘染色体が動原体部で付着し分離しないことなど、体細胞分裂とは異なる分裂様式が観察される。一般に原始生殖細胞は、さかんに細胞分裂をくり返して数を増す。この増殖期の細胞を卵原細胞とよぶが、哺乳類において卵原細胞は胎子期の後半あるいは出生直後に細胞分裂をやめて減数分裂を開始し、卵母細胞とよばれるようになる。減数分裂の前期(prophase)において染色体は一連の特有な変化を示し、細糸期(leptotene)、接合糸期(zygotene)、太糸期(pachytene)を経て複糸期(diplotene)に達すると、染色体の変化は先に進むことなく休止する。その後、卵母細胞は発育を開始するとともに卵核胞(germinal vesicle;GV)をもつ卵母細胞特有の構造へと分化する。成熟卵胞内にある発育を終えた卵母細胞は、時期が来ると脳下垂体から放出される性腺刺激ホルモンのゴナドトロピン

(gonadotropin)に反応して減数分裂を再開する。減数分裂の再開は形態学的には光学顕微鏡下での染色体の凝縮や卵核胞の消失(卵核胞崩壊;germinal vesicle breakdown;GVBD)として観察され、第1減数分裂中期(metaphaseI)、後期(anaphaseI)、終期(telophaseI)を経て第1極体を放出し、第2減数分裂中期(metaphase II)へ達して染色体の動きは再び休止する[6]。また、第2減数分裂は受精時の精子侵入の刺激により再開し、第2極体を放出して減数分裂は完了する。

1.1.3 卵母細胞の成熟培養

哺乳類の雌では、性周期の間に1度だけ決まった数の卵母細胞が卵巣内で成熟し、卵管へと排卵される。一生に排卵される成熟卵の総数は動物の性周期の長さや生殖可能な期間を考えればそれほど多くはないが、哺乳類の卵巣内にはブタでは約6万個、ウシで約12万個、ヒトでは30万個あまりの卵母細胞が存在している。原始卵胞の卵母細胞の直径は、ウシ、ブタおよびヒトで約30 μm 、マウスやハムスターでは約20 μm である。これらの卵母細胞は動物の生涯を通して次々と発育を開始していき、動物が受精、妊娠、哺乳などの一連の生殖活動が可能で排卵が起こる性成熟に達する頃までに、いくつかのものは最終的な大きさにまで発育する。この卵母細胞の大きさはウシ、ブタおよびヒトでは約120 μm であり、マウスやハムスターでは約75 μm である。性成熟に到達後、性周期が開始すると、性周期毎に発育を完了した卵母細胞が順に成熟して排卵されることになる。しかし、一回の性周期で発育過程に入る原始卵胞の多くが途中で発育を停止し、最終的にはひとつの卵胞しか残らず、その卵胞のみから卵母細胞が排卵する。ヒトでは約90%[7]、ウシでは約95%[8]、そしてブタ

では約 60%[9]の卵胞が発育を停止し、実際に排卵するのは卵巣全体の 0.1%未満である。つまり、発育停止し閉鎖する予定の卵胞由来の卵母細胞を用いることができれば体外受精に利用できる卵母細胞数は飛躍的に増加することになる。しかし、3mm 以下の発育初期の小さな卵胞内の卵母細胞は減数分裂の遂行能力や受精、発生の能力を獲得していないため体外で培養しても利用できない[10,11]。受精、発生能力をもった成熟卵を体外培養で得るためには、これらの小さな卵母細胞を何らかの方法で最終的な大きさへと発育させる必要がある。

1996 年にジャクソン研究所の Eppig ら [12] は、卵巣の器官培養法と卵母細胞—顆粒膜細胞複合体培養法を組み合わせることでマウス卵巣内の原始卵胞中の直径約 20 μm の卵母細胞を体外で最終の大きさへと発育させ、体外成熟、体外受精させたのち、雌のマウスに移植して産仔を得ることに成功した。マウス以外の動物種では、原始卵胞中の卵母細胞を体外培養によって最終の大きさにまで発育させて産仔を得たとの報告はなく、大型の哺乳類では発育のやや進んだ卵母細胞を最終の大きさへと発育させた報告として、ブタ（直径約 80 μm ）[13]ウシ（直径 90~99 μm ）[14]およびヒツジ（直径約 80 μm ）[15]での報告があるにすぎない。Yamamoto ら[16]は直径約 0.5 mm の初期の胞状卵胞から取り出した卵母細胞（直径 90~99 μm ）を体外で 2 週間培養し、発育させ、その後体外成熟、体外受精を行い子牛を出産させることに成功している。しかし、効率が悪く約 300 個の卵母細胞を培養しても発育したものは 100 個程度であり、体外成熟、体外受精後に胚盤胞へと発生した胚はこのうちの 6 個であった。生体内ではウシ原始卵胞中の卵母細胞は卵巣内で数ヶ月間かけて徐々に発育することから、ウシ卵母細胞を体外で発育させるには卵胞や卵母細胞の生存性を維持できる長期培養法が必要であると考えられる。

培養方法の一つに卵母細胞を三次元的に顆粒膜細胞とともに培養すると発育

能や受精能の向上がみられたというものがある[12]。それは卵母細胞への栄養の供給は生体内では顆粒膜細胞から行われるからで [17]、栄養の供給は卵母細胞と顆粒膜細胞間のギャップジャンクション結合に依っていることが知られており [18, 19]、顆粒膜細胞を物理的に剥離した場合や [20]、ギャップジャンクション結合を解離させた結果 [21] から顆粒膜細胞との結合は卵母細胞の減数分裂の休止に大きく関わっていると考えられている。放線冠細胞とも呼ばれる第 1 層目の卵丘細胞は透明帯を貫通し、卵母細胞に結合しているが [22]、この結合により卵丘卵母細胞複合体(COCs)を形成していることから、顆粒膜細胞と卵母細胞の相互作用は卵母細胞や卵胞の通常の成長や発育にとって重要であり、その相互作用は傍分泌作用を介して行われている。最適な培養系を確立するには、成熟した卵母細胞が減数分裂の再開能を維持することが必須で [23]、成熟には顆粒膜細胞が大きな役割を持っている [24] ことから、卵胞の成長と顆粒膜細胞の関係、その卵胞内の卵母細胞の減数分裂ステージ、さらに生体内での関連性についての理解が必要である。一方、卵母細胞の成熟、発育培養の最適な方法の一つとして、顆粒膜細胞を三次元的に培養するために、培養したい組織をコラーゲンや寒天ゲルに包埋するという方法が報告されている [25, 26]。一般的にコラーゲンを使用すると COCs から形成した卵胞様構造物から顆粒膜細胞が遊離することを阻止することができ、培養期間を通して三次元構造体の中で顆粒膜細胞の細胞膜と基底膜が保存される。

1.1.4 単為発生について

卵母細胞が受精することなしに単独に発生することを単為発生 (parthenogenesis) とよび、自然界では鳥や爬虫類を含む多くの脊椎動物でみら

れる生殖形態であるが、哺乳類ではみられない。仮に人工的に起こしたとしても正常に発育せず死滅する。たとえばマウスの未受精卵を人為的に刺激し、細胞分裂阻害剤で第二極体の放出を阻害して二倍体の単為発生胚をつくることができるが、これはすべて妊娠中期までに発生停止することが知られている[27]。人工的に卵母細胞の活性化を起こすものとしてはエタノール[28, 29]、カルシウムイオノフォア A23187[30]、イオノマイシン[31]、電気穿孔法[32]、塩化カルシウム (CaCl₂) [33]、タンパク質キナーゼ抑制剤[34]、グアニンヌクレオチド結合タンパク質Gタンパク質[33]、タンパク質合成阻害剤シクロヘキシミド[34]、ストロンチウムとバリウムイオン[36]、擬似受精 [37]がある。これらの試薬は通常精子刺激の代わり[39]となって単為発生を誘導している。この技術は胚性幹細胞、核移植クローンの作成やドナー核の再プログラミングに重要であり、畜産分野においてはウシやブタでの妊娠維持に利用されている[38]。

ブタにおいては妊娠初期にある程度の胚が子宮内に存在しなければ妊娠が継続されないことなどから、正常発生胚との同時移植を行うことにより妊娠の維持、子豚の生産に利用するという研究が行われている。これは、電気刺激により作成した単為発生胚を体外作成した受精胚と同時移植すると正常な子豚が得られる[40]というものであり、単為発生胚は通常 30 日齢で死滅し、通常胚の定着や妊娠維持を補助すると説明されている。

1.2 研究の目的

ウシやブタなどの雌飼養が重要な家畜において、雌胚および雌産子の効率的な獲得は農家経営の安定や優良な遺伝形質の保存のために重要である。

研究1では人工授精時期による性制御への精子、卵母細胞の関与を明らかにするために、搾乳の影響がない黒毛和種牛の同一飼養の一群において発情観察から授精までの時間により区分した2群で試験を行った。研究2では受精の詳細な解明には卵母細胞の発育過程、卵胞の発育過程のさらなる理解が必要であり、また効率的な成熟卵母細胞の作出の観点から卵母細胞の成熟培養技術の向上が必須であることから、ウシ卵母細胞の三次元培養法に焦点を当て検討を行った。研究3では雌飼養の価値が高いウシ、ブタにおいて雌胚作出方法の一つであり、妊娠維持に利用される単為発生胚の効率的な作出技術の確立のためにブタ卵母細胞を用いた試験を行った。

第2章

黒毛和種牛における授精タイミングが 性比に与える影響

2.1 緒言

授精のタイミングによって得られる産子の性比が変われば、子牛生産において利用価値の高いものとなる。授精のタイミングによる性比への影響についてはさまざまな調査、研究が行われてきた[4, 5]。いくつかの研究では発情開始から早い時期での授精によって雌の産子が多く得られ、逆に遅い時期の授精では雄の産子が多いとの報告があり、精子の受精能の獲得時期の違いやX精子、Y精子の子宮内での運動性の違いによるとの報告がある [4, 41]。また、他の研究では授精時期による性比の違いが別の原因で起こると報告しており、その例として遺伝子型や地理的な相違、精液の品質、産暦、分娩後日数、品種などが示されている[4, 5, 42]。

一方、Pursley ら[43]は早い時期でも遅い時期のどちらの授精時期でも雌産子が多く得られたと報告している。また、乳牛について行われた大規模な検討において産次や牛群、授精の時期は性比と関係がなかったとする報告もある[42]。

これら報告では多くの要因が産子の性比に影響を与えていると考えられるが、互いに結果が矛盾しているためにウシにおいて性比に影響を与えている要因が何であるか解りにくくなっている。そこで、本研究ではひとつの牛群からデータを収集し黒毛和種牛において授精時期が性比に与える影響を検討した。

2.2 材料と方法

繁殖黒毛和牛 350 頭飼育の 1 牧場において約 2 年半調査を行った（2011 年から 2013 年）。調査牛の産次は初産から 8 産までであった。オガクズを使用したフリーバンの牛舎内にて日本飼養標準に沿った飼養管理を行っていた [44]。人工授精については調査期間中に種雄牛 25 頭の凍結精液を使用した。発情観察時間は午前 11 時から 11 時半であり、発情観察から 3 時間後の授精直前に直腸検査にて主席卵胞の状態を確認した。主席卵胞の発育を判断し、主席卵胞が十分大きく、排卵が見込める個体はそのまま人工授精を行い(Early 群)。一方、主席卵胞が小さく排卵が遅れると判断した個体は翌日に授精を延期した (Late 群)。また、主席卵胞が十分に発育しなかった個体や排卵しなかった個体、排卵後の個体は試験から除外した。発情観察、直腸検査、授精はすべて一人の熟練者が行い、調査個体は授精前後にホルモン処置は行わなかった。排卵確認は授精後 24 時間で直腸検査にて行った。

2.3 統計解析

調査に用いた人工授精頭数は総数 1,829 頭であり産子数は 753 頭であった。出生率、雄子牛率について発情観察から 3 時間後に授精を行った群 (Early 群)、発情観察から 27 時間後に授精を行った群(Late 群) の 2 群に区分し比較した。統計解析は分散分析法により行った (SAS for Windows, version 9.1, SAS Institute Japan, Tokyo, Japan)。解析項目として授精方法、授精季節、種雄牛、授精タイミングを使用し双方向での影響を検討した。

2.4 結果と考察

表 1 は Early 群と Late 群について授精回数と分娩率と雄子牛の数を示している。分娩率、雄子牛の頭数について、授精のタイミングと季節、種雄牛間では相互に有意な差が見られなかった。また 2 群間で分娩率に差はなかった。しかし、Early 群では Late 群に比較し有意に雄子牛の出生が多かった (56.9% vs 41.1%、 $p<0.05$)。

発情兆候やマウンティング行動、膣内粘液の電気抵抗を観察し授精タイミングを計ることによって産子の性比を評価しようという研究は数多く行われている[4, 5, 45]。発情からの授精タイミングを変えることで得られる産子の性比をコントロールできるなら低費用であり有益である。授精タイミングによる性比の比率の変化は X 精子と Y 精子の運動性や受精能の獲得時期、生存性の違いから生じると考えられている[4,41]。ウシでは一般的に発情が 18 時間継続し 10-12 時間で排卵が起こる。つまり発情開始から 30-32 時間後に排卵が起こる[46,47]。遅いタイミングでの授精では受胎率が低下するため、最適な授精タイミングはスタンディング発情から 4-12 時間と報告されている[48]。本研究では Early 群と Late 群で分娩率に差はなかったが、既報にくらべ分娩率は低かった[49]。今回の研究では遅いタイミングの授精のほうが雄子牛の出生が少なかった。一方、我々の結果と反対に、早いタイミングの授精では雌の産子が多く、遅いタイミングの授精では雄の産子が多いとする報告もある[46]。一方、早いタイミングも遅いタイミング両方とも雌の産子が多いとの既報もある[43]。Rorie ら[5]は排卵から約 20-10 時間前の授精は産子の性比に影響しないと報告している。今回、直腸検査にて卵胞の状態が良くなく、排卵が遅延しそうな個体は授精を翌日に延期し、発情観察から 27 時間後に授精した。しかし 2 群とも授精から 24 時間後には排

卵していた。つまり、Early 群では発情開始から 3-27 時間後には排卵が完了し、Late 群では排卵まで発情開始から 27-51 時間かかっていることになる。すなわち Late 群では発情持続時間が長く排卵が遅延していたと考えられる。ヒトでは Martin ら[47]は卵胞期が短くなると頸管粘液の精子通過可能となる期間が短くなり、運動性の高い Y 精子がより多く子宮にたどり着くと報告している。逆に卵胞期が長くなると通過可能期間が延長し X 精子も多く通過するため、Y 精子が子宮にたどり着きにくくなる。これと同じようなことがウシでも起こっていると考えられる。多くの研究で結果が異なる理由には発情観察や授精方法、種雄牛、精子の品質などの方法論的な問題に起因すると考えられた[46]。

結論として、今回の研究では発情持続時間が長く、遅い人工授精は雌産子が多く得られる方向に傾くということが示された。

第3章

牛におけるフラグミン・プロタミン微小粒子を用いた
卵丘卵母細胞複合体からの卵胞様構造物の作出

3.1 緒言

発育途上の卵母細胞における *in vitro* での培養は、成熟卵子の多量確保というだけでなく、卵胞の成長や卵子成熟のメカニズム解明のためのモデルとしても重要である。三次元培養法はラット[50]や牛[51]や豚[52]のモデルにおいて発育途上の型卵母細胞の成長を促すことが示されている。一方、一般的にコラーゲンゲル基質の使用は卵母細胞からの卵丘細胞の遊離を防ぎ、卵胞の球形構造を支えることが知られている[53]。また、フラグミン・プロタミン微小粒子(F/PMPs)は成長因子の放出制御や維持、細胞粘度や粘着性を保つホルモン輸送体として使われている[54, 55]。

本研究ではフラグミン・プロタミン微小粒子のコラーゲンゲルにおける卵胞様構造物(AFLS)作成でのホルモン輸送体としての効果と卵母細胞発育促進効果を検討した。

3.2 材料と方法

F/PMPs の調整は Nakamura ら[56]が行った方法によって行った。0.3ml のプロタミン溶液 (Mochida Pharmaceutical Co.) を 0.7ml のフラグミン溶液 (Kissei Pharmaceutical Co.) に滴下し、その溶液をボルテックスにかけ微粒子を作成した。F/PMPs 溶液は 1ml のリン酸緩衝生理食塩水(PBS, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) で再混濁し洗浄した。

顆粒膜が付着した卵丘卵母細胞複合体(OCCGs)は直径 0.5mm から 0.7mm の卵胞から分離した(図 1, a)。内部に直径 85 μ M から 97 μ M の卵母細胞が存在する

OCCGsを既報[57]に従いコラーゲンゲルに包埋した。包埋したOCCGsを600 μ Lの発育培地(TCMI99 培地に25mM HEPES 緩衝液を使用し、10%牛胎児血清(FBS)、50 mg/mL ゲンタマイシン、4mM ヒポキサンチンを添加)で38.5°C、5%CO₂の気相条件下で8日間培養した。

F/PMPsと卵胞刺激ホルモン(FSH) (kawasaki seiyaku)の添加による効果をAFLSの形成(図1, bとc)と卵母細胞の成長において評価するために、OCCGsを包埋するコラーゲンゲルに10%(v/v)F/PMPsを添加した群(MPs群)、0.1AU/mlのFSHを添加した群(FSH群)、10%F/PMPsと1.0AU/mlのFSHを添加した群(MPs/FSH群)に区分した。対照区として、OCCGsを包埋するコラーゲンゲルに10%FBSのみを添加した群を用いた。

AFLSの直径を培養開始から4、8日目に計測した。AFLS内の卵母細胞直径は培養開始前と8日目に計測した。卵母細胞の核相はAbakushina ら[58]のDNA-binding fluorochrome bisbenzimidazole (Hoechst 33342)を用いて解析した。

3.3 統計解析

AFLSの形成率、直径、卵母細胞の直径はそれぞれ分散分析後にフィッシャーのPLSD(protected least significant difference)法を用いて比較した。有意水準を0.05以下とした。

3.4 結果と考察

発育培養4日目ではMPs/FSH群が他の群に比較しAFLS形成率が高い傾向($p<0.1$)がみられた(図 2)。培養4日目と8日目ではMPs/FSH群が対照群に比較し有意($p<0.05$)にAFLS直径が大きくなっていた(図 3)。培養8日目ではAFLSを形成した卵母細胞の直径が $91.4\pm 0.5\mu\text{m}$ から $116.2\pm 1.3\mu\text{m}$ に大きくなっていたが、成長サイズは $23.7\mu\text{m}$ から $28.2\mu\text{m}$ と群間で有意な差はなかった。また、50%以上の卵母細胞で減数分裂が再開していたが、どの卵母細胞も第二減数分裂中期(M II期)には達していなかった。

本研究ではF/PMPsとFSH両方の添加が培養4日目でのAFLSの形成率と8日目でのAFLS直径を向上させることがわかった。一方、FSH単体添加において、AFLS直径は4日目で増加が見られたが、AFLS形成率に差はなかった。FSHは牛顆粒膜細胞の増殖を刺激し、その形態を維持することで胞状構造物の形成を促すことが示唆されている[51]。本研究ではFSHを培養液に添加するのではなく、コーゲンゲルに添加した。つまり、ホルモン輸送体としてのF/PMPsの添加は牛において顆粒膜細胞の増殖におけるFSHの作用を促進することが示唆され、結果としてAFLSの形成率や直径の向上が得られたと考えられた。

本研究では培養後の卵母細胞直径においてF/PMPs添加での有意な効果は得られなかった。F/PMPs添加の作用機序は不明なことが多いが、ひとつの考え方としてホルモン輸送体としての働きが考えられ、直接卵母細胞の成長に影響を与えるというよりは機械的にAFLSの形成に働きかけていると考えられる[59]。

結論として、本研究ではF/PMPsとFSHの添加は卵母細胞の成長は促進せず、AFLSの形成と大きさを向上させることがわかった。しかしながら、牛における前胞状卵胞から得られた卵母細胞の増殖培養においてF/PMPsはホルモン輸送体

として働く可能性が示唆された。

第 4 章

ブタ卵母細胞の単為発生に及ぼす成熟培養時における Ca-EDTA 暴露時間の検討

4.1 緒言

哺乳類の卵母細胞は第二減数分裂中期(M II 期)で分裂を停止しており、精子の侵入刺激により減数分裂を再開する[60, 61]。特に、卵母細胞への精子侵入刺激は細胞内カルシウムオシレーションを誘起し、成熟促進因子(MPF)の濃度を低下させることにより減数分裂の再開を引き起こす[62]。また、この誘導は雄性前核および雌性前核(PN)の形成を促すため[63]、これらの一連の流れは通常の卵母細胞発育では不可欠なものである。

人為的に卵母細胞の活性化を起こすものとしてはエタノール[28, 29]、カルシウムイオノフォア A23187[30]、イオノマイシン[31]、電気穿孔法[32]、塩化カルシウム [33]、タンパク質キナーゼ抑制剤[34]、グアニンヌクレオチド結合タンパク質G タンパク質[33]、タンパク質合成阻害剤シクロヘキシミド[35]、ストロンチウムとバリウムイオン[36]、擬似受精 [37]がある。これら試薬は通常の精子刺激の代わりとなって単為発生を誘導することが知られている[38]。本技術は胚性幹細胞、核移植クローンの作成やドナー核の再プログラミングに重要であり、畜産分野においてはウシや豚での妊娠維持に利用されている。例えば、電気刺激により作成した単為発生胚を体外作成した受精胚と同時移植すると正常な子豚が得られるが [64]、単為発生胚は通常 30 日齢で死滅し、通常胚の定着や妊娠維持を補助する。

一方、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)のジナトリウム塩(Na-EDTA)はブタの卵核胞期の未成熟卵母細胞の単為発生を誘起し、未成熟卵から胚盤胞を得られるようになった。この場合、前核形成が第一減数分裂中期から直接形成されるため、卵母細胞の核相は卵核胞崩壊期(GVBD 期)と第一減数分裂後期・終期(AT 期)の間でとどまり、M II 期には至らない[65, 66]。また、ブタやウシの GV 期卵

では Ca-EDTA 濃度が 1mM あれば 48 時間成熟培養することで前核形成が見られるが、同様の方法を用いてもマウスでは前核形成は誘導されず、牛卵母細胞での前核形成は Ca-EDTA を添加した培地で 36-48 時間必要とする[67]。これらの報告は成熟培養における Ca-EDTA の添加が第二減数分裂期にいたらずとも胚盤胞まで発育する早熟な前核形成が起こることを示唆している。

これまでに、ブタ卵母細胞の Ca-EDTA 添加による単為発生之最適条件を検討した報告は少ない。そこで本研究ではブタ卵母細胞における単為発生での胚盤胞形成率向上のための最適な Ca-EDTA の暴露時間を検討した。

4.2 材料と方法

4.2.1 卵母細胞の採材と体外成熟培養(IVM)

食肉処理場より春機発動前の交雑種未経産豚(ランドレース種、大ヨークシャー種、デュラック種での雑種豚)の卵巣を採取し、35°Cの0.9%生理食塩水内で保存、屠殺から3時間以内に実験室に持ち帰った。卵丘卵母細胞複合体(COCs)を直径3~6mmの卵胞から18Gの注射針をつけた注射器で吸引し、ペニシリンGカリウム100 IU/ml(Meiji, Tokyo, Japan)、ストレプトマイシン0.1 mg/ml(Meiji)を添加した修正リン酸緩衝液(m-PBS; Nihonzenyaku, Fukushima, Japan)に収集した。また、均一な細胞質を持つ卵母細胞と顆粒膜細胞が十分に集積したCOCsを用いた。COCsはAzumaら[65]の方法を修正した成熟培地(IVM培地)で成熟培養した。IVM培地は25mMのHEPES緩衝液を添加したTCM199(Earl塩)培地(TCM 199; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)に0.1%ポリビニルアルコール

(PVA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、 3.05 mM D-グルコース(Wako, Osaka, Japan)、 0.91 mM ピルビン酸ナトリウム(Life Technologies)、 ウマ絨毛性性腺刺激ホルモン(eCG)10 IU/ml(Kawasaki-Mitaka K.K., Kawasaki, Japan)、 ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG)10 IU/ml(Kawasaki-Mitaka) 、 ゲンタマイシン 50 μ g/ml(Sigma-Aldrich)を添加し作成した。COCs を 1mM Ca-EDTA (Wako)で図 4 に示すようなスケジュールで暴露した。

卵母細胞を計 48 時間成熟培養し、そのなかで 1mM Ca-EDTA の暴露を行った。約 10 個の COCs を 35 × 10 mm のペトリ皿(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)を使用し IVM 培養液 100 μ l のドロップ中でミネラルオイル(Sigma-Aldrich)で覆い培養した。すべての培養は 38.5°C、5% CO₂ の条件下で行った。

4.2.2 胚培養

成熟培養後すべての卵母細胞を 0.1% (w/v)ヒアルノニダーゼ(Sigma-Aldrich)を加えた TCM199 培養液の中で裸化し、ウシ血清アルブミン 4 mg/ml(BSA; Sigma-Aldrich)、ゲンタマイシン 50 μ g/ml を加えた NCSU23 培地[64]内で 38.5°C、5% CO₂ の条件下で培養した。72 時間後、胚を 4 mg/ml BSA (Sigma-Aldrich)、5.55 mM D グルコース、50 μ g/ml ゲンタマイシンを添加した新しい NCSU23 に移しさらに 5 日間培養した。胚の分割率と胚盤胞形成率は培養開始からそれぞれ 3 日目と 8 日目に観察した。

4.2.3 卵母細胞の核相評価

48 時間成熟培養したブタ卵母細胞の核相を評価するために卵母細胞から顆粒膜細胞を裸化したのち、酢酸 :エタノール(1:3)の固定液で細胞固定し、45% (v/v) 酢酸(Wako)に 1% (w/v) オルセイン (Sigma-Aldrich)を加えた染色液で染色し位相差顕微鏡で観察した。

4.2.4 胚発育の評価

培養 8 日目にすべての胚を固定し、3.7% (w/v)パラホルムアルデヒドと 1% (v/v)トリトン X-100 (Sigma-Aldrich)を添加した PBS 内で 15 分間室温で静置し、その後 0.3% (w/v) ポリビニルピロリドン を加えた PBS 内で再度 15 分間室温で静置した。胚をスライドグラス上の 1.9 μ M ヘキスト 33342 (Sigma-Aldrich)を添加した 90% (v/v) グリセロールから成る蛍光封入剤のドロップに移しカバーグラスをのせ 4°Cで一晩静置し、蛍光顕微鏡を用いて 355-nm の波長で観察した。明瞭な胞胚腔があるものを胚盤胞とし、分割胚と胚盤胞の数を記録した。

4.2.5 試験区

試験 1：ブタ卵母細胞における成熟培養後の Ca-EDTA 暴露による単為発生誘起

COCs は無作為に 5 個の試験区(図 4, A)に割り振り、Ca-EDTA 無添加の IVM 培地内で 48 時間、36 時間、24 時間、12 時間、0 時間培養し、その後それぞれ 1mM Ca-EDTA 添加培地で 0 時間(control)、12 時間(post-12)、24 時間(post-24)、36 時間(post-36)、48 時間(post-48)培養した。計 48 時間の成熟培養後に卵母細胞をいくつか固定、染色し Ca-EDTA 暴露による核相の変化を観察した。残りの卵母細胞は NCSU23 培地で 8 日間培養し胚発育を観察した。

試験 2：ブタ卵母細胞における成熟培養前の Ca-EDTA 暴露による単為発生誘起

COCs を 1mM Ca-EDTA 添加の IVM 培地内で 0 時間(control)、12 時間(pre-12)、24 時間(pre-24)、36 時間(pre-36)、48 時間(pre-48)培養し、その後それぞれ Ca-EDTA 無添加培地で培養した(図 4, B)。計 48 時間の成熟培養後試験 1 と同じく卵母細胞をいくつか固定、染色し Ca-EDTA 暴露による核相の変化を観察した。残りの卵母細胞は NCSU23 培地で 8 日間培養し胚発育を観察した。

4.3 統計解析

各試験区は 4 回繰り返し行った。分割胚や胚盤胞の割合は分散分析(ANOVA)を行う前にアークサイン変換を行い検定した。変換したデータは分散分析する

前にフィッシャー検定の最小有意差で評価し、スタットビュー StatView software (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA)を用いて検定した。有意水準 0.05 を有意差ありとした。

4.4 結果

4.4.1 試験 1

COCs を Ca-EDTA に少なくとも 24 時間暴露した 3 群(post-24 群、post-36 群、post-48 群) ではコントロール群や post-12 群に比較して分割率や胚盤胞発生率が高かった(表 2)。Post-36 群での分割率は post-24 群や post-48 群よりも有意に高かった($p < 0.05$)が胚盤胞発生率や胚盤胞の細胞数では 3 群で有意な差はなかった。コントロール群と post-12 群ではどの卵母細胞も胚盤胞を形成しなかった。

4.4.2 試験 2

COCs を成熟培養開始から 36 時間、48 時間 Ca-EDTA で暴露した群(pre-36 群、pre48 群)は徐々に卵母細胞の分割率が上昇し、いくつかの卵母細胞は胚盤胞まで発育した(表 3)。しかし、胚盤胞発生率はどの群でも Ca-EDTA 暴露に関係なく著しく低く有意差は認められなかった。コントロール群、pre-12 群、pre-24 群ではどの卵母細胞も胚盤胞まで発育しなかった。

図 5 に示すように、前核形成は Ca-EDTA による暴露を培養の後半に少なくとも

も 12 時間以上行ったときのみ観察できた(post-12 群、post-24 群、post-36 群、post-48 群)。前核形成率は 34.2%から 66.7%と暴露時間が延長するとともに増加し、post-24 群、post-36 群、post-48 群は 0%のコントロール群よりも有意に高かった(図 5,A)。また、Ca-EDTA による暴露を前半に 12 時間以上行った群(pre-12 群、pre-24 群、pre-36 群、pre-48 群)は前核を形成し、形成率は 13.4%から 59.2%と 0%のコントロール群に比べ有意に高かった(図 5,B)。

4.5 考察

本研究により、成熟培養時における Ca-EDTA の暴露は未成熟卵母細胞の発育誘導だけではなく胚盤胞への単為発生も誘起することが示された。これまでに M II 期卵母細胞での人為的な刺激による単為発生による分割胚、胚盤胞の作成は報告されている[68, 69]。Azuma ら[65]は、最初に成熟培養中での Na-EDTA の暴露によって GV 期卵母細胞からの単為発生による前核および胚盤胞形成を報告した。また、Ca-EDTA によっても卵母細胞が誘導され減数分裂時に早熟な前核が形成されることも報告している[66,67]。これらの報告では、ブタ卵母細胞における Ca-EDTA 処置は細胞外の亜鉛(Zn^{2+})の欠乏を引き起こし、細胞膜の組成を変化させることによって細胞内環境を変化させ、その結果単為発生が起こると説明している。さらに Ca-EDTA 処置は M II 期以外でも前核形成を誘導することも示している。しかし、成熟培養時における卵母細胞の誘導や GV 期卵からの胚盤胞の形成を目的とした Ca-EDTA 処置の最適な期間は不明のままであった。

本研究では、卵母細胞の成熟培養の開始から終了までの期間において後半 24 時間と 36 時間目から Ca-EDTA で暴露した群(post-24、post-36)と成熟培養期間通

して Ca-EDTA で暴露した群(post-48)、前半に 36 時間以上暴露した群(pre-36、pre-48)で分割胚や胚盤胞が得られた。この結果は、未成熟なブタ卵母細胞の減数分裂過程において、胚盤胞形成には Ca-EDTA 処置は少なくとも 48 時間の成熟培養期間の内 24 時間から 36 時間必要であることを示している。また、成熟培養を 24 時間から 36 時間先に培養した卵母細胞は Ca-EDTA による暴露に感受性が高いことが示された。本研究から、成熟培養の開始から 36 時間目の Ca-EDTA 暴露が最適であることがわかった。さらに、試験 1 の結果から成熟培養開始から 24 時間後に Ca-EDTA の暴露を行うのが前核形成や胚盤胞形成に効果的であることがわかった。これらの結果から、IVM 開始 24 時間から 36 時間の間は卵母細胞の単為発生を行うにあたって重要な期間であることが示唆された。

ブタの卵母細胞は通常採取時点で卵核胞の崩壊が開始しており、24 時間から 26 時間の培養で第一減数分裂中期まで達し、40 時間から 44 時間の培養で第二減数分裂中期まで成熟する[70, 71]。Kikuchi ら[72]は 30 時間の体外成熟培養で成熟したブタ卵母細胞は M II 期に至ると報告している。本研究でも Ca-EDTA 無添加の条件で卵母細胞を 24 時間から 36 時間成熟培養すると M II 期に達していた(データ未発表)。一方、Kim ら[73]はマウスにおける亜鉛の重要性を指摘している。M II 期の卵母細胞内には GV 期の卵母細胞に比べ有意に Zn^{2+} の含有量が高くなっていると報告している。また、彼らは成熟培養時の亜鉛欠乏が第一減数分裂終期での紡錘体機能を停止させ、M II 期には進まないことを示している。亜鉛欠乏が極体の放出を引き起こし、M II 期にならずに前核を形成している可能性がある。これらの結果を考えると、成熟培養後の 24 時間から 36 時間は M I 期から M II 期に至る期間であるが、Ca-EDTA に暴露することによって亜鉛欠乏が起こり単為発生を効果的に引き起こす期間であるということが出来る。Azuma ら[67]は 1mM の Ca-EDTA で 48 時間処置した卵母細胞の 77%が前核を形成したが、

前核を形成した卵母細胞の95%以上が極体を持たなかったと報告している。本研究でも同じように48時間Ca-EDTAに暴露した群(post-48群)で67%の前核形成率であったが、前核を形成した卵母細胞の23%は極体を放出していた(データ未発表)。この卵母細胞における極体放出率の差の要因は不明であるが、前核を形成していた卵母細胞のいくつかはMⅡ期が完了した後のものかもしれないことが示唆された。よって、成熟培養時のCa-EDTAによる単為発生の誘導機序について更なる検討が必要であると思われる。

結論として、ブタの未成熟な卵母細胞は少なくとも24時間から36時間の成熟培養中のCa-EDTAによる暴露によって単為発生が誘起され、前核形成および胚盤胞の発生につながる。さらに、卵母細胞は成熟培養開始から24時間から36時間の間がもっともCa-EDTAによる単為発生の誘起を受けやすいことが判明した。本研究ではブタ卵母細胞においてCa-EDTA暴露による単為発生の最適な期間がわかったが、根本的な機序は依然はっきりせず不明である。今後は化学的な単為発生誘導の機序を解明するために、ブタで単為発生を起こさせる他の物質についても検討が必要と思われた。

第 5 章

考察

第2章では人工授精時期による性制御への精子、卵母細胞の関与を明らかにするために、黒毛和種牛の同一飼養の一群において発情観察から授精までの時間により区分した2群で試験を行った。その結果、Early群とLate群について分娩率、雄子牛の頭数について、授精のタイミングと季節、種雄牛間では相互に有意な差が見られなかった。また2群間で分娩率に差はなかった。しかし、Early群ではLate群に比較し有意に雄子牛の出生が多かった(56.9% vs 41.1%, $p < 0.05$)。

授精タイミングによる性比の比率の変化はX精子とY精子の運動性や受精能の獲得時期、生存性の違いから生じると考えられている[4,41]。ウシでは一般的に発情が18時間継続し10-12時間で排卵が起こる。つまり発情開始から30-32時間後に排卵が起こる[46,47]。遅いタイミングでの授精では受胎率が低下するため、最適な授精タイミングはスタンディング発情から4-12時間と報告されている[48]。本研究ではEarly群とLate群で分娩率に差はなかったが、既報にくらべ分娩率は低かった[49]。今回の研究では遅いタイミングの授精のほうが雌子牛の出生が多かったが、直腸検査にて卵胞発育が悪く排卵しないような個体は発情観察から27時間後に授精していた。しかし、2群とも授精から24時間後には排卵していた。つまり、Early群では発情開始から3-27時間後には排卵が完了し、Late群では排卵まで発情開始から27-51時間かかっていることになる。このことからLate群では発情持続時間が長く排卵が遅延していたと考えられる。つまり、本研究での性比の差は精子側の要因ではなく母体側の要因である可能性が示唆された。ヒトではMartinら[47]が卵胞期が短くなると頸管粘液の精子通過可能となる期間が短くなり、運動性の高いY精子がより多く子宮にたどり着くと報告している。また、得られた産子の性比は受精卵の生存性が原因ではないかとの報告[74]もあり、さらに、受精卵の培養液を変化させることで生存する受精卵の性比に差が生じるとの報告もある[75]。

結論として、今回の研究では発情持続時間が長く遅い授精は雌産子が多く得られる傾向があるということが示され、母体側が産子の性に対して影響を与えていることが示唆された。

第2章での母体側の要因、受精の詳細な解明には卵母細胞を含む卵胞の発育過程のさらなる理解が必要であり、また効率的な成熟卵母細胞の作出の観点から卵母細胞の成熟培養技術の向上が必要であることから、第3章ではウシ卵母細胞の三次元培養法に焦点を当て検討を行った。

卵胞増殖培養4日目ではMPs/FSH群が他の群に比較しAFLS形成率が高い傾向($p < 0.1$)がみられ、培養4日目と8日目ではMPs/FSH群が対照群に比較し有意($p < 0.05$)にAFLS直径が大きくなっていた。また、50%以上の卵母細胞で減数分裂が再開していたが、どの卵母細胞も第二減数分裂中期(M II期)には達していなかった。一方、FSH単体添加において、AFLS直径は4日目で増加が見られたが、AFLS形成率は変化がなかった。FSHはウシ顆粒膜細胞の増殖を刺激し、その形態を維持することで胞状構造物の形成を促すことが示唆されている[51]。本研究ではFSHを培養液に添加するのではなく、コラーゲンゲルに添加した。つまり、ホルモン輸送体としてのF/PMPsの添加はウシにおいて顆粒膜細胞の増殖におけるFSHの作用を促進することが示唆され、結果としてAFLSの形成率や直径の向上が得られたと考えた。しかし、培養後の卵母細胞直径においてF/PMPs添加での有意な効果は得られなかった。このことから、F/PMPsはホルモン輸送体として直接卵母細胞の成長に影響を与えるというよりは機械的にAFLSの形成に働きかけていると考えられる[59]。

結論として、F/PMPs と FSH の添加は卵胞形成の機序の解明や前期胞状卵胞から得られる卵母細胞の効率的な培養に役立つことが解った。

第4章では第3章での研究を受け効率的な成熟卵母細胞を得ることが可能になることから、雌飼養の価値が高いウシ、ブタにおいて雌胚作出方法の一つであり、妊娠維持に利用される単為発生胚の効率的な作出技術の確立のためにブタ卵母細胞を用いて試験を行った。

本研究では成熟培養時における Ca-EDTA の暴露は未成熟卵母細胞の前核形成だけではなく胚盤胞への単為発生も誘起することが示された。卵母細胞の成熟培養の開始から終了までの後半24時間と36時間 Ca-EDTA で暴露した群(post-24、post-36)と成熟培養期間通して Ca-EDTA で暴露した群(post-48)、前半に36時間以上暴露した群(pre-36、pre-48)で卵母細胞から分割胚や胚盤胞が得られた。この結果は、未成熟なブタ卵母細胞が減数分裂の過程に誘導され、第二減数分裂の中期に入り胚盤胞を形成するには Ca-EDTA 処置が少なくとも48時間の成熟培養期間の内、24時間から36時間目に必要だということを示している。また、成熟培養を24時間から36時間先に受けた卵母細胞は Ca-EDTA による暴露に感受性が高いこと、成熟培養の開始時から Ca-EDTA に暴露する時間は36時間の暴露が胚盤胞を得るためには必要であることがわかった。さらに、試験1の結果から成熟培養開始から24時間後に Ca-EDTA の暴露を行うのが前核形成や胚盤胞形成に効果的であることがわかった。これらの結果から、IVM 開始24時間から36時間の間は単為発生を行うにあたって重要な時間帯であることが判明した。

ブタの卵母細胞は通常卵核胞の崩壊が起こっており、24時間から26時間の培養で第一減数分裂中期まで達し、40時間から44時間の培養で第二減数分裂中期まで成熟する[70, 71]ことから、成熟培養後の24時間から36時間はMI期からMII期に至る期間であるが、Ca-EDTA に暴露することによって単為発生を効果的に引き起こす期間であるとも考えられた。

結論として、ブタの未成熟な卵母細胞は少なくとも24時間から36時間の成

熟培養中の Ca-EDTA による暴露によって単為発生が誘起され、胚盤胞形成につながる前核が形成が起こる。さらに、卵母細胞が最も Ca-EDTA による単為発生誘起を受けやすい時間帯は成熟培養開始から 24 時間から 36 時間の間であることが明らかとなった。

ウシやブタなどの家畜では体外における胚の生産効率向上の目的から様々な卵母細胞活性化法の評価法として単為発生胚による研究が行われてきた。ブタにおいては Kure-Bayashi ら[76]によって胎齢 29 日まで単為発生胎子の生存が可能であることが報告され、Zhu ら[77]は成熟卵母細胞から単為発生胚を作出、移植し発生能の検討を行っている。しかし、単為発生由来胚盤胞の細胞数が受精によって得られた胚盤胞に比べて少なく[78, 79]、発生能も通常の受精胚に比べて低いことが報告されており[78]、その原因としては、細胞機能の低さ[78, 79]や父系ゲノムのインプリンティングの欠如[82, 83, 83]などが考えられているが単為発生胚の発生および成長機序の多くは不明である。

本研究ではブタ卵母細胞において Ca-EDTA 暴露による単為発生の最適な期間はわかったが根本的な機序は依然はっきりせず不明である。今後は化学的な単為発生誘導の機序を解明する必要があると思われた。

総括すると本研究では第 2 章にて母体側の性制御機構の可能性が強く示唆され、第 3 章では本来なら生体内で死滅してしまう多くの生殖資源としての卵母細胞の更なる有効利用と卵胞内での卵母細胞の成熟機構、受精能、発生能の解明が可能になった。第 4 章ではブタでの単為発生胚の効率的作出が可能になり、今後優良な遺伝形質の的確な継承に有用な単為発生胚からの産子の作出研究、多精子侵入が多いブタでの単為発生胚を使った着床機構、胚発生特性の解明や最適な胚培養条件の検討等への利用が考えられる。

以上のことから、家畜においては飼養形態の違いにより必要とする産子の性が異なっており、効率的な雌産子の生産は畜産において有益であると考えられ、本研究における受精前後での母体側からの性制御機構の可能性、未成熟卵母細胞の成熟培養、単為発生胚の作出は本研究の目的とする効率的な雌胚の作成に向け有用であることがわかった。

第 6 章

要約

ウシやブタなどの雌飼養が重要な家畜において、雌胚および雌産子の効率的な獲得は農家経営の安定や優良な遺伝形質の保存のために重要である。

本研究において、(研究1) 授精時期による性制御への精子、卵母細胞の関与を明らかにするために、黒毛和種牛の同一飼養の一群において発情観察から授精までの時間により区分した2群で試験を行った。さらに、(研究2) 受精の詳細な解明には卵母細胞を含む卵胞の発育過程のさらなる理解と、効率的な成熟卵母細胞の作出の観点から卵母細胞の成熟培養技術の向上が必要であることから、ウシ卵母細胞の三次元培養法に焦点を当て検討を行った。次に、(研究3) 雌飼養の価値が高いウシ、ブタにおいて雌胚作出方法の一つであり、妊娠維持に利用される単為発生胚の効率的な作出技術の確立のためにブタ卵母細胞を用いて試験を行った。

研究1では、黒毛和種牛において発情から人工授精までの時間が産子の性比に影響を与えるかどうかを検討した。約2年半以上の期間で1829回分の人工授精を調査し、そのうち753頭の産子が得られていた。調査区分として2群:Early群(発情観察後3時間で授精した群)とLate群(発情観察後27時間後に授精を行った群)に分けた。すべてのウシは発情観察後3時間後に直腸検査を行い、排卵可能な主席卵胞を確認し人工授精を行った(Early群)。また主席卵胞が小さいウシについては発情観察から27時間後に再度直腸検査を行い授精した(Late群)。両群において出生率に差はなかったが、Early群においてLate群に比較し雄産子が有意に多いという結果が得られた($p < 0.05$ 56.9%vs41.1%)。以上より遅い時期の授精では雄産子が少ないことがわかった。

研究2では、フラグミンとプロタミンを混合することで簡単に作成できる直径約0.5-1.0 μ Mのフラグミン・プロタミン微粒子(F/P MPs)を用いて実験を行った。F/P MPsをコラーゲンゲルに添加し、卵胞様構造物の形成とウシ卵母細胞

胞の発育に対するホルモン輸送体としての働きを検討した。コラーゲンゲルへの F/P MPs の添加は卵胞様構造物の形成と大きさにおいて、卵胞刺激ホルモン FSH の作用を促進するという結果が得られた。以上より F/P MPs はウシの初期卵胞から得られたウシ卵母細胞の発育を促進するホルモン輸送体として機能する可能性が示唆された。

研究 3 では、雌飼養の価値が高いウシ、ブタにおいて雌胚作出方法の一つであり、妊娠維持に利用される単為発生胚の効率的な作出技術の確立のためにブタ卵母細胞を用いて試験を行った。単為発生を誘起する金属イオンキレート剤である Ca-EDTA を用い、48 時間の成熟培養中さまざまな期間暴露させ、Ca-EDTA による単為発生誘導の最適期間を検討した。培養開始から 36 時間後に Ca-EDTA に暴露した群(post-12)、24 時間後に暴露した群(post-24)、12 時間後に暴露した群(post-36)、0 時間後に暴露した群(post-48)にわけ検討すると、胚盤胞形成率は post-24 群(3.3%)、post-36 群(4.0%)、post-48 群(2.8%)が Ca-EDTA の暴露がなかったコントロール群(0%)に比較し有意に高かった。また、培養開始から暴露を 0 時間行った群(control)、12 時間行った群(pre-12)、24 時間行った群(pre-24)、36 時間行った群(pre-36)、48 時間行った群(pre-48)において検討すると、pre-36 群(0.4%)と pre-48 群(0.8%)でのみ胚盤胞形成が見られた。前核形成は成熟培養中に 12 時間以上 Ca-EDTA で暴露した群でのみ観察できた。なお、コントロール群では前核形成は見られなかった。結論として、ブタ未成熟卵母細胞を用いた単為発生において胚盤胞形成につながる前核形成を誘導するには少なくとも 24 時間から 36 時間の Ca-EDTA 暴露が必要であることが示された。

以上、研究 1 にて母体側の性制御機構の可能性が強く示唆され、研究 2 では生体内で死滅過程にある多くの生殖資源としての卵母細胞の更なる有効利用と卵胞内での卵母細胞の成熟機構、受精能、および発生能の解明手法の培養系を

確立し、研究3ではブタでの単為発生胚の効率的作出が可能になり、今後優良な遺伝形質の的確な継承に有用な産子の作出、単為発生胚を使った着床機構、胚発生特性の解明や最適な胚培養条件の検討等への利用が考えられた。これら研究成果は、雌飼養が重要な家畜において雌胚および雌産子の効率的な獲得の一助となり、優良な遺伝形質の増殖・保存に寄与するものと思われた。

謝辞

本稿を終えるにあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました徳島大学生物資源産業学部動物繁殖学講座の音井威重教授、山口大学共同獣医学部獣医学科臨床獣医学講座獣医繁殖学分野の高木光博教授に心より御礼と感謝申し上げます。

加えて、副査としてご指導いただきました山口大学共同獣医学部生体機能学講座獣医生体システム科学(生化学)分野山本芳実教授、山口大学共同獣医学部臨床獣医学講座獣医外科学分野田浦保穂教授、山口大学共同獣医学部臨床獣医学講座獣医繁殖学分野谷口雅康准教授、鳥取大学農学部共同獣医学科臨床獣医学講座獣医画像診断学分野の柄武志准教授に深謝いたします。

また、各研究において卵巣の採材等にご協力いただいた北九州市立食肉センター検査員の方々、本研究に限らず日ごろより多大なご協力をいただいております山口大学繁殖学研究室の教職員、学部生、卒業生、留学生の皆様、岡山県農業共済組合連合会家畜診療所の皆様に御礼申し上げます。

最後に社会人院生として仕事と研究を行うにあたり常に励まし支えてくれた妻・真紀と子供たち、森田家、柴田家の両家族、親戚の皆様から心から感謝いたします。

引用文献

- [1] Johnson, L. A., & Welch, G. R. (1999). Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology*, 52(8), 1323-1341.
- [2] Seidel, G. E., Schenk, J. L., Herickhoff, L. A., Doyle, S. P., Brink, Z., Green, R. D., & Cran, D. G. (1999). Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology*, 52(8), 1407-1420.
- [3] Peura, T., Hyttinen, J. M., Turunen, M., & Jänne, J. (1991). Areliable sex determination assay for bovine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction. *Theriogenology*, 35(3), 547-555.
- [4] Martinez, F., Kaabi, M., Martinez-Pastor, F., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J. C., ... & Anel, L. (2004). Effect of the interval between estrus onset and artificial insemination on sex ratio and fertility in cattle: a field study. *Theriogenology*, 62(7), 1264-1270.
- [5] Rorie, R. W., Lester, T. D., Lindsey, B. R., & McNew, R. W. (1999). Effect of timing of artificial insemination on gender ratio in beef cattle. *Theriogenology*, 52(6), 1035-1041.
- [6] Yoshinaga, K., & Mori, T. (1989). Development of preimplantation embryos and

their environment. In *Symposium on Development of Preimplantation Embryos and their Environment (1988: Kyoto, Japan)*. AR Liss.

[7] Baker, T. G. "A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries." *Proceedings of the royal society of london. Series b, biological sciences* (1963): 417-433.

[8] Erickson, B. H. "Development and senescence of the postnatal bovine ovary." *Journal of Animal Science* 25.3 (1966): 800-805.

[9] Guthrie, H. D., and W. M. Garrett. "Apoptosis during folliculogenesis in pigs." *Reproduction (Cambridge, England) Supplement* 58 (2000): 17-29.

[10] Blondin, Patrick, and Marc-André Sirard. "Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes." *Molecular reproduction and development* 41.1 (1995): 54-62.

[11] Marchal, R., et al. "Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes." *Theriogenology* 57.5 (2002): 1523-1532.

[12] Eppig, John J., and Marilyn J. O'Brien. "Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles." *Biology of Reproduction* 54.1 (1996): 197-207.

[13] Hirao, Y., Nagai, T., Kubo, M., Miyano, T., Miyake, M., & Kato, S. (1994). In vitro

growth and maturation of pig oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 100(2), 333-339.

[14] Harada, M., Miyano, T., Matsumura, K., Osaki, S., Miyake, M., & Kato, S. (1997). Bovine oocytes from early antral follicles grow to meiotic competence in vitro: effect of FSH and hypoxanthine. *Theriogenology*, 48(5), 743-755.

[15] Newton, H., Picton, H., & Gosden, R. G. (1999). In vitro growth of oocyte-granulosa cell complexes isolated from cryopreserved ovine tissue. *Journal of reproduction and fertility*, 115(1), 141-150.

[16] Yamamoto, K., Otoi, T., Koyama, N., Horikita, N., Tachikawa, S., & Miyano, T. (1999). Development to live young from bovine small oocytes after growth, maturation and fertilization in vitro. *Theriogenology*, 52(1), 81-89.

[17] Brower, P. T., Gizang, E., Boreen, S. M., & 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. *Developmental biology*, 86(2), 373-383.

[18] Herlands, R. L., & Schultz, R. M. (1984). Regulation of mouse oocyte growth: probable nutritional role for intercellular communication between follicle cells and oocytes in oocyte growth. *Journal of Experimental Zoology*, 229(2), 317-325.

[19] Buccione, R., Vanderhyden, B. C., Caron, P. J., & Eppig, J. J. (1990). FSH-induced

expansion of the mouse cumulus oophorus in vitro is dependent upon a specific factor (s) secreted by the oocyte. *Developmental biology*, 138(1), 16-25.

[20] DOWNS, S. M., & EPPIG, J. J. (1984). Cyclic Adenosine Monophosphate and Ovarian Follicular Fluid Act Synergistically to Inhibit Mouse Oocyte Maturation*. *Endocrinology*, 114(2), 418-427.

[21] Eppig, J. J., & Downs, S. M. (1987). The effect of hypoxanthine on mouse oocyte growth and development in vitro: maintenance of meiotic arrest and gonadotropin-induced oocyte maturation. *Developmental biology*, 119(2), 313-321.

[22] Albertini, D. F., Combelles, C. M., Benecchi, E., & Carabatsos, M. J. (2001). Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction*, 121(5), 647-653.

[23] Hirao, Y., Nagai, T., Kubo, M., Miyano, T., Miyake, M., & Kato, S. (1994). In vitro growth and maturation of pig oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 100(2), 333-339.

[24] Eppig, J. J. (1977). Mouse oocyte development in vitro with various culture systems. *Developmental biology*, 60(2), 371-388.

[25] Telfer, E. E. (1998). In vitro models for oocyte development. *Theriogenology*, 49(2), 451-460.

[26] Wandji, S. A., Eppig, J. J., & 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(4), 817-832.

[27] Surani, M. A., Kothary, R., Allen, N. D., Singh, P. B., Fundele, R., Ferguson-Smith, A. C., & Barton, S. C. (1990). Genome imprinting and development in the mouse. *Development*, 108(Supplement), 89-98.

[28] Nagai, T. (1987). Parthenogenetic activation of cattle follicular oocytes in vitro with ethanol. *Gamete research*, 16(3), 243-249.

[29] Nagai, T. (1992). Development of bovine in vitro-matured follicular oocytes activated with ethanol. *Theriogenology*, 37(4), 869-875.

[30] Wang, W. H., Machaty, Z., Abeydeera, L. R., Prather, R. S., & Day, B. N. (1998). Parthenogenetic activation of pig oocytes with calcium ionophore and the block to sperm penetration after activation. *Biology of reproduction*, 58(6), 1357-1366.

[31] Campbell, K. H. (1999). Nuclear equivalence, nuclear transfer, and the cell cycle. *Cloning*, 1(1), 3-15.

[32] Collas, P., Fissore, R., Robl, J. M., Sullivan, E. J., & Barnes, F. L. (1993). Electrically induced calcium elevation, activation, and parthenogenetic development of

bovine oocytes. *Molecular reproduction and development*, 34(2), 212-223.

[33] Machaty, Z., Funahashi, H., Mayes, M. A., Day, B. N., & Prather, R. S. (1996). Effects of injecting calcium chloride into in vitro-matured porcine oocytes. *Biology of reproduction*, 54(2), 316-322.

[34] Mayes, M. A., Stogsdill, P. L., & Prather, R. S. (1995). Parthenogenic activation of pig oocytes by protein kinase inhibition. *Biology of reproduction*, 53(2), 270-275.

[35] Nussbaum, D. J., & Prather, R. S. (1995). Differential effects of protein synthesis inhibitors on porcine oocyte activation. *Molecular reproduction and development*, 41(1), 70-75.

[36] Okada, K., Miyano, T., & Miyake, M. (2003). Activation of pig oocytes by intracytoplasmic injection of strontium and barium. *Zygote*, 11(02), 159-165.

[37] Paffoni, A., Brevini, T. A. L., Gandolfi, F., & Ragni, G. (2008). Parthenogenetic activation: biology and applications in the ART laboratory. *Placenta*, 29, 121-125.

[38] Kawarasaki, T., Otake, M., Tsuchiya, S., Shibata, M., Matsumoto, K., & Isobe, N. (2009). Co-transfer of parthenogenotes and single porcine embryos leads to full-term development of the embryos. *Animal reproduction science*, 112(1), 8-21.

[39] Petr, J., Chmelíková, E., Tumová, L., & Jeseta, M. (2007). The role of nitric oxide

in parthenogenetic activation of pig oocytes: A review. *Czech Journal of Animal Science*, 52(11), 363.

[40] Kawarasaki, T., Otake, M., Tsuchiya, S., Shibata, M., Matsumoto, K., & Isobe, N. (2009). Co-transfer of parthenogenotes and single porcine embryos leads to full-term development of the embryos. *Animal reproduction science*, 112(1), 8-21.

[41] Zobel, R., Gereš, D., Pipal, I., Buić, V., Gračner, D., & Tkalcic, S. (2011). Influence of the semen deposition site on the calves' sex ratio in Simmental dairy cattle. *Reproduction in domestic animals*, 46(4), 595-601.

[42].Jobst SM, Nebel RL.(1988). Does timing of insemination affect gender of the resultant calf? *J. Dairy. Sci.* 81: 244 (Abstr).

[43] Pursley, J. R., Silcox, R. W., & Wiltbank, M. C. (1998). Effect of time of artificial insemination on pregnancy rates, calving rates, pregnancy loss, and gender ratio after synchronization of ovulation in lactating dairy cows. *Journal of dairy science*, 81(8), 2139-2144.

[44].Agriculture Forestry and Fisheries Research Council Secretariat (2008) Japanese feeding standard for beef cattle. *Central Association of Livestock Industry, Tokyo, Japan*,

[45] Wehner, G. R., Wood, C., Tague, A., Barker, D., & Hubert, H. (1997). Efficiency of

the OVATEC unit for estrus detection and calf sex control in beef cows. *Animal reproduction science*, 46(1), 27-34.

[46] Maatje, K., Loeffler, S. H., & Engel, B. (1997). Predicting optimal time of insemination in cows that show visual signs of estrus by estimating onset of estrus with pedometers. *Journal of Dairy Science*, 80(6), 1098-1105.

[47] Martin, J. F. (1997). Length of the follicular phase, time of insemination, coital rate and the sex of offspring. *Human Reproduction*, 12(3), 611-616.

[48]. Dransfield, M. B. G., Nebel, R. L., Pearson, R. E., & Warnick, L. D. (1998). Timing of insemination for dairy cows identified in estrus by a radiotelemetric estrus detection system. *Journal of dairy science*, 81(7), 1874-1882.

[49] Sasaki, Y., Uematsu, M., Kitahara, G., Osawa, T., & Sueyoshi, M. (2014). Effects of stillbirth and dystocia on subsequent reproductive performance in Japanese Black cattle. *The Veterinary Journal*, 200(3), 462-463.

[50] Eppig, J. J., & 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. *Biology of reproduction*, 41(2), 268-276.

[51] Harada, M., Miyano, T., Matsumura, K., Osaki, S., Miyake, M., & Kato, S. (1997). Bovine oocytes from early antral follicles grow to meiotic competence in vitro: effect of

FSH and hypoxanthine. *Theriogenology*, 48(5), 743-755.

[52] Hirao, Y., Nagai, T., Kubo, M., Miyano, T., Miyake, M., & Kato, S. (1994). In vitro growth and maturation of pig oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 100(2), 333-339.

[53] Carroll, J., Whittingham, D. G., & 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. *Journal of reproduction and fertility*, 92(1), 197-207.

[54] Yeo, J. E., Nam, B. M., Yang, W., Jo, Y. H., Lee, S., Nemen, J. G., ... & Lee, J. I. (2013, October). Fragmin/protamine microparticle carriers as a drug repositioning strategy for cell transplantation. In *Transplantation proceedings* (Vol. 45, No. 8, pp. 3122-3126). Elsevier.

[55] Kishimoto, S., Ishihara, M., Mori, Y., Takikawa, M., Sumi, Y., Nakamura, S., ... & Kiyosawa, T. (2012). Three-dimensional expansion using plasma-medium gel with fragmin/protamine nanoparticles and fgf-2 to stimulate adipose-derived stromal cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *BioResearch open access*, 1(6), 314-323.

[56] Nakamura, S., Kanatani, Y., Kishimoto, S., Nakamura, S. I., Ohno, C., Horio, T., ... & Maehara, T. (2009). Controlled release of FGF-2 using fragmin/protamine

microparticles and effect on neovascularization. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 91(3), 814-823.

[57] Yamamoto, K., Otoi, T., Koyama, N., Horikita, N., Tachikawa, S., & Miyano, T. (1999). Development to live young from bovine small oocytes after growth, maturation and fertilization in vitro. *Theriogenology*, 52(1), 81-89.

[58] Abakushina, E. V., Morita, Y., Kaedei, Y., Tanihara, F., Namula, Z., Viet, V. L., & Otoi, T. (2011). Formation of an Antral Follicle-like Structure of Bovine Cumulus-Oocyte Complexes Embedded Individually or in Groups in Collagen Gels. *Reproduction in domestic animals*, 46(3), 423-427.

[59] Kreeger, P. K., Deck, J. W., Woodruff, T. K., & Shea, L. D. (2006). The in vitro regulation of ovarian follicle development using alginate-extracellular matrix gels. *Biomaterials*, 27(5), 714-723.

[60]. Nurse, P. 1990. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 344: 503-508.

[61]. Yanagimachi, R. 1988. Mammalian Fertilization. *The Physiology of Reproduction* 1: 135-185.

[62]. Ducibella, T., Huneau, D., Angelichio, E., Xu, Z., Schultz, R. M., Kopf, G. S., Fissore, R., Madoux, S. and Ozil, J. P. 2002. Egg-to-embryo transition is driven by

differential responses to Ca^{2+} oscillation number. *Dev. Biol.* 250: 280-291.

[63] Alberio, R., Zakhartchenko, V., Motlik, J. and Wolf, E. 2001. Mammalian oocyte activation: lessons from the sperm and implications for nuclear transfer. *Int. J. Dev. Biol.* 45: 797-809.

[64]. Kawarasaki, T., Otake, M., Tsuchiya, S., Shibata, M., Matsumoto, K. and Isobe, N. 2009. Co-transfer of parthenogenotes and single porcine embryos leads to full-term development of the embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 112: 8-21.

[65]. Azuma, T., Ikeda, S., Kondo, T., Imai, H. and Yamada, M. 2001. Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid induces parthenogenetic activation of porcine oocytes at the germinal vesicle stage, leading to formation of blastocysts. *Biol. Reprod.* 64: 647-653.

[66]. Petters, R. M. and Wells, K. D. 1993. Culture of pig embryos. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 48: 61-73.

[67]. Azuma, T., Kondo, T., Ikeda, S., Imai, H. and Yamada, M. 2002. Effects of EDTA saturated with Ca^{2+} (Ca-EDTA) on pig, bovine and mouse oocytes at the germinal vesicle stage during maturation culture and the involvement of chelation of Zn^{2+} in pronuclear formation induction by Ca-EDTA. *Reproduction* 124: 235-240

[68]. Krejkova, T. 2009. Effects of cycloheximide or 6-dimethylaminopurine on the

parthenogenetic activation of pig oocytes using pulsatile treatment with nitric oxide donor. *Czech J. Anim. Sci.* 54: 293-306.

[69]. Lee, J. W., Tian, X.C. and Yang, X. 2004. Optimization of parthenogenetic activation protocol in porcine. *Mol. Reprod. Dev.* 68: 51-57.

[70]. Anger, M., Klima, J., Kubelka, M., Prochazka, R., Motlik, J. and Schultz, R. M. 2004. Timing of Plk1 and MPF activation during porcine oocyte maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 69: 11-16.

[71]. Suzuki, H. and Saito, Y. 2006. Cumulus cells affect distribution and function of the cytoskeleton and organelles in porcine oocytes. *Reprod. Med. Biol.* 5: 183-194.

[72]. Kikuchi, K., Izaike, Y., Noguchi, J., Furukawa, T., Daen, F. P., Naito, K. and Toyoda, Y. 1995. Decrease of histone H1 kinase activity in relation to parthenogenetic activation of pig follicular oocytes matured and aged in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 105: 325-330.

[73]. Kim, A.M., Vogt, S., O'Halloran, T. V. and Woodruff, T.K. 2010. Zinc availability regulates exit from meiosis in maturing mammalian oocytes. *Nat. Chem. Biol.* 6: 674-681.

[74]Roelofs,J.B.,Bouwmana,E.B. ,Pedersen ,H.G.,RiestraRasmussen,Z.,Soede,N.M.,Th omsenc,P.D.,Kempa,B.,2006.Effect of time of artificial insemination on embryo sex

ratio in dairy cattle. *Animal Reproduction Science* 93, 366–371

[75] Kimura K, Iwata H, Thompson, J.G., 2008. The effect of glucosamine concentration on the development and sex ratio of bovine embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 103 228–238.

[76] Kure-Bayashi, S., Miyake, M., Okada, K., & Kato, S. (2000). Successful implantation of in vitro-matured, electro-activated oocytes in the pig. *Theriogenology*, 53(5), 1105-1119.

[77] Zhu, J., King, T., Dobrinsky, J., Harkness, L., Ferrier, T., Bosma, W., ... & Wilmut, I. (2003). In vitro and in vivo developmental competence of ovulated and in vitro matured porcine oocytes activated by electrical activation. *Cloning & Stem Cells*, 5(4), 355-365.

[78] Whittingham, D. G. (1980). Parthenogenesis in mammals. *Oxford reviews of reproductive biology*.

[79] Kaufman, M. H. (1981). Parthenogenesis: a system facilitating understanding of factors that influence early mammalian development. *Prog. in Anat.*, Vol. 1, 1-34.

[80] Solter, D., Biczysko, W., Graham, C., Pienkowski, M., & Koprowski, H. (1974). Ultrastructure of early development of mouse parthenogenones. *Journal of Experimental Zoology*, 188(1), 1-23.

[81] Petzoldt, U., & Hoppe, P. C. (1980). Spontaneous parthenogenesis in *Mus musculus*:

comparison of protein synthesis in parthenogenetic and normal preimplantation embryos. *Molecular and General Genetics MGG*, 180(3), 547-552.

[82]Surani, M. A., & Barton, S. C. (1983). Development of gynogenetic eggs in the mouse: implications for parthenogenetic embryos. *Science*, 222(4627), 1034-1036.

[83]Mann, J. R., & Lovell-Badge, R. H. (1984). Inviability of parthenogenones is determined by pronuclei, not egg cytoplasm.

[84]Surani, M. A. H., Barton, S. C., & Norris, M. L. (1986). Nuclear transplantation in the mouse: heritable differences between parental genomes after activation of the embryonic genome. *Cell*, 45(1), 127-136.

表 1 発情観察から人工授精(AI)までの時間ごとの分娩率と雄産子率

発情観察から AI までの時間 (%)	分娩率：出生産子/授精回数	雄産子率：雄産子/全産子 (%)*
3 h	573/1,389 (41.3)	326/573 (56.9) ^a
27 h	180/440 (40.9)	74/180 (41.1) ^b
Total	753/1,829 (41.2)	400/753 (53.1)

^{a,b} 異符号間で有意差あり ($P < 0.05$).

表 2. ブタ卵母細胞の単為発生における成熟培養時 Ca-EDTA 後処置の効果*

処置群**	培養卵母細胞数	発生率(%)			胚盤胞細胞数
		分割胚	胚盤胞	胚盤胞	
対照群	365	45 (12.5 ± 2.7) ^a	0 (0.0) ^a	-	
Post-12 群	298	23 (7.7 ± 1.6) ^a	0 (0.0) ^a	-	
Post-24 群	300	83 (27.7 ± 2.4) ^b	10 (3.3 ± 0.7) ^b	31.5 ± 3.7	
Post-36 群	285	105 (37.0 ± 5.0) ^c	11 (4.0 ± 1.2) ^b	29.4 ± 2.5	
Post-48 群	300	81 (27.2 ± 2.6) ^b	9 (2.6 ± 0.8) ^b	34.7 ± 3.1	

*試験は 4 回繰り返し行った。

**ブタ卵母細胞を最初に Ca-EDTA 無添加培地で培養し、その後 1mM Ca-EDTA 添加培地にて図 4 に示すように合計 48 時間成熟培養を行った。対照群として 48 時間 Ca-EDTA 無添加培地で成熟培養を行ったものを用いた。

^{a-c} 異符号間で有意差あり ($p < 0.05$)。

表 3. ブタ卵母細胞の単為発生における成熟培養時 Ca-EDTA 前処置の効果*

処置群**	培養卵母細胞数	発生率(%)		胚盤胞細胞数
		分割胚	胚盤胞	
対照群	265	21 (8.1 ± 2.9) ^a	0 (0.0)	-
Pre-12 群	260	24 (9.2 ± 1.3) ^a	0 (0.0)	-
Pre-24 群	264	28 (10.5 ± 2.9) ^a	0 (0.0)	-
Pre-36 群	281	49 (17.8 ± 3.9) ^{ab}	1 (0.4 ± 0.4)	34
Pre-48 群	270	62 (22.7 ± 4.4) ^b	2 (0.8 ± 0.8)	24.5

*すべての試験は 4 回繰り返し行った。

**ブタ卵母細胞を最初に 1mM Ca-EDTA 添加培地にて図 4 に示すように培養し、その後 Ca-EDTA 無添加培地で合計 48 時間成熟培養を行った。対照群として 48 時間 Ca-EDTA 無添加培地で成熟培養を行ったものを用いた。

^{a-b} 異符号間(同一項目)で有意差あり ($p < 0.05$)。

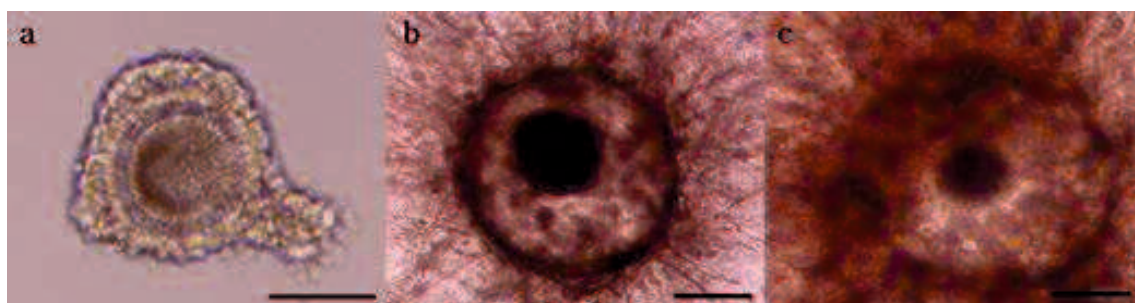


図1 ウシ卵丘-卵母細胞複合体(COCs)から得られる卵胞様構造物(AFLS)の形態
(a)コラーゲンゲルに包埋された COCs、(b)培養4日目の AFLS、(c)培養8日目の AFLS。培養4日目には卵丘細胞や顆粒膜細胞がコラーゲンゲル内に増殖するのが観察できる。(スケール:100 μ m)。

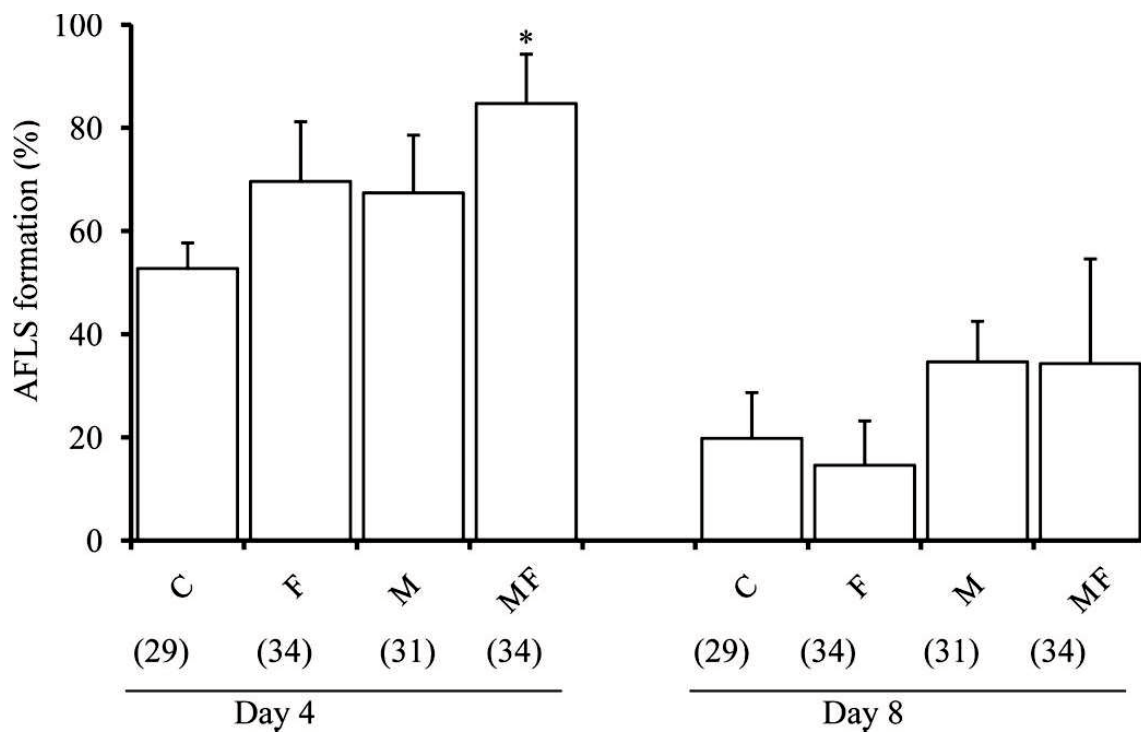


図2 卵胞様構造物(AFLS)の形成率

卵胞様構造物(AFLS)は壁側顆粒膜細胞が付着したウシ卵丘卵母細胞複合体(OCCGs)を4日間、8日間それぞれ培養し得られた。(c)OCCGsのみをコラーゲンゲルに包埋した群、(F)コラーゲンゲルに0.1AU/mL FSHを添加した群、(M)コラーゲンゲルに10% MPsを添加した群、(MF)コラーゲンゲルに10% MPsと0.1AU/mL FSHの両方を添加した群

4~5回試験は繰り返し行い、括弧内の数字は試験に用いたOCCGs数を示す。* : $p < 0.1$

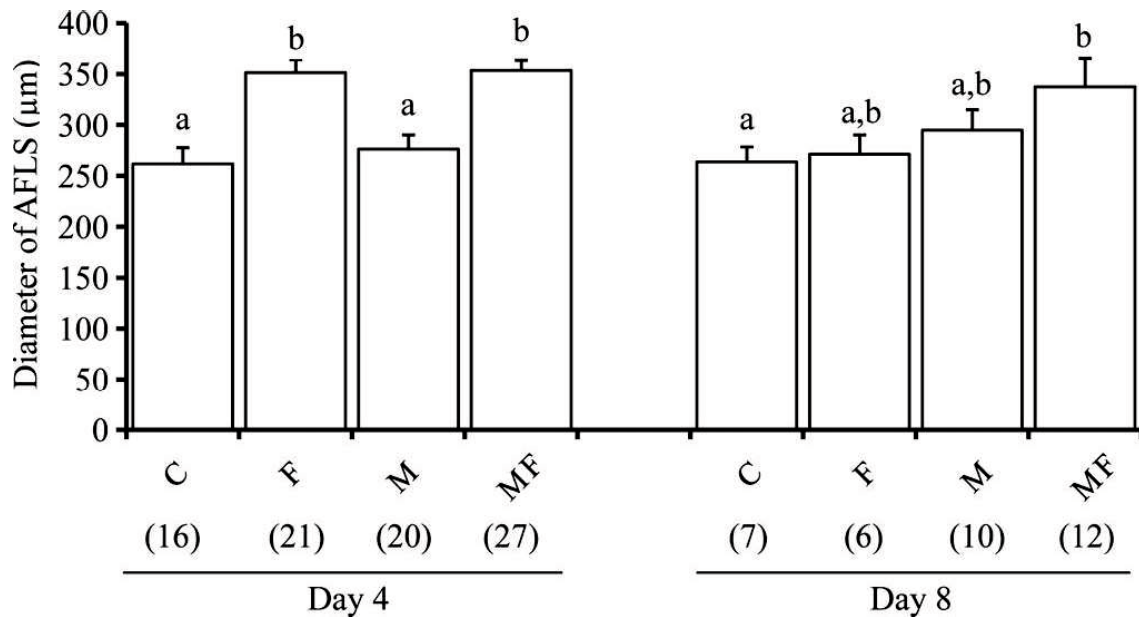


図 3 卵胞様構造物(AFLS)の直径

卵胞様構造物(AFLS)は壁側顆粒膜細胞が付着したウシ卵丘卵母細胞複合体(OCCGs)を4日間、8日間それぞれ培養し得られた。(c)OCCGsのみをコラーゲンゲルに包埋した群、(F)コラーゲンゲルに0.1AU/mL FSHを添加した群、(M)コラーゲンゲルに10%MPsを添加した群、(MF)コラーゲンゲルに10%MPsと0.1AU/mL FSHの両方を添加した群

4~5回試験は繰り返し行い、括弧内の数字は試験に用いたOCCGs数を示す。

異符号間で有意差あり($p < 0.05$)。

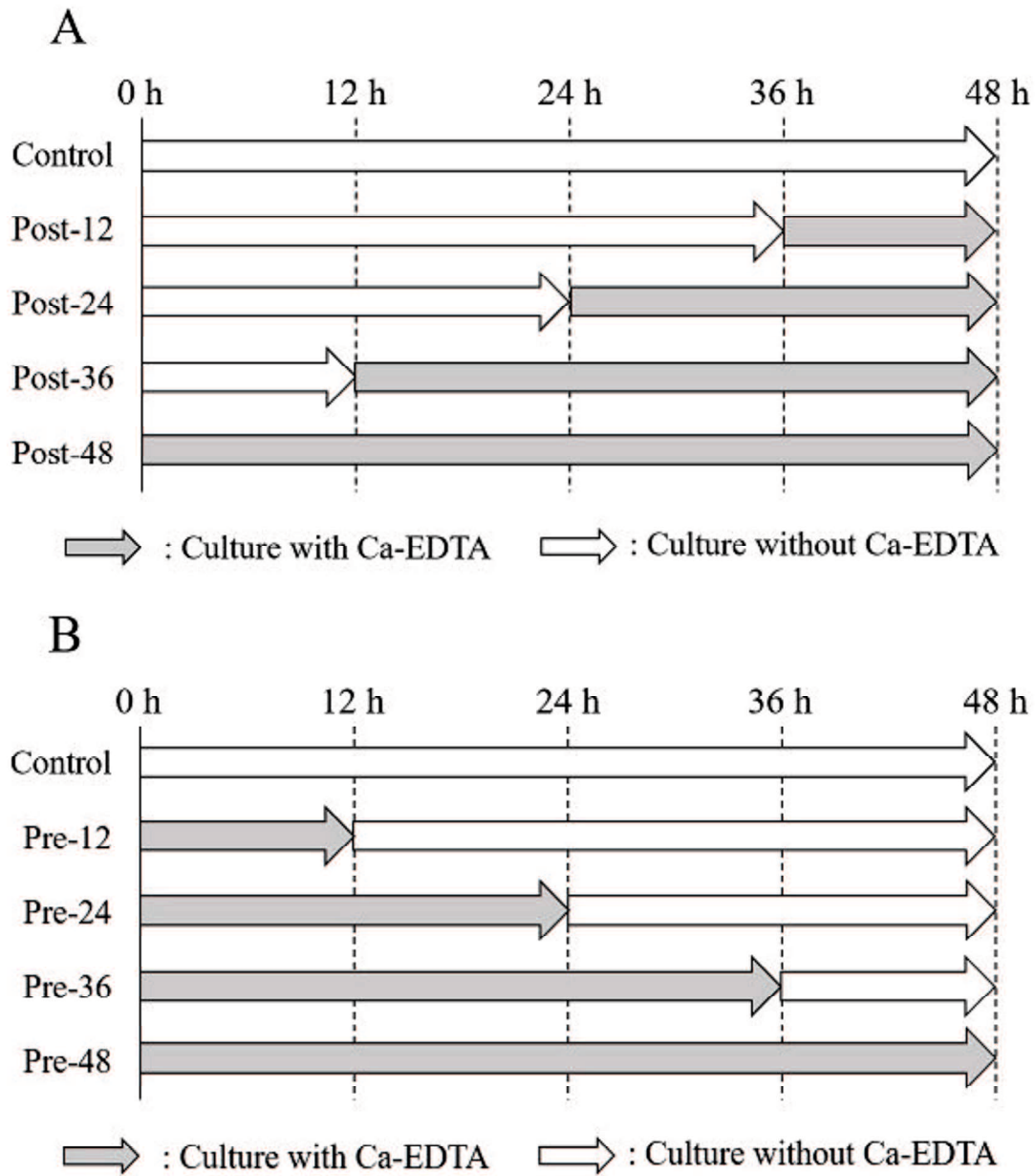


図4 ブタ卵母細胞成熟培養中の Ca-EDTA 後処置(A)、前処置(B)の試験区図

A: Ca-EDTA 後処置(試験 1) ; B: Ca-EDTA 前処置(試験 2)

黒矢印 (⇒) と白矢印 (⇨) はそれぞれ Ca-EDTA 添加、無添加を示す

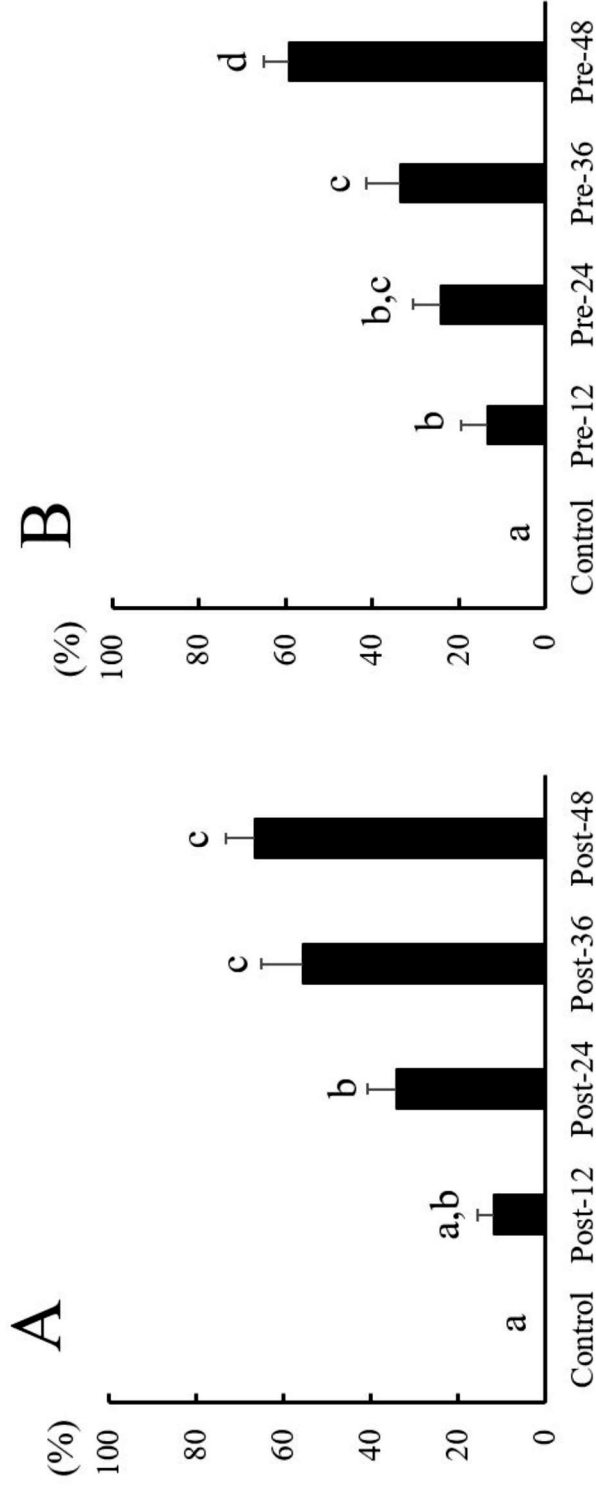


図5 ブタ卵母細胞成熟培養時のCa-EDTA後処置(A)と前処置(B)における48時間後の前核形成率(mean ± SEM)

(A) ブタ卵母細胞をCa-EDTA添加培地にて培養開始から48時間後、36時間後、24時間後、12時間後、0時間後にそれぞれ0時間(control)、12時間(post-12)、24時間(post-24)、36時間(post-36)、48時間(post-48)培養した。

(B) ブタ卵母細胞をCa-EDTA添加培地にて0時間(control)、12時間(pre-12)、24時間(pre-24)、36時間(pre-36)、48時間(pre-48)培養し、その後それぞれ48時間、36時間、24時間、12時間、0時間非添加培地にて成熟培養を行った。

試験は4回繰り返しした。^{a-d} 異符号間で有意差あり($p < 0.05$)。