

イエネコの卵胞発育動態および卵胞内卵子の
体外培養に関する研究

内倉 健造

目 次

要旨	P. 1
緒論	P. 4
第1章 性成熟前のイエネコにおける卵胞発育および卵子性状の調査	
緒言	P. 11
材料と方法	P. 12
結果	P. 17
考察	P. 31
第2章 イエネコ卵子の核成熟能に与える卵巢周期および卵胞直径の影響	
緒言	P. 36
材料と方法	P. 36
結果	P. 39
考察	P. 45
第3章 ヨウ化プロピジウムによる卵丘細胞の超生体染色を用いたイエネコ卵子の 体外成熟能予測	
緒言	P. 50
材料と方法	P. 51
結果	P. 54
考察	P. 61

総括 P. 64

謝辞 P. 69

参考文献 P. 70

要旨

本研究は野生ネコ科動物の体外胚作出技術の開発を目的として様々な日齢のイエネコ (*Felis catus*; 以下、ネコとする) の卵巣内卵子の数や体外培養発生能について調査した。はじめに性成熟前のネコにおける卵胞発育を調査するとともに、卵胞内卵子が胚の体外産生 (IVP) に適するかどうかを評価した。93頭のネコを用いて体重と卵巣重量の関係を調べたところ、卵巣重量は推定日齢100日まで急速に増加することがわかった。推定20日齢、20~40日齢および100~120日齢の11頭の性成熟前のネコ卵巣を組織学的に評価した結果、卵巣重量の増加とともに胞状卵胞の数が増加していることが明らかとなった。また、二次および胞状卵胞の卵胞直径および正常卵子の割合も日齢 (体重) が増加するに従い増加することが分かった。推定100~120日齢の性成熟前のネコ卵子を用いてIVPを行った結果、性成熟前のネコから採取された卵子は、核成熟率、正常受精率および胚盤胞への発生率は性成熟後のネコに比較して低いことが明らかとなった ($p < 0.05$)。しかし、卵割胚が胚盤胞へ発生する割合および発生後の胚盤胞の細胞数は性成熟後のネコと同等であった。以上の結果から、100日齢以上のネコの卵巣には胚盤胞への体外発生能を有する卵子が存在し、移植可能胚を体外で作出可能であることが示された。

次に、ネコ卵子について複数層の卵丘細胞に緊密に覆われ、均一な顆粒状の黒色な細胞質をもったものを形態学的に正常な卵子とし、形態学的な正常性および体外培養後の核成熟能に与える卵巣周期および卵胞直径の影響を検討した。卵巣周期を未成熟期、非活動期、卵胞期および黄体期に分類し、それぞれの周期の卵巣内卵胞を直径により3つのグループに分類した (直径400~800、800~1,200および1,200~2,000 μm)。各卵巣周期において、卵胞発育が進むに従って卵胞数は減少し、卵子の形態学的正常性は向上し ($p < 0.05$)、卵子直径

は卵胞直径の発育と共に増加する傾向にあった。卵子を1個ずつ成熟培養したところ、核成熟率は卵胞直径が増加するに従って上昇した ($p < 0.05$)。直径800~1,200 μm の卵胞において、未成熟期の正常卵子率および核成熟率は性成熟後のネコの卵巣に比較して高かった ($p < 0.05$)。未成熟期においても、5頭中2頭に1個ずつ直径1,200~2,000 μm の卵胞が観察された。以上の結果から、性成熟後のネコでは、卵巣周期に関係なく、大きな卵胞に核成熟能の高い卵子が存在することがわかった。性成熟前のネコにおいては、直径800 μm 以上に発育した卵胞に由来する卵子は、性成熟後のネコの同サイズの卵胞由来卵子に比較して核成熟能の高いことが分かった。

最後に、ネコ卵子の核成熟能の非侵襲的な評価のために、卵丘細胞の膜正常性と体外培養後の核成熟率の関係を調べた。ネコの卵丘卵子複合体 (COCs) を小型 (直径400~800 μm) もしくは大型 (直径800 μm 以上) 卵胞から採取した。採取直後に卵丘細胞を形態 (卵丘細胞層の付着程度) で評価し、死滅細胞のみに侵入するヨウ化プロピジウム (PI) で染色した。PIに染色されなかった卵丘細胞の細胞膜機能は正常であると判定した。評価後、COCsを30時間培養し、核成熟率を調べた。大型卵胞の核成熟率 (89.8%) は小型卵胞 (60.8%) に比較して有意に高かった ($p < 0.05$)。一方、大型卵胞において卵丘細胞の膜正常性の高い卵子の核成熟率 (93.8%) は低い卵子 (76.9%) よりも有意に高かった ($p < 0.05$)。以上の結果から、PI染色による卵丘細胞の膜正常性の評価は卵子の核成熟能の予測に有用であることが分かった。

本研究から幼若ネコ科動物の卵巣からの胚作出が可能である事が示唆されるとともに、超生体染色による卵丘細胞の染色は発生能の高いネコ卵子の選別に有用であり、ネコ科動物胚の作出効率向上に寄与できると考えられた。

序論

大部分の野生ネコ科動物は絶滅の恐れがあるとされ (The International Union for Conservation of Nature Red List, 2007)、それらの保護・増殖のためには、生息地の回復と同時に飼育下にある個体の繁殖効率を向上させる必要がある。しかし、自然繁殖が容易であったとしても同じ組み合わせの雌雄あるいは同じ家系内での交配を繰り返すことによって近交が高まり様々な問題が生じることが知られている。一方で、他の家系との交配を行うために動物自身を移動させることは、輸送コストや動物へのストレスの面から困難である。また、チーターやウンピョウの様に飼育環境下での自然繁殖が困難である種も存在することから、自然繁殖だけで飼育下の動物を維持するのは困難であると考えられている (Howard and Wildt, 2009)。家畜の繁殖やヒトの不妊治療に用いられている人工授精 (artificial insemination, AI)、体外受精 (in vitro fertilization, IVF) および受精卵移植 (embryo transfer, ET) などの生殖補助技術 (assisted reproductive technology, ART) を野生動物の保護・増殖の手段として用いることができれば、これらの問題解決に有効であると考えられ、主にイエネコ (*Felis catus*; 以下、本文中はネコと表記) をモデルとした数多くの研究がなされてきた (Pope, 2000; Pope et al., 2006a)。

ネコにおいて、性腺刺激ホルモン投与によって体内で成熟させた卵子を用いたIVFおよびET (IVF-ET) による産子の作出が1988年に世界で初めて報告された (Goodrowe et al., 1988)。その後、同様なホルモン処理の後に採取した体内成熟卵子を用いたIVF-ETによる産子作出が、トラ (Donoghue et al., 1990)、ステップヤマネコ (Pope et al., 1993)、リビアヤマネコ (Pelican et al., 2006)、カラカル (Pelican et al., 2006) およびオセロット (Wildt, 2009) においても報告されている。野生ネコ科動物のおよそ3分の1の種においてIVFの成功が報告されている

(Pope, 2000)。しかし、この方法により妊娠に至る確率は非常に低い (0~50%)。野生ネコ科動物における体内成熟卵子採取のためのホルモン処理に対する反応は動物種によって大きく異なり (Pukazhenthil and Wildt, 2004)、IVF-ETを用いた産子作出は実施されることが少なく、その再現性も乏しいことから、体内成熟卵子を用いたIVF-ETは、ネコ科動物の遺伝資源保存のための主たる手段には成り得ていない。

野生動物においてIVFを利用する最大の利点は、不慮の事故によって死亡した、あるいは何らかの理由により卵巣摘出術を受けた動物の卵巣内卵子を利用できることにあると考えられる。しかし、この方法で卵巣から採取できる卵子は未成熟卵子で、受精が可能となる核成熟を誘起させるためには、卵子を体外で成熟 (in vitro maturation, IVM) させる必要がある。ネコでは1989年に初めてIVM卵子を用いたIVF (IVM-IVF) についての報告がなされ (Johnston *et al.*, 1989)、その後、IVM法の改善が行われるとともに卵子の成熟能や発生能に影響を与える要因 (季節、卵巣周期および卵子形態) についての研究がなされてきた (Pope, 2000; Pukazhenthil and Wildt, 2004; Pelican *et al.*, 2006)。1997年にはIVM-IVF後の受精卵を体外培養 (in vitro culture, IVC) し、発生した桑実胚および胚盤胞をレシピエントの子宮内に移植して産子が得られている (Pope *et al.*, 1997)。ネコにおいては、ウシで利用されているフローサイトメトリーを用いたX精子とY精子を選別する技術を応用し、性選別精子によって作出した受精卵をETすることにより、望んだ性の産子も得られている (Pope *et al.*, 2009)。このようにIVM卵子を用いたネコへのART技術の応用は目覚ましく発展しているが、ネコをモデルとして行われている研究の大部分は、性成熟に達した個体から採取した卵巣を使用して行われている。一方、飼育下にある野生ネコ科動物の23.8~

50.0%は6ヶ月齢までに死亡しているという報告 (Wielebnowski, 1996) や野生のチーターでは、幼獣の95%が母親から独立する前に死亡しているという報告があり (Caro and Laurenson, 1994)、野生ネコ科動物にIVF-ET技術を応用するには、性成熟に達する前の動物から採取した卵子を体外で成熟させて用いる技術を開発する必要がある。

家畜においては後代検定の期間を短縮し、改良速度を早めるために性成熟前の動物から卵子を採取してARTに用いる試みが行われている。その結果、ウシやヒツジでは性成熟に達する前の個体から採取した卵子を用いて産子が作出されている (Armstrong et al., 1992; Ptak et al., 1999)。野生ネコ科動物においても性成熟前の卵子を利用できる技術を開発できれば、種の保存に寄与すると考えられる。ネコにおいて新生子や生後23日の幼若なネコの卵巣にも発育した卵胞が存在することが知られているが (Sneider, 1940; Shehata, 1974)、性成熟前の個体の卵巣に存在する卵胞の数や発育動態、卵胞内に存在する卵子の発生能についての報告はなされていない。性成熟前の様々な月齢のウシ (Taneja et al., 2000) およびヒツジ (Ptak et al., 2003) から採取した卵子を用いた研究では、月齢ともなってIVM後の卵子における受精後の発生能が向上したと報告されている。性成熟前の動物から採取される卵子の発生能の欠如は多くの研究で報告されており (Revel et al., 1995; Damiani et al., 1996; Levesque and Sirard, 1994; Ledda et al., 1999; O'Brien et al., 1997; Presicce et al., 1997)、その原因は卵子の細胞質にあると考えられてきた。一方で、ヒツジにおける核移植実験によって、卵巣内の発育が進んでいない卵子では核および卵細胞質ともに受精後の発生能が低いことが報告されている (Ptak et al., 2006)。しかし、ネコ科動物においてはこのような報告は全くなされておらず、性成熟前の月齢と得られる卵子の発生能の

関係を明らかにする必要がある。

ネコ卵巢内卵胞から得られた卵子の核成熟能および発生能には季節 (Freistedt et al., 2001; Spindler and Wildt, 1999)、卵巢周期 (Freistedt et al., 2001; Johnston et al., 1989; Karja et al., 2002; Naoi et al., 2008) および卵細胞質の形態や卵子を覆う卵丘の状態 (Katska-Ksiazkiewicz et al., 2003; Naoi et al., 2008; Pope et al., 1997; Wood and Wildt, 1997) が影響を及ぼしていることが報告されている。しかし、卵巢周期の影響は報告によって異なり一致していない。Freistedt et al. (2001) は、IVF後の卵割率および培養後8日目の胚盤胞への発生率は卵胞期および黄体期に比較して非活動期および排卵直後の卵巢で低かったと報告している。一方、Karja et al. (2002) は、卵割率および胚盤胞発生率は黄体期および非活動期に比較して卵胞期で低かったと報告している。さらにNaoi et al. (2008) は、卵割率および胚盤胞発生率に卵巢周期による影響はみられなかったと報告している。これらの報告間に差異が認められる原因として、卵巢周期の分類および培養条件の違いだけでなく、これらの報告では卵胞および卵子の大きさを考慮していないことが考えられる。ウシにおいては卵子の直径および卵子を採取した卵胞の直径が、卵子の核成熟率およびIVF後の発生率に影響することが知られている (Arlotto et al., 1996)。しかし、ネコにおいては、卵子直径は核成熟率に影響しないとの報告 (Otoi et al., 2001) があるものの、これらの卵子を含む卵胞の直径が卵子の体外成熟および発生能に与える影響についての報告はなされていない。これらのことから卵巢周期および卵胞直径が卵子の体外発生能に与える影響についても再検討する必要がある。

そこで、本研究における第1章において、性成熟に達する前の幼若なネコにおける卵巢発達と卵胞動態を評価するとともに、これらの供試動物から採取さ

れる卵子の体外における核成熟能と体外受精後の発生能を評価した。さらに、第2章において、性成熟前のネコおよび性成熟後のネコの卵巢周期（発情周期）が卵巢内に含まれる胞状卵胞の数および大きさに与える影響と、これらの卵胞から採取される卵子の核成熟能に与える影響を調べた。そして、第3章において、超生体染色によるネコ卵子の核成熟能の予測が可能かどうかを調べた。

これらの研究を通じて、様々な日齢のネコの卵巢に卵子がどの程度存在し、どのような卵子が体外発生能を有するかを明らかにすることで、事故等で死亡した野生ネコ科動物の卵巢における遺伝資源の活用を可能とし、絶滅の恐れがある野生ネコ科動物の保護・増殖に貢献すると想定される。

第1章 性成熟前のイエネコにおける卵胞発育および卵子性状の調査

緒言

動物園および繁殖施設で飼育されているネコ科動物において、23.8～50.0%が性成熟前の6ヶ月齢までに死亡すると報告され (Wielebnowski, 1996)、さらに野生チーターにおいては、95%もの幼獣が親離れする前に死亡すると報告されている (Caro and Laerenson, 1994)。飼育下にある野生動物の遺伝資源を有効活用するとともに、繁殖効率を向上させるためにはこれら性成熟前に死亡してしまった個体から配偶子を取り出し、利用することが望まれている。家畜および実験動物においては、世代間隔を短縮し、遺伝的改良速度を加速することを目的として性成熟前の動物から卵子を採取して胚産生および胚移植に用いる試みがなされている (Armstrong, 2001)。一方、野生動物において、性成熟前の動物を用いた胚産生および胚移植の報告はなく、性成熟前のネコ科動物から採取される卵胞内卵子を ART に活用できれば、ネコ科動物の保護・増殖に役立つ可能性がある。新生ネコ (Shehata, 1974) および23日齢の幼若なネコ (Sneider, 1940) において、卵巣中に胞状卵胞の存在することが報告されているものの、ネコの成長に応じた卵胞数の変化等の卵巣動態を詳細に調べた報告はない。また、卵巣切除術後に卵巣の大きさから性成熟前と推定した若齢なネコの卵巣内卵子を用いた IVM-IVF-IVC により胚盤胞が得られている (Davis et al., 2001) もの、体外での胚産生に利用可能な卵子がどの程度の日齢の幼若なネコから採取出来るかは明らかになっていない。

本章では、様々な日齢のネコ卵巣に遺伝資源として利用可能な卵子が存在するかを明らかにするため、組織学的手法を用いて、性成熟前の幼若なネコ (<20、20～40 および 100～120 日齢) の卵巣内における卵胞発育段階および卵胞内卵

子の形態学的な状態を調べるとともに、胞状卵胞から得られた卵子の体外発生能を IVM-IVF-IVC により調べた。

材料と方法

動物

性成熟前のネコ卵巣は鳥取県の管理する保護施設から提供を受けた。非妊娠であることが確認された性成熟後のネコ卵巣については、鳥取大学動物病院において避妊を目的として摘出されたものについて提供を受けた。提供を受けた期間は 2004 年 6 月から 2009 年 7 月までであった。鳥取大学動物実験規則を参照し、これらが動物実験に該当しないことを確認した。93 頭のネコ卵巣について重量を測定し、体重と両卵巣の平均重量の関係を評価した。なお、ネコの性成熟（春季発動）は体重 2.4 kg、生後約 220 日齢で起こる（Vercellini et al., 2018）と報告されていることから、体重 2.5 kg 以上の雌猫を性成熟後のネコ、2.0 kg 未満の雌猫を性成熟前のネコと判定した（以下、本論文では性成熟後のネコおよび性成熟前のネコと表記）。

卵巣の組織学的評価

卵胞および卵子の組織学的評価のため、11 頭分のネコ卵巣をその由来した個体の体重に従って以下の 3 つのグループに分類した：グループ A (240、250 および 290 g)、B (450、470 および 500 g) および C (1010、1040、1120、1280 および 1310 g)。既報（Festing et al., 1970; Rosenstein and Berman, 1973; Deag et al., 1987）に従い、グループ A、B および C の卵巣が由来するネコの生後日齢は、それぞ

れ<20日齢、20~40日齢および100~120日齢と推定した。卵巢を10%ホルマリンに72時間以上浸漬し、アルコール系列により脱水し、キシロールで透徹後、パラフィン包埋した。卵巢は、薄切面が卵巢門と平行になるように厚さ10 μm で連続薄切し、ヘマトキシリンおよびエオジンで染色した(1個体あたり約200~400枚)。卵胞を既報(Bristol-Gould and Woodruff, 2006)に従って、原始、一次、二次および胞状卵胞に分類した(図1)。すなわち、卵子が1層の顆粒層細胞に覆われているものを原始・一次卵胞と分類した。卵子が2層以上の顆粒層細胞に覆われ、卵胞腔の確認できないものを二次卵胞と分類とした。卵子が多層の顆粒層細胞に覆われ、卵胞腔を有するものを胞状卵胞(図2A)とした。1つの卵胞内に2個以上の卵子が観察されたものは多卵子卵胞(MOF, multi-oocyte follicle: 図2B)と分類した。本研究において、卵子が確認できないあるいは透明帯のみが確認された卵胞様構造は卵胞に分類しなかった。原始・一次卵胞の数および卵原細胞の分裂の有無を卵巢の長径が最大となる薄切標本1枚において倍率100倍で評価した。二次および胞状卵胞数は片側卵巢のすべての薄切標本において倍率100倍で卵子の核数を計測することにより評価した。卵胞直径(卵胞膜を含まない)については、直径400 μm 以下の卵胞については倍率100倍で、直径400 μm 以上の卵胞については倍率40倍で、直交する2つ直径を接眼マイクロメーターを用いて計測し、その平均値として算出した。変形した卵胞やMOFについては計数のみを行い、卵胞直径は算出しなかった。卵子の形態は薄切標本を倍率400倍で観察することで評価した。球状で第一成熟分裂前期(卵核胞期)である核を持つ卵子は正常卵子と判断した。一方、卵細胞質の溶解、萎縮および断片化がみられる、もしくは異常な核およびエオジンに強染色される卵細胞質をもつ卵子を変性卵子(図2C)と分類した。MOFの

卵子は形態学的な評価を行わなかった。

性成熟前のネコ卵子の核成熟能および発生能

卵子の核成熟能を確認するため、卵丘卵子複合体 (COCs, cumulus-oocyte-complexes) を 20 頭分のネコ卵巢から採取した。そのうち卵巢の由来するネコ 7 頭は体重 2.5 kg 以上であったことから性成熟後と判定した。その他卵巢が由来するネコ 13 頭は、体重に従ってグループ B (n=6; 535.0 ± 135.8 g) およびグループ C (n=7; 1174.3 ± 143.4 g) に分類し、性成熟前と判定した。前述のグループ A では胞状卵胞が確認できなかったことから組織学的評価や卵子の採材は行わなかった。グループ C の 2 頭分のネコ卵巢については二等分し、半分を COCs 回収に用い、残りの半分を組織学的評価に用いた。組織学的評価において、これら 2 頭それぞれの胞状卵胞直径の平均 (404.5 ± 103.4 μm および 332.8 ± 102.5 μm) は、前述の組織学的評価のみを行ったグループ C の胞状卵胞の直径 (データは結果に記載) と同等であった。さらに、半分の卵巢 (2 頭分) から得られた COCs は IVM だけでなく IVF および IVC にも使用した。性成熟前のネコ卵巢から採取した卵子の受精能および胚盤胞への発生能を確認するため、IVF および IVC の対照区として、6 頭分の性成熟後のネコ卵巢 (IVF に 3 頭分、IVC に 3 頭分) から得られた COCs を使用した。

IVM、IVF および IVC のための COCs の採取は、既報に従い行った (Nagano et al., 2008)。具体的には、採取した卵巢は室温で生理食塩水に浸漬し、1 時間以内に実験室へ搬入した。その後、卵巢を単離培地 (Harada et al., 1997: 0.1% ポリビニルアルコール (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA)、25 mM HEPES (Sigma)、0.85 mg/ml NaHCO₃ (Kanto Chemical Co. Inc., Tokyo, Japan)、50 μg/ml 硫

酸ゲンタマイシン (Sigma) を含む TCM199 (Cat. No. 31100; Gibco Laboratories Grand Island, NY, USA) に移した。卵巢は長軸に沿ってハサミで切断し、卵巢髄質を除去した後、皮質を単離培地内で小片になるよう薄切し、実体顕微鏡下で観察しながら 25 ゲージの注射針を用いて胞状卵胞を切開した。胞状卵胞の切開面から COCs を回収し、新鮮な単離培地に移して実体顕微鏡下 (倍率×15～50) でこれらの形態を観察した。複数層の緊密な卵丘細胞に覆われ、均一な顆粒状の黒色細胞質を有する卵子を以降の実験に用いた。

体外成熟培養

COCs は成熟培地 (3 mg/ml 脱脂ウシ血清アルブミン(BSA) (Sigma)、0.02 IU/ml 卵胞刺激ホルモン (FSH) (Sigma)、1 µg/ml エストラジオール 17β (Sigma)、0.2 mM ピルビン酸ナトリウム (Sigma) および 50 µg/ml 硫酸ゲンタマイシン (Sigma) を含む 25 mM HEPES 緩衝 TCM 199 (Cat. No. 12340, Earle's salt; Gibco) で 1 回洗浄し、パラフィンオイル (Nakarai Tesque, Kyoto, Japan) で覆った 50 µl の成熟培地の微小滴内 (10～15 COCs/微小滴) に移して 39°C、5% CO₂ の湿度飽和気相下で 30 時間培養した。

体外受精

ネコ精子は鳥取大学附属動物病院から提供を受けた去勢後の 2 頭分の雄猫 (体重約 2.5 kg、推定 6～7 ヶ月齢) 精巣上体尾部から回収し、同一性状の凍結精液を十分量確保するために 2 頭分を混ぜ合わせて 0.25 ml ストロー (精子濃度 12.5×10^6 個/ml) 内に封入し、既報 (Tsutsui et al., 2000; 2003) に従い凍結保存して、実験に使用した。凍結精子はストローを 37°C の温湯に 30 秒間浸すこ

とで融解した。融解後、約 30%の精子に前進運動が見られた。融解した精子は事前に温めた 5 ml の修正 Bracket & Oliphant (mBO) 等張液 (Brackett and Oliphant, 1975) と混和し、2 回遠心 ($500 \times g$ 、5 分) することで洗浄を行った。洗浄後、精子浮遊液中の精子濃度が 30×10^6 個/ml になるように mBO 等張液量を調整した。50 μ l の精子浮遊液を fatty-acid free BSA (6 mg/ml)、テオフィリン (5 mM; Sigma) を含んだ同量の修正 BO 等張液の微小滴に加え、パラフィンオイル (Nakarai Tesque) で覆った (最終精子濃度 15×10^6 個/ml)。IVM 後、10~15 個の COCs を精子の入った微小滴に入れ、 39°C 、5% CO_2 の湿度飽和気相下で 18 時間共培養した。

卵子の核成熟および受精の評価

IVM および IVF 後、COCs をボルテックスミキサーで振盪し、卵丘を完全に剥がした。その後、エタノールと酢酸 (3 : 1) の混合液で固定し、1%アセトオルセイン液で染色を行った。核相および前核の有無は既報に従って位相差顕微鏡下で評価した (Nagano et al., 2006a, b)。第二成熟分裂中期に達した卵子を成熟卵子と判定した。IVF 後に 2 つの前核 (雌雄両前核と想定される) が存在するものは正常受精と判定した。一方、3 個以上の前核もしくは膨化した精子頭部が卵子内にみられるものは多精子受精と判断した。卵子が IVM および IVF 直後に 2 細胞期以上に達していたものは過去の研究 (Hoffert et al., 1997) においてネコ卵子の体外培養で報告されている単為発生胚と判定した。

胚の体外培養と胚発生の評価

IVF 後の卵子をボルテックスミキサーで振盪し卵丘細胞の除去した後、発生

培地で3回洗浄した。発生培地には、修正合成卵管液 (mSOF ; Takahashi et al., 1996) (本研究では、ポリビニルアルコールの代わりに 3 mg/ml の BSA を添加) を使用した。過去の報告に従って (Takahashi et al., 1996; Nagano et al., 2008)、全ての卵子はパラフィンオイル (Nakarai Tesque) で覆った 30 μ l の微小滴に 15~30 個ずつ入れ、39°C、5% CO₂、5% O₂ および 90% N₂ の湿度飽和気相下で 150 時間 (IVF 開始後 7 日間) 培養した。培養後、卵割した胚および胚盤胞に発生した胚の割合を評価した。胚盤胞は固定後、エアードライ法 (Takahashi and First, 1992) によって細胞の数を計測した。

統計学的解析

全ての統計学的解析には JMP Version 5 (SAS Institute Inc., Cary, NC, U.S.A.) を用いた。全ての数値は平均 \pm 標準偏差で示した。体重と卵巢重量の関係を示すために分散図を作成し、外れ値を除外した。グループ A、B および C における体重、卵巢重量、卵胞数、卵胞直径および二次卵胞内卵子の形態学的な正常性の比較には一元配置分散分析を用い、その後 Turkey-Kramer's honestly significant difference (HSD) test を行った。胞状卵胞の直径および胞状卵胞内の卵子の形態学的な正常性において、2つのグループの比較には Student's *t*-test を用いた。IVM、IVF および IVC のデータは χ^2 検定を用いて解析した。p < 0.05 の場合、統計学的に有意差ありと判定した。

結果

供試動物 (n = 88) の体重と卵巢重量の関係を図 3 に示した。93 頭のうち 5

頭については外れ値 ($p < 0.05$) を示したため結果から除外した。近似曲線として対数曲線 ($y = 40.6 \ln(x) - 198.3$) を当てはめたところ近似性を示し ($r^2 = 0.7364$, $p < 0.05$)、卵巢重量は体重約 1,000 g に達するまでに急激に増加することがわかった。体重 1,000~1,500 g のネコの卵巢重量 (97.2 ± 19.8 mg) は、体重 500 g 以下のネコ (42.8 ± 13.4 mg) および体重 500~1,000 g のネコ (55.4 ± 14.0 mg) よりも有意に重く ($p < 0.05$)、体重 1,500~2,000 g のネコ (97.9 ± 20.0 mg) と同等であった。体重 2,000g 以上のネコの卵巢重量 (123.0 ± 28.5 mg) は他の体重群よりも有意に重かった ($p < 0.05$)。グループ A、B および C における卵胞数を表 1 に示した。全てのグループにおいて多数の原始・一次卵胞が卵巢の表皮直下の皮質部分に観察された。原始・一次卵胞数はグループ B、C に比較してグループ A で有意に多かった ($p < 0.05$)。すべての標本において体細胞分裂している卵原細胞は観察されなかった。3 つのグループにおける卵巢中の二次卵胞数に有意差はみられなかった。胞状卵胞はグループ B および C のすべての卵巢で観察されたが、グループ A では 3 頭中 1 頭の卵巢にのみ観察されたものの有意差はみられなかった。図 4 に示したとおり、体重が増加するに従って二次卵胞の直径は有意に増加した (グループ A: 112.4 ± 24.2 μm 、グループ B: 153.6 ± 37.0 μm およびグループ C: 171.1 ± 38.8 μm 、 $p < 0.05$)。グループ C の胞状卵胞直径 (373.4 ± 129.9 μm 、範囲 135~965 μm) はグループ B (265.3 ± 65.5 μm 、範囲 160~570 μm) に比較して大きかった ($p < 0.05$)。グループ C の 2 頭のネコにおいて、直径 800 μm 以上の胞状卵胞が 2 個観察された (直径 825 および 965 μm)。

性成熟前のネコの二次卵胞において、グループ A、B および C における正常卵子の割合はそれぞれ 36.5 ± 5.0 、 45.1 ± 18.8 および $67.6 \pm 3.4\%$ であり、グルー

プ C は他のグループに比較して有意に高かった ($p < 0.05$) (図 5)。胞状卵胞において、グループ C ($32.1 \pm 4.7\%$) の正常卵子の割合はグループ B ($7.7 \pm 5.4\%$) に比較して高かった。グループ C における直径 $800 \mu\text{m}$ 以上の 2 つの胞状卵胞の卵子は変性していた。グループ A、B および C の二次卵胞における MOF の割合はそれぞれ 4.6 ± 3.0 、 4.9 ± 4.0 および $3.3 \pm 3.5\%$ であり、有意差はみられなかった。グループ B および C の胞状卵胞における MOF の割合はそれぞれ 5.1 ± 8.1 および $2.9 \pm 1.7\%$ であり、有意差はみられなかった。グループ A のネコ卵巣に存在した胞状卵胞 5 個中の 2 個は MOF であった。

本研究でもちいた性成熟後のネコの卵巣には排卵後の出血体や黄体は観察されなかった。グループ B のネコ卵巣において、実体顕微鏡下で胞状卵胞を見つけることは困難であり、1 個の卵子のみ回収したものの、IVM 後の核相は卵核胞期であった。グループ C のネコから 223 個の卵子を回収したが、そのうち 5 個を卵丘除去のためのボルテックス操作中に失った。表 2 に示したとおり、IVM 後、卵核胞期の卵子の割合は性成熟後のネコに比較して、性成熟前のネコで有意に高かった ($p < 0.05$)。IVF 後に正常受精した卵子の割合は、性成熟後のネコに比較して性成熟前のネコで有意に低かった ($p < 0.05$) (表 3)。総精子侵入 (正常受精および多精子受精) 率も同様に性成熟後のネコに比較して、性成熟前のネコで有意に低かった ($p < 0.05$)。IVF 後、性成熟前のネコおよび性成熟後のネコの両方で単為発生がみられた。体外培養後、性成熟前のネコ卵子から胚盤胞を得ることが出来た (図 6)。しかし、卵割率および胚盤胞率は性成熟後のネコに比較して、性成熟前のネコで有意に低かった ($p < 0.05$ 、表 4)。一方、分割胚が胚盤胞へ発生する割合は、性成熟前のネコ (29.1% 、 $8/28$) および性成熟後のネコ (43.8% 、 $21/48$) 間に有意な差はなかった。胚盤胞の平均細胞数は性成熟

前のネコおよび成熟後のネコの間で有意な差はみられなかった。

表 1. 性成熟前のイエネコにおける体重と各発育ステージの卵胞数の関係

グループ*	実験 頭数	卵巢重量 (mg)	各発育ステージの卵胞数 (個)		
			原始・一次**	二次***	胞状***
A	3	35.2 ± 3.6 ^a	1736.7 ± 183.7 ^a	179.7 ± 92.1	1.7 ± 2.9
B	3	54.4 ± 17.9 ^a	832.0 ± 610.6 ^b	373.0 ± 318.6	82.0 ± 23.6
C	5	93.6 ± 7.9 ^b	364.2 ± 179.2 ^b	83.6 ± 32.3	125.0 ± 89.2

^{a, b} 同列異符号間に有意差あり ($p < 0.05$).

数値は平均値 ± 標準偏差.

*A : <20 日齢、B : 20~40 日齢および C : 100~120 日齢.

**1 枚の組織標本中の卵胞数.

***1 個の卵巢中の卵胞数.

表 2. イエネコの性成熟と卵子核成熟能の関係

性成熟	実験 頭数	実験に 用いた 卵子数	成熟培養後の核相* (%)					
			GV	GVBD	MI	MII	単為発生 変性	
成熟前**	7	118	43.2 ^a	0	5.9	48.3 ^a	0 ^a	2.5
成熟後	7	101	11.9 ^b	2.0	5.9	71.3 ^b	5.9 ^b	3.0

^{a, b} 同列異符号間に有意差あり (p < 0.05) .

*GV - 卵核胞期; GVBD - 卵核胞崩壊; MI - 第一減数分裂中期;

MII - 第二減数分裂中期; 単為発生 - 2 細胞期以上.

** グループ C (体重 1174.3 ± 143.4 g).

表 3. イエネコの性成熟と体外成熟卵子の受精能の関係

性成熟	実験 頭数	体外受精 卵子数	総受精率 (%)	正常受精率 (%)	多精子侵入率 (%)	単為発生率 (%)	その他* (%)
成熟前**	2	40	22.5 ^a	15.0 ^a	7.5	2.5	75.0 ^a
成熟後	3	42	50.0 ^b	42.9 ^b	7.1	7.1	42.9 ^b

^{a, b} 同列異符号間に有意差あり ($p < 0.05$).

* 卵核胞期～第二減数分裂中期および変性.

** グループ C (体重 1174.3 ± 143.4 g).

表 4. イエネコの性成熟と体外受精後の発生能の関係

性成熟	実験頭数	培養卵子数	卵割率 (%)	胚盤胞率 (%)	胚盤胞の細胞 (n)
成熟前*	2	60	46.7 ^a	13.3 ^a	113.0 ± 25.2 (6)
成熟後	3	66	72.7 ^b	31.8 ^b	134.9 ± 57.3 (19)

^{a, b} 同列異符号間に有意差あり ($p < 0.05$).

* グループ C (体重 1174.3 ± 143.4 g).

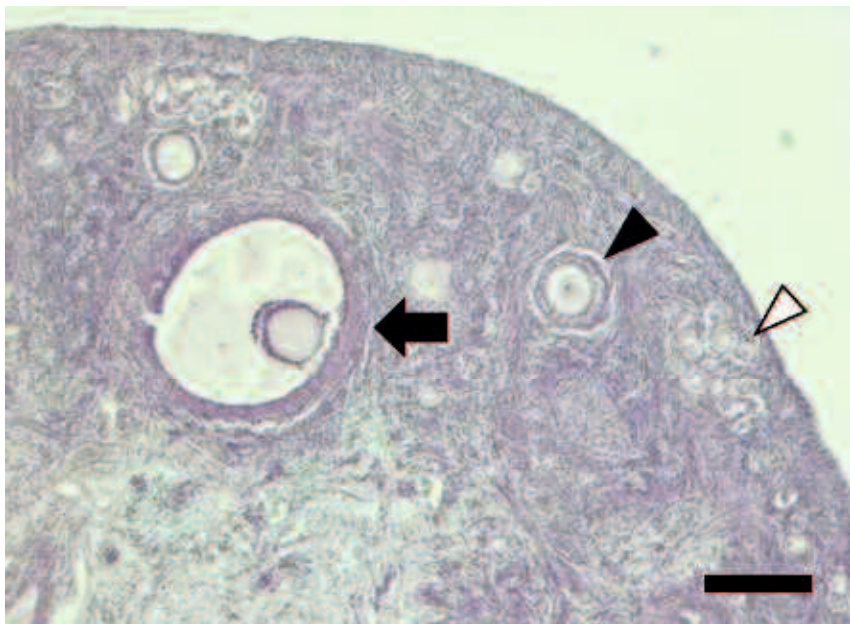


図 1. 性成熟前のイエネコ卵巣における卵胞の種類

矢頭 (白): 原始・一次卵胞.

矢頭 (黒): 二次卵胞.

矢印: 胞状卵胞.

スケールバー = 200 μm .

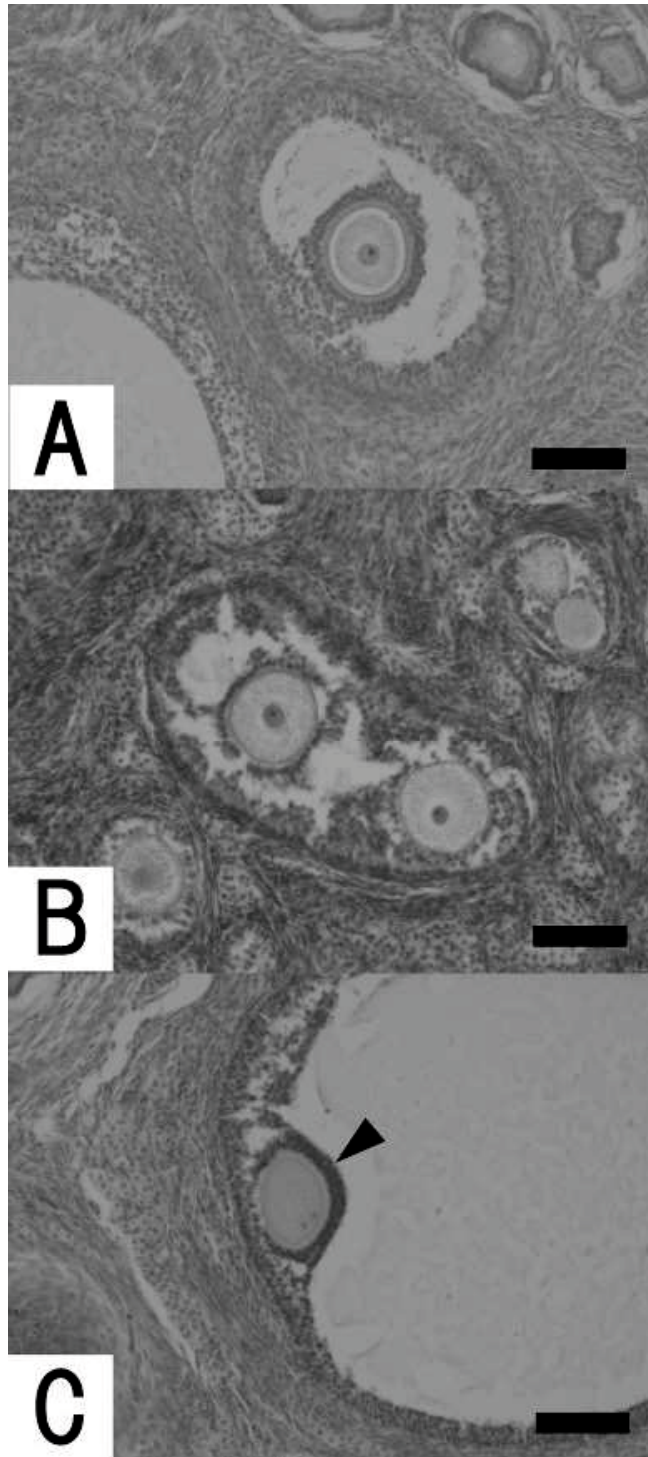


図 2. 性成熟前のイエネコ卵巢における胞状卵胞の形態

A: 正常な卵子を有する胞状卵胞 (グループ C).

B: 多卵子卵胞 (グループ B).

C: 扁平な卵丘細胞に覆われた変性卵子を有する胞状卵胞 (矢頭、グループ C).

スケールバー = 100 μm .

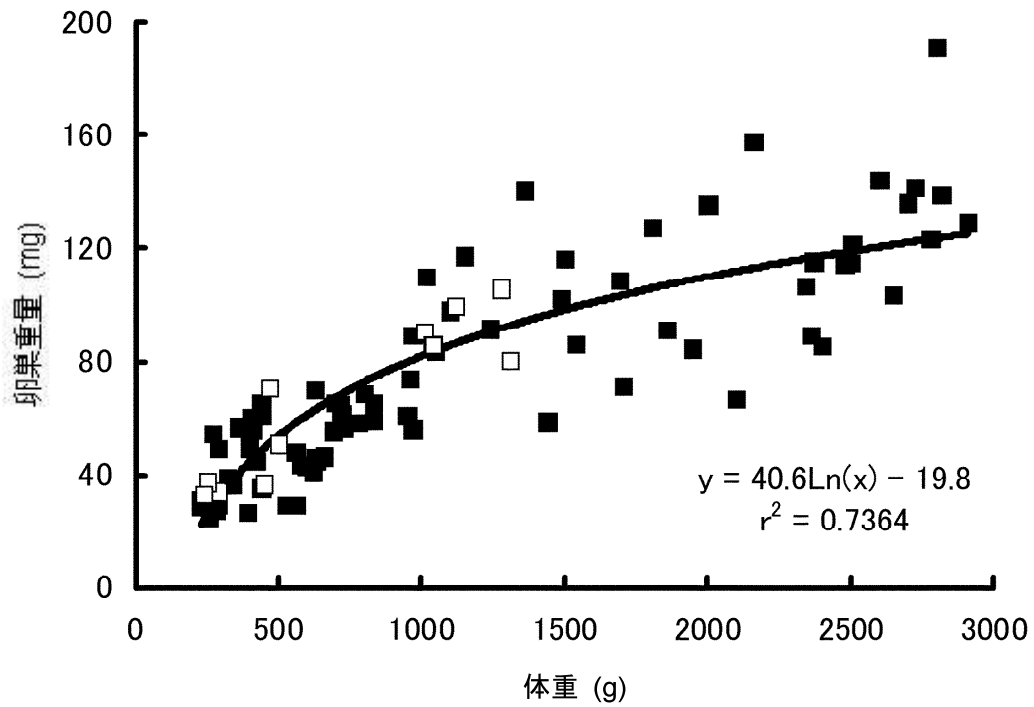


図 3. イエネコの体重と卵巢重量の関係 (n = 88)

白抜き四角は組織学的検索を行った 11 頭: グループ A (体重 240~290 g)、B (450~500 g) および C (1,120~1,310 g).

5 頭のイエネコは外れ値を示したため解析から除外した ($p < 0.05$).

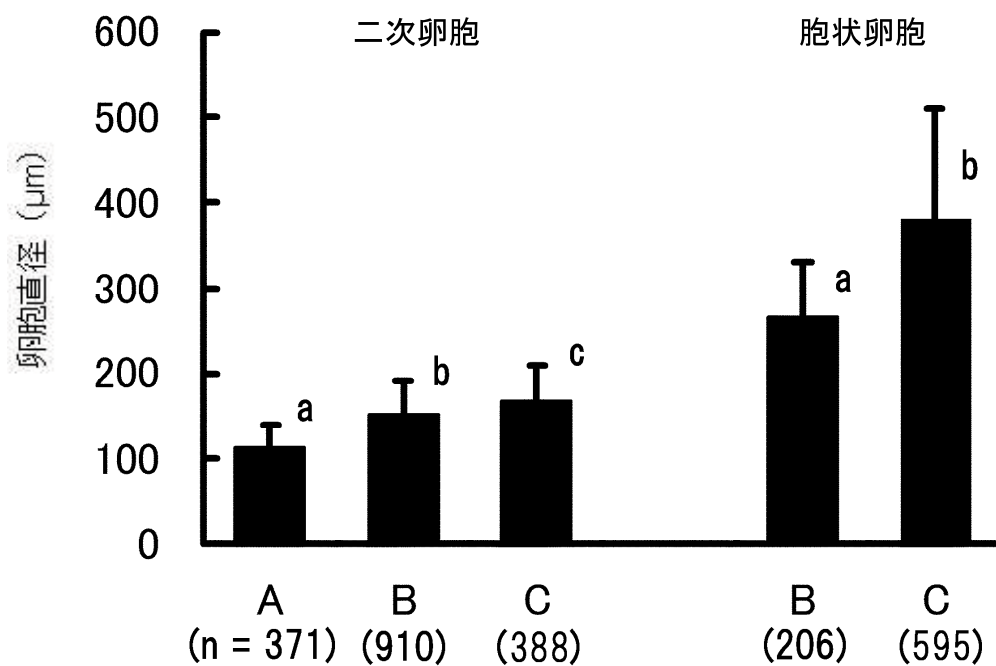


図 4. 性成熟前のイエネコにおける二次および胞状卵胞の平均直径

平均直径±標準偏差を示す.

各卵胞グループ内において、異符号間に有意差あり ($p < 0.05$).

グループ A(3 頭; 体重 240~290 g)、B(3 頭; 450~500 g) および C(4 頭; 71,120~1,310 g). 括弧内は検査卵胞数.

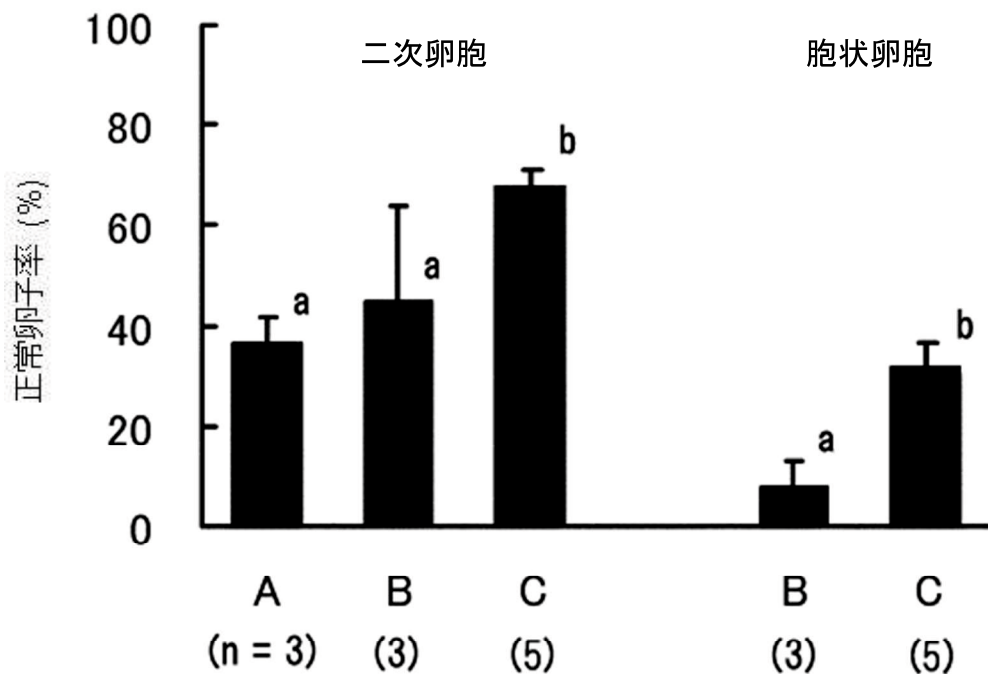


図 5. 性成熟前のイエネコの二次および胞状卵胞中に含まれる形態学的に正常な卵子の割合

平均直径±標準偏差を示す.

各卵胞グループ内において、異符号間に有意差あり ($p < 0.05$).

グループ A (3 頭: 体重 240~290 g)、B (3 頭: 450~500 g) および C (4 頭: 1,120~1,310 g). 括弧内は実験に用いた供試動物の頭数.

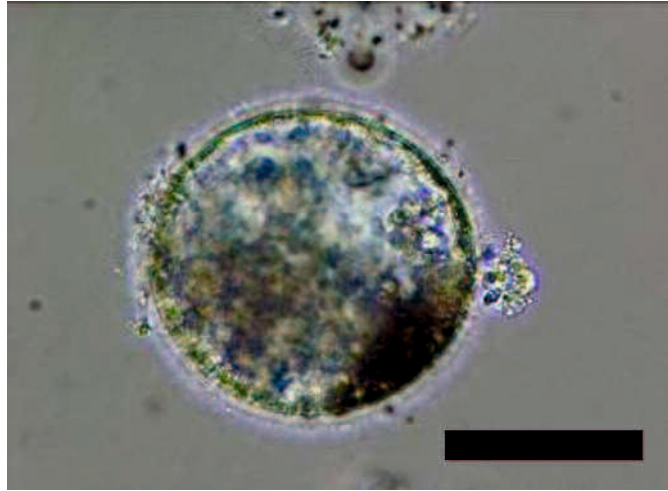


図 6. 性成熟前のイエネコの卵子から作出した胚盤胞
スケールバー = 100 μm .

考察

本研究の結果から性成熟前のネコにおいて、卵巢重量は体重が約 1,000 g (推定 100 日齢) に達するまで急激に増加し、その後ゆっくりと増加することが明らかとなった。この卵巢重量の増加は胞状卵胞の数および二次卵胞の直径の増加に起因していると考えられた。同様の結果が他の動物でも報告されている (ヒツジ、Mahdi and Khallili, 2008; ウシ、Desjardins and Hafs, 1969)。また、二次および胞状卵胞の直径増加はこれらに含有される正常卵子率の上昇と関係していた。脳下垂体前葉から分泌される FSH は間接的に前胞状卵胞の発育を刺激し、胞状卵胞および卵子の発育を促進させる (Monniaux et al., 1997)。すなわち、性成熟前のネコにおいては成長とともに FSH 分泌量が増加したと推測される。しかし、性成熟前のネコにおける FSH 分泌動態は研究されておらず、FSH 分泌と卵胞・卵子の正常性の関係については今後の検討課題である。

100~120 日齢の性成熟前のネコ (グループ C) において直径 800 μm 以上の胞状卵胞が観察されたものの、これらの卵胞内卵子は変性の兆候を示していた。ネコでは、直径 1 mm 以下の卵胞で観察される卵子変性は卵胞閉鎖の初期兆候として観察されることから (Woods et al., 1997)、これらの卵胞は閉鎖過程にあることが推察される。性成熟後のネコでは直径 800 μm 以上の胞状卵胞の顆粒層細胞において、黄体形成ホルモン (luteinizing hormone, LH) レセプターが強く発現し、排卵にいたる (Saint-Dizier et al., 2007)。排卵前の胞状卵胞の発育には LH 分泌 (Moniniax et al., 1997) が必須であることから、性成熟前のネコにおいて直径 800 μm 以上に発育した胞状卵胞は、不十分な LH 分泌あるいは顆粒層細胞での LH レセプターの低発現によって、排卵するまで発育することなく

閉鎖に至ったと考えられた。一方で、本章に用いた性成熟ネコの卵巢についても卵胞が排卵した後に形成される出血体や黄体は認められなかった。このことはネコが交尾排卵であること (Wildt et al., 1981) から、十分に発達した胞状卵胞がある性成熟ネコの卵巢についても、卵巢が由来するネコへの供試前の交尾刺激がなかったことが考えられた。

本研究では、20日齢以下 (グループ A) の1頭のネコにおいて胞状卵胞が観察された。この結果は、新生時のネコ (Shehata, 1974) および 23日齢のネコ (Sneider, 1940) の卵巢に胞状卵胞存在したという報告に一致する。本研究の結果は、ネコにおいて胞状卵胞の発育が 20日齢前に始まっているというこれらの報告を支持するものである。ネコ卵巢における卵原細胞から卵母細胞への分化は生後 8日までに完了する (Peters and McNatty, 1980) とされているが、Sneider (1940) は、ネコにおいて 46日齢まで卵原細胞は増殖し、その日齢まで原始卵胞数は増加すると報告している。本研究においては卵原細胞の分裂像は観察されず、原始・一次卵胞の数はグループ A (20日齢以下) に比較してグループ B (20~40日齢) で少なかった。Sneider (1940) は卵巢の全ての薄切標本で観察したのに対し、本研究では卵巢 1個に対して 1枚の薄切標本のみの観察しか行っていないため、卵原細胞の分裂が起こっていたかは明らかではない。しかし、生後 20日齢以降に卵原細胞が増殖・分化することで原始・一次卵胞数が増加することは考えにくく、これら原始・一次卵胞を遺伝資源として活用する場合は、生後 20日齢以下のネコ卵巢から多く得ることが出来ると考えられる。

MOF は哺乳類の正常な卵巢に観察されるが、特にネコ、イヌ、ウサギ、アカゲザルおよびヒトで多く観察される (Telfer and Gosden, 1987)。発生初期の卵巢

内では卵子は oocyte nest と呼ばれる網状構造の中に集族していることが知られており、MOF は oocyte nest の不完全な崩壊によって顆粒層細胞が複数の卵子を囲んだままになることによって発生すると考えられている (Jefferson et al., 2006)。Shehata (1974) は、MOF は新生時のネコに観察されるが、それよりも成長の進んだ性成熟前および性成熟後のネコでは観察されなかったと報告している。一方、Telfer and Gosden (1987) は性成熟後のネコにおいても全卵胞中の約 4% は MOF であったと報告している。本研究においても、MOF の割合 (2.1 ~ 5.1%) は 20 日齢以下から 100 ~ 120 日齢まで同等であり、Telfer and Gosden (1987) の報告にある性成熟後のネコでの割合と同程度である。これらのことからネコにおいては、MOF は日齢に関係なく卵巣に存在すると考えられる。これら MOF 内に存在する卵子が受精能を有するかはわかっていないが、マウスでは排卵直前の大きさまで成長した MOF が観察されており (Alm et al., 2010)、卵巣内に多くの MOF が観察されるイヌでは卵管還流によって黄体数よりも多い数の胚が採取される場合があることが報告されている (Reynaud et al., 2009b)。このことから MOF 内の卵子が排卵および受精可能であることが示唆されており、採取して利用や保存に供すれば遺伝資源として活用できると考えられる。

本研究においては、性成熟前のネコから採取した卵子は核成熟率、正常受精率、受精卵の卵割率および胚盤胞への発生率は性成熟後のネコに比較して低かった。しかし、卵割した受精卵が胚盤胞へ発生する割合および胚盤胞の細胞数は性成熟後の卵子と同程度であった。この結果は、Davis et al. (2001) の報告と一致する。これらのことから、性成熟前であっても、卵巣内に存在する卵子の一部は性成熟後のネコ卵子と同等の発生能を有すると考えられた。一方、100 ~ 120 日齢 (グループ C) のネコから得られた卵子は体外で核成熟し、受精し、

胚盤胞まで発生したものの、20～40日齢（グループB）のネコ卵巢からは1つの卵子しか得ることが出来ず、核成熟能も示さなかった。ネコにおいて卵胞腔の形成は卵胞直径が160～200 μm時に始まる（Reynaud et al., 2009a）とされており、グループBの胞状卵胞の平均直径は $265.3 \pm 65.5 \mu\text{m}$ であったことから、多くが卵胞形成直後と考えられた。すなわち、光学顕微鏡下で多くの胞状卵胞が観察されるものの、実体顕微鏡下では卵胞腔が小さすぎて発見できない可能性が考えられる。本研究の結果は100日齢以上のネコの卵巢にはARTに用いることが出来る卵子が数多く存在し、20～40日齢のネコの卵子を用いることは困難であることを示唆している。それゆえ、今後は卵胞腔形成直後の卵胞からの卵子の効率的な回収方法を開発する必要があると考えられる。一方、20日齢以下のネコ（グループA）の卵巢にはほとんど胞状卵胞が存在せず、多くの前胞状卵胞が存在することがわかった。性成熟後のネコを用いた研究では、前胞状卵胞を単離して体外培養することによって初期胞状卵胞にまで発育可能であることが報告されている（Jewgenow and Pitra, 1993）。今後は、20日齢以下のネコにおける前胞状卵胞の回収方法および卵胞培養方法を検討する必要がある。

以上の結果から、性成熟前のネコにおいては、成長とともに二次および胞状卵胞直径の増加し、より発育した卵胞が存在することが示唆された。さらに形態学的に正常な卵子は成長に従って増加し、100～120日齢の性成熟前のネコから採取される卵子は胚盤胞への発生能を有することが明らかになった。これらのことから、性成熟前に死亡した野生のネコ科動物であっても卵巢を採取することができれば、ARTによって移植可能胚を体外で作製出来ることが示唆された。

第2章 イエネコ卵子の核成熟能に与える卵巢周期および卵胞直径の影響

緒言

第1章において、性成熟前のネコ卵巢から採取される卵子は体外培養により胚盤胞に発生することが明らかとなった。しかし、性成熟前のネコ卵巢に存在する胞状卵胞直径は性成熟後のネコに比較して小さく、採取される卵子の発生能も低かった。牛においては、胞状卵胞の大きさが卵子の発生能に影響していることが報告されている (Lonergan et al., 1994; Pavlok et al., 1992)。ネコにおいて、卵子の体外における核成熟能および発生能は季節 (Freistedt et al., 2001; Spindler and Wildt, 1999)、卵巢周期 (Freistedt et al., 2001; Johanston et al., 1989; Karja et al., 2002; Naoi et al., 2008) および卵丘や卵子の形態学的性状 (Kaska-Ksiazkiewicz et al., 2003; Naoi et al., 2008; Pope et al., 1997; Wood and Wildt, 1997) に影響されると報告されているが、卵巢に存在する卵胞数や卵胞の大きさが卵子の核成熟能に与える影響については明らかにされていない。効率的に移植可能胚を体外生産するためには、ネコ卵子の核成熟能に関する知識を蓄積する必要がある。そこで本章では、性成熟前後のネコから卵巢を採取し、卵巢周期および卵胞の大きさがネコ卵子の形態学的性状および核成熟能に与える影響を調べた。

材料と方法

動物および卵巢採取

鳥取大学動物病院および鳥取市にある動物病院から避妊を目的として摘出

された 22 頭分の性成熟ネコの卵巣の提供を受けた。5 頭分の性成熟前のネコ (体重 740~1,270 g; 推定 60~120 日齢) の卵巣 (未成熟期) は鳥取県の管理する保護施設から提供を受けた。これらの卵巣は 2008 年 1 月から 10 月に採取した。性成熟後のネコの卵巣周期は以下の 3 グループ、直径 2 mm 以上の卵胞と黄体 (corpus luteum, CL) が存在しない非活動期 (n = 8)、片方もしくは両方の卵巣に直径 2 mm 以上の卵胞が 1 個もしくは複数個存在する卵胞期 (n = 7) および 1 個以上の CL が片方もしくは両方の卵巣に存在する黄体期 (n = 7) に分類した。

胞状卵胞からの卵子採取

第 1 章と同様の方法により、COCs を採取した。すなわち、採取した卵巣を単離培地中で長軸に沿って切断し、卵巣髓質を除去した後、皮質を単離培地内で小片になるよう薄切して実体顕微鏡下で直径 400 μm 以上の胞状卵胞を 18 ゲージの注射針で単離した。単離卵胞は新しい単離培地に移し、接眼マイクロメーターを用いて直交する 2 つの直径を測定し、その平均値として卵胞直径を算出した。直径 400 μm 以下の胞状卵胞を発見し、単離することは困難であったため、本実験には用いなかった。単離した卵胞は直径により 3 つのグループ (400~800、800~1,200 および 1,200~2,000 μm) に分類した。実体顕微鏡下で観察しながら 25 ゲージの注射針を用いて胞状卵胞を切開した。切開した卵胞内から COCs を回収し、新鮮な単離培地に移し、実体顕微鏡下 (倍率 $\times 15\sim 50$) でこれらの形態を観察した。複数層の卵丘細胞に緊密に覆われ、均一な顆粒状の黒色な細胞質をもつ卵子を形態学的な正常卵子と判定し IVM に用いた。回収した COCs は倒立顕微鏡に接続したデジタルカメラを用いて撮影し、パソコ

ンを用いて直交する二つの直径の平均値として卵子直径 (透明帯を除く) を算出した。

卵子の体外成熟培養

COCs は第 1 章と同様の成熟培地で一回洗浄した後、パラフィンオイル (Nakarai Tesque) で覆った成熟培地の 10 μ l 微小滴内に 1 個ずつ移し、39°C、5% CO₂ の湿度飽和気相下で 30 時間培養した。

卵子の核成熟および受精の評価

IVM 後、卵子直径と同等の内径になるように作製したパスツールピペットを用いて、ピッペティング操作によって COCs から卵丘細胞を剥離し、裸化卵子とした。裸化卵子はエタノールと酢酸 (3 : 1) の混合液で固定し、1%アセトオルセイン液で染色を行った。核相は、第 1 章と同様の方法で位相差顕微鏡を用いて評価を行った。核膜が明確に見えるものを卵核胞期 (GV) とした。卵核胞崩壊から第一成熟分裂終期の卵子を卵核胞崩壊 (GVBD) ~第一減数分裂終期 (TI) 期とした。染色体が赤道面に整列し、第一極体の観察される卵子を第二成熟分裂中期 (MII) と判定した。2 つ以上の割球が確認された場合、単為発生と判定した。卵細胞質が萎縮あるいは卵細胞質内に空胞形成の確認された卵子は変性と判定した。

実験計画

卵巣周期と卵胞発育の関係を評価するため、各卵巣周期について胞状卵胞数を調べるとともに、回収した卵胞の直径を測定した。次に、卵胞発育と卵子の

正常性の関係进行评估するため、各卵巢周期において、異なる直径の卵胞から回収された COCs の形態进行评估した。最後に、卵胞発育と卵子の発育および核成熟能の関係を評価するため、各卵巢周期における異なる直径の卵胞から採取された卵子の直径を測定するとともに、個別に IVM し、その核相を評価した。

統計学的解析

統計学的解析には JMP Version 7.0.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, U.S.A.) を用いた。卵胞数および卵子直径の値は平均値 ± 標準偏差で示した。供試動物 1 頭あたりの全卵胞数の比較には Turkey-Kramer's honestly significant difference (HSD) test を用いた。卵巢周期 (未成熟、非活動、卵胞および黄体) と卵胞の大きさ (直径 400~800、800~1,200 および 1,200~2,000 μm) が卵胞数と卵子直径に与える影響は Turkey-Kramer's HSD test によって解析した。卵子の形態学的正常性および核成熟率は χ^2 検定を用いて解析した。p < 0.05 の場合、統計学的に有意差ありと判定した。

結果

各卵巢周期における 1 頭あたりの卵胞数の関係を表 5 に示した。卵巢周期間で総卵胞数に有意差はみられなかったが、全ての卵巢周期において、卵胞直径が大きくなるにつれて卵胞数は少なくなった (p < 0.05)。各卵巢周期間では、直径 400~800 および 800~1,200 μm の卵胞数に差異はみられなかった。性成熟前のネコにおいて、1,200~2,000 μm の卵胞は 5 頭中 2 頭からそれぞれ 1 個

ずつ観察された。

様々な卵巢周期の卵巢から採取される卵胞の直径と卵子の形態学的正常性について表 6 に示した。各卵巢周期において、形態学的に正常な卵子は卵胞の発育が進むに従って増加した ($p < 0.05$)。性成熟前のネコ卵巢から採取された直径 800~1,200 μm の卵胞では、正常卵子の割合が性成熟後のネコに比較して高かった ($p < 0.05$)。

卵子直径に対する卵巢周期および卵胞の大きさの影響を表 7 に示した。性成熟前の卵巢も含めた各卵巢周期において、直径 800~1,200 μm の卵胞から得られた卵子の直径は直径 400~800 μm の卵胞由来卵子より有意に大きく ($p < 0.05$)、直径 1,200~2,000 μm の卵胞由来卵子と同等であった。黄体期の直径 400~800 および 800~1,200 μm の卵胞から得られた卵子の直径は、非活動期および卵胞期のものより有意に大きかった ($p < 0.05$)。一方、直径 1,200~2,000 μm の卵胞から得られた卵子の直径は各卵巢周期間に差はみられなかった。

表 8 に示したとおり、IVM 後、各卵巢周期においてネコ卵子の核成熟率は卵胞の発育が進むに従って高くなった ($p < 0.05$)。各直径の卵胞において、卵子の成熟率は性成熟後のネコの各卵巢周期間に差はみられなかった。直径 400~800 および 800~1,200 μm の卵胞において、核成熟率は性成熟前のネコにおいて成熟後のネコに比較して高かった ($p < 0.05$)。各卵巢周期において IVM 培養後の変性卵子の割合は小型の卵胞の卵子で有意に高かった ($p < 0.05$)。直径 400~800 および 800~1,200 μm の卵胞の卵子の変性率は性成熟後のネコにおいて性成熟前のネコに比較して高かった ($p < 0.05$)。

表 5. イエネコにおける卵巢周期毎の卵胞直径と卵胞数の関係

卵胞直径 (μm)	卵巢周期*毎の卵胞数 (供試動物数)			
	未成熟期 (5)	非活動期 (8)	卵胞期 (7)	黄体期 (7)
400-800	66.2 \pm 18.3 ^a	48.3 \pm 34.7 ^a	43.6 \pm 23.7 ^a	37.4 \pm 18.1 ^a
800-1,200	36.0 \pm 11.6 ^b	33.4 \pm 14.2 ^{a, b}	20.0 \pm 14.4 ^b	22.3 \pm 11.8 ^{a, b}
1,200-2,000	0.4 \pm 0.5 ^{c, B}	10.6 \pm 4.8 ^{b, A}	8.0 \pm 5.0 ^{b, A}	11.7 \pm 5.3 ^{b, A}
合計	102.6 \pm 25.3	92.3 \pm 41.1	71.6 \pm 30.0	71.4 \pm 26.9

数値は平均値 \pm 標準偏差.

*未成熟期: 体重 740~1,270 g (推定 60~120 日齢) のネコ、非活動期: 性成熟後のネコのうち卵巢に直径 2 mm 以上の卵胞と黄体が存在しないもの、卵胞期: 性成熟後のネコのうち片方もしくは両方の卵巢に直径 2 mm 以上の卵胞が 1 個もしくは複数個存在するもの、黄体期: 性成熟後のネコのうち 1 個以上の CL が片方もしくは両方の卵巢に存在するもの.

^{a-c} 同列異符号間に有意差あり ($p < 0.05$).

^{A, B} 同行異符号間に有意差あり ($p < 0.05$).

表 6. イエネコにおける卵巢周期毎の卵胞直径と卵子正常性の関係

卵胞直径 (μm)	卵巢周期*毎の正常卵子率 (%)**			
	未成熟期	非活動期	卵胞期	黄体期
400-800	18.7 ^a (331)	19.4 ^a (386)	19.3 ^a (305)	22.9 ^a (262)
800-1,200	53.3 ^{b, B} (180)	36.0 ^{b, A} (267)	39.3 ^{b, A} (140)	36.5 ^{b, A} (156)
1,200-2,000	100 ^b (2)	62.4 ^c (85)	60.7 ^c (56)	64.6 ^c (82)

*未成熟期: 体重 740~1,270 g (推定 60~120 日齢) のネコ、非活動期: 性成熟後のネコのうち卵巢に直径 2 mm 以上の卵胞と黄体が存在しないもの、卵胞期: 性成熟後のネコのうち片方もしくは両方の卵巢に直径 2 mm 以上の卵胞が 1 個もしくは複数個存在するもの、黄体期: 性成熟後のネコのうち 1 個以上の CL が片方もしくは両方の卵巢に存在するもの。

**正常卵子率は卵巢周期毎のそれぞれのネコから採取された卵胞を全てプールして算出した。

括弧内の数値は、非活動期 8 頭、卵胞期 7 頭、黄体期 7 頭および未成熟期 5 頭のネコから採取した卵胞の総数。

^{a-c} 同列異符号間に有意差あり ($p < 0.05$).

^{A, B} 同行異符号間に有意差あり ($p < 0.05$).

表 7. イエネコにおける卵巣周期毎の卵胞直径と卵子直径の関係

卵胞直径 (μm)	卵巣周期*毎の卵子直径 (μm)		
	未成熟期	非活動期	黄体期
400-800	105.1 \pm 6.4 ^{a,A,B} (63)	104.0 \pm 5.1 ^{a,A,B} (72)	103.5 \pm 5.0 ^{a,A} (57)
800-1,200	109.2 \pm 4.8 ^{b,A,B} (99)	108.1 \pm 5 ^{b,A} (96)	109.6 \pm 4.3 ^{b,A,B} (58)
1,200-2,000	109.0 \pm 3.5 ^{**} (2)	109.9 \pm 62.4 ^b (50)	112.1 \pm 4.5 ^b (33)

数値は平均値 \pm 標準偏差.

括弧内の数値は実験に使用した正常な形態の卵子数.

*未成熟期: 体重 740~1,270 g (推定 60~120 日齢) のネコ、非活動期: 性成熟後のネコのうち卵巣に直径 2 mm 以上の卵胞と黄体が存在しないもの、卵胞期: 性成熟後のネコのうち片方もしくは両方の卵巣に直径 2 mm 以上の卵胞が 1 個もしくは複数個存在するもの、黄体期: 性成熟後のネコのうち 1 個以上の CL が片方もしくは両方の卵巣に存在するもの.

** 卵子数が少ないため統計解析から除外した.

^{a-c} 同列異符号間に有意差あり ($p < 0.05$).

^{A,B} 同行異符号間に有意差あり ($p < 0.05$).

表 8. イエネコにおける卵巢周期毎の卵胞直径と成熟培養後の卵子核相の関係

卵巢周期 (ネコ頭数)	卵胞直径 (μm)	培養 卵子数	成熟培養後の核相* (%)				
			GV	GVBD- TI	MII	単為 発生	変性
未成熟期 (5)	400-800	63	17.5 ^{a, B}	11.1 ^{a, B}	55.6 ^{a, B}	1.6	14.3 ^{a, B}
	800-1,200	99	5.1 ^b	4.0 ^{b, B}	83.8 ^{b, B}	4.0	3.0 ^{b, B}
	1,200-2,000	2	0 ^{a, b}	0 ^{a, b}	100 ^{a, b}	0	0 ^{a, b}
非活動期 (8)	400-800	72	40.3 ^{a, A}	1.4 ^A	19.4 ^{a, A}	1.4	37.5 ^{a, A}
	800-1,200	96	9.4 ^b	4.2 ^A	69.8 ^{b, A}	2.1	14.6 ^{b, A}
	1,200-2,000	50	0 ^c	2.0	86.0 ^c	4	8.0 ^b
卵胞期 (7)	400-800	57	36.8 ^{a, A}	0 ^{a, C}	22.8 ^{a, A}	0	40.3 ^{a, A}
	800-1,200	56	7.1 ^b	17.9 ^{b, B}	55.4 ^{b, A}	5.4	14.3 ^{b, A}
	1,200-2,000	33	0 ^b	0 ^a	93.9 ^c	6.1	0 ^c
黄体期 (7)	400-800	57	54.4 ^{a, A}	5.3 ^{A, B}	10.5 ^{a, A}	1.8	28.1 ^{a, A, B}
	800-1,200	58	8.6 ^b	6.9 ^{A, B}	55.2 ^{b, A}	3.4	25.9 ^{a, A}
	1,200-2,000	51	2.0 ^b	3.9	82.4 ^c	5.9	5.9 ^b

^{a-c} 各卵巢周期内の同列異符号間に有意差あり ($p < 0.05$).

^{A-C} 同卵胞直径の卵巢周期間に付した異符号間に有意差あり ($p < 0.05$).

* 未成熟期: 体重 740~1,270 g (推定 60~120 日齢) のネコ、非活動期: 性成熟後のネコのうち卵巢に直径 2 mm 以上の卵胞と黄体が存在しないもの、卵胞期: 性成熟後のネコのうち片方もしくは両方の卵巢に直径 2 mm 以上の卵胞が 1 個もしくは複数個存在するもの、黄体期: 性成熟後のネコのうち 1 個以上の CL が片方もしくは両方の卵巢に存在するもの。

** GV - 卵核胞期; GVBD - 卵核胞崩壊; TI - 第一減数分裂終期;

MII - 第二減数分裂中期; 単為発生 - 2 細胞期以上.

考察

本研究では、1頭あたりの卵巣に含まれる直径 400~2,000 μm の卵胞数は卵巣周期と関係しなかった。また、卵胞直径毎の卵胞数も卵巣周期間で有意な差はみられなかったが、性成熟前のネコには直径 1,200~2,000 μm の卵胞はほとんど存在しなかった。このことから、性成熟後のネコでは全ての卵巣周期において、胞状卵胞は直径 2,000 μm まで発育するが、性成熟前のネコでは直径 1,200 μm 程度までしか発育しないことが示された。LH のパルス状分泌は、卵胞発育の終期に必須な要素であり (Moor and Trouson, 1997)、LH レセプターは直径 800 μm 以上のネコの卵胞の顆粒層細胞に強く発現していることが知られている (Saint-Dizier et al., 2007)。これらのことから、第 1 章での考察と同様に、性成熟前のネコにおける不十分な LH 分泌あるいは顆粒層細胞での不十分な LH レセプター発現が示唆され、卵胞発育は直径 1,200 μm 以下に抑制され、排卵に至らないと推測される。

本研究において、ネコでは卵胞の発育段階が進むに従い、卵胞数は減少するものの、卵胞内に存在する卵子の形態学的な正常性は向上することが明らかになった。また、卵胞発育に従って、卵子直径が増大するとともに核成熟能が向上することも明らかになった。各卵巣周期において小型の卵胞から得られた卵子は回収後の形態学的正常率が低く、IVM 後の変性率が高かった。これらの結果は高い核成熟能を有する形態学的正常卵子をもつ卵胞のみが発育を継続することを示唆している。卵胞発育と卵子の核成熟能獲得の関係は動物種によって異なることが報告されている (Trounson et al., 2001)。性成熟に達したマウス (Sorensen and Wassarman, 1976)、ハムスター (Iwamatsu and Yanagimachi, 1975) お

よびマーモセット (Gilchrist et al., 1995) では卵子の核成熟能獲得は卵胞腔形成と同時期に起こるのに対して、ウシ (Arlotto et al., 1996)、ヒツジ (Moor and Trounson, 1997)、ブタ (Motlik et al., 1984; Motlik and Fulka, 1984)、ウマ (Goudet et al., 1997)、ヒト (Tsuji et al., 1985) およびアカゲザル (Schramm et al., 1993) では卵子は卵胞腔形成後の卵胞発育に伴って徐々に核成熟能を獲得する。Otoi et al. (2001) は 38°C で 2 時間保持したネコ卵巣を用いた実験において、卵子直径 (83.5~126.4 μm) と核成熟能に関係はなかったと報告している。本研究において、各卵巣周期では直径 1,200~2,000 μm の卵胞由来ネコ卵子は直径 400~800 μm の卵胞由来卵子 (直径約 105 μm) に比較して大型の卵細胞質 (直径約 110 μm) を持ち、高い核成熟能を有していた。一方、直径 800~1,200 μm の卵胞由来卵子は直径 1,200~2,000 μm の卵胞由来卵子と比較して同等の卵子直径を持っているが、核成熟能は低かった。この原因の一つとして卵子と卵胞の変性程度の差異が考えられる。直径 800~1,200 μm の卵胞由来卵子は直径 1,200~2,000 μm の卵胞由来卵子と比較して、形態学的に正常な卵子の割合が低かったことから、直径 800~1,200 μm の卵胞では採取される COCs の形態が正常であっても、すでに細胞膜の機能不全が発生しており、卵細胞質が膨張して卵子直径が大きくなっている可能性が考えられる。また、他の原因としては卵子直径が 110 μm 以上に達した後、核成熟能を獲得するまでに卵細胞質成熟等の何らかの要因が必要である可能性も考えられる。

性成熟後のネコにおいて、各卵胞直径の卵子における核成熟率は卵巣周期間で同様であった。しかし、Johanston et al. (1989) は非活動期および卵胞期のネコ卵子の核成熟能は黄体期に比較して高かったと報告している。卵巣周期とネコ卵子の発生能の関係は報告によって異なり、非活動期および排卵直後の卵巣

から採取されたネコ卵子の卵割および胚盤胞への発生率は卵胞期および黄体期に比較して低かったとの報告 (Freistedt et al., 2001) がある一方で、卵胞期におけるネコ卵子の分割および発生率は非活動期および黄体期に比較して低かったとする報告 (Krja et al., 2002) もある。また、Naoi et al. (2008) はネコ卵子の体外受精後の卵割および発生率は卵巣周期間で違いがみられなかったと報告した。第 1 章の実験では、性成熟後のネコから採取された様々な大きさの卵子は、1 個の微小滴中で群培養を行って核成熟能を確認したため判定できなかったが、本研究の結果により卵胞および卵子の大きさおよび性状が卵子の核成熟能やその後の発生能に影響を与えることが明らかとなった。ネコ卵子を用いた体外受精成績の向上を図るためには、核成熟および発生能をより正確に評価し、正常で高品質な卵子を選別する方法を開発する必要がある。

性成熟前のネコにおいて、卵巣内に存在する小型 (直径 400~800 μm) の卵胞数およびこれらの卵胞内の正常卵子率は性成熟後のネコと差異がなかった。しかし、性成熟前のネコ卵巣から採取される卵子は性成熟後のネコに比較して高い核成熟率と低い変性率を示した。第 1 章で、性成熟前のネコから採取した卵子の IVM 後の核成熟率は性成熟後のネコに比較して低いことを示したが、本章の実験において、未成熟期の卵胞由来卵子の核成熟率が高くなった理由は明らかではない。本章において、未成熟期の直径 400~800 μm の卵胞から得られた卵子の核成熟率は約 50%であったことから、第 1 章において、性成熟前のネコから得られた卵子が低い核成熟率 (48.3%) を示した原因として、直径 800 μm 未満の小型卵胞由来卵子を多く培養したことが考えられる。

以上の結果から、性成熟後のネコ卵巣中の胞状卵胞 (直径 400 μm 以上) の数および卵胞内の正常な卵子の割合は卵巣周期に影響されないことが明らかに

なった。また、性成熟後のネコの卵巣中に存在する大きな卵胞には核成熟能の高い卵子が存在することが示され、性成熟前のネコ卵巣においては、卵胞直径が 800 μm 以上の卵胞からは高い核成熟能を有する卵子を採取できることが示された。

第3章 ヨウ化プロピジウムによる卵丘細胞の超生体染色を用いた
イエネコ卵子の体外成熟能予測

緒言

ネコは野生ネコ科動物の保護・増殖に有用と考えられる繁殖補助技術を高度化するための重要な実験モデルである。そのため、ネコ卵子の IVM、IVF および IVC について信頼性の高い技術を開発することは、ART をネコ科絶滅危惧種に応用するうえで必須である。ネコ胚の IVP を効率的に行うためには、成熟培養前に高い核成熟能を有する卵子を非侵襲的に判別し、選択できることが重要である。

数層の卵丘をもち均一な暗黒色の細胞質をもつネコ卵子は体外発生能が高いことが知られている (Pope et al., 1997; Wood and Wildt, 1997; Katska-Ksiazkiewicz et al., 2003; Naoi et al., 2008)。また、本研究の第 2 章では確認できなかったものの、たとえ IVM に用いる COCs を同じ基準 (卵子および卵丘の形態) で肉眼的に選別したとしても、季節 (Spindler and Wildt, 1999; Freistedt et al., 2001) および卵巣周期 (Johnston et al., 1989; Freistedt et al., 2001; Karja et al., 2002; Naoi et al., 2008) がネコ卵子の成熟能や発生能に影響するという報告が存在する。このような異なる報告がなされる原因として、COCs の選別方法が主観的なものである可能性があるためと考えられる。

卵丘細胞は栄養や成長因子の供給により卵子の成長および成熟を助け (Tanghe et al., 2002)、互いに影響を与え合いながら成長することが知られている。近年、牛 (Assidi et al., 2008; Bettgowda et al., 2008) およびヒト (Assou et al., 2008; Anderson et al., 2009; Assou et al., 2010) において、卵丘細胞の遺伝子発現を卵子の非侵襲性の質評価法として利用できないかという試みが行われている。しかしながら、この方法は卵丘細胞の一定数の採取が必要であり、解析の

ためのコストと手間がかかる。卵丘細胞の質を簡便に評価するもう一つの方法としてヨウ化プロピジウム (PI) 染色による方法が、マウスにおいて提案されている。PI は正常な細胞膜には浸透せず、正常機能を失った細胞膜を通過し、細胞核を染色する。凍結保存した卵核胞期の卵子の卵丘細胞の膜正常性を PI 染色で調査した研究では、PI 染色される卵丘細胞を有する卵子の発生能は低下するものの、PI により染色されない卵丘を有する卵子の胚盤胞への発生能は、新鮮卵子と同等であると報告されている (Ruppert-Lingham et al., 2006)。

そこで本章ではネコ卵子の核成熟能を非侵襲的に評価するため、卵丘の形態を評価するとともに卵丘細胞を PI 染色し、IVM 後の核成熟率を調べた。ネコでは直径 800 μm 以上の卵胞は顆粒層細胞に LH のレセプターが発現していると報告 (Saint-Dizier et al., 2007) されていることから、この大きさを一つの基準とし、卵子を小型 (直径 400~800 μm) および大型卵胞 (直径 800 μm 以上) から採取し、さらに卵子の直径も調べた。

材料および方法

卵巣採取について

鳥取大学の鳥取大学農学部附属動物医療センターおよび鳥取市内の動物病院から避妊を目的に摘出された 8 頭分のネコ卵巣の提供を受けた。卵巣は室温で生理食塩水に浸漬し、摘出後 1 時間以内に実験室に持ち帰って実験に供試した。

胞状卵胞の単離と卵子の回収

実験室に到着後、卵巣は単離培地 (Harada et al., 1997) に移した。卵巣は眼科鉗を用いて長軸方向に半分に切り、卵巣髄質を除いたのち皮質を小片に切り分けた。実体顕微鏡下で卵巣皮質を観察し、直径 400 μm 以上の胞状卵胞を 18 ゲージ針を用いて単離し、新鮮な単離培地に移した。接眼マイクロメーターを用いて卵胞直径を直交するふたつの直径の平均として計測した。卵胞は、直径 400~800 μm (小型) および 800 μm 以上 (大型) の 2 グループに分類した。単離した卵胞は 25 ゲージの針で切開し、COCs を採取して実体顕微鏡下 (15~50 倍) で形態学的特徴を評価した。卵丘に被われ、一般的に正常と考えられている均一な黒色の細胞質をもつ卵子を実験に用いた。

ヨウ化プロピジウム染色および形態の観察を用いた卵丘細胞の細胞膜正常性の評価

卵丘細胞の細胞膜正常性の評価は過去の報告 (Ruppert-Lingham et al., 2006) を参考に一部修正して実施した。簡単に記述すると、COCs を 3 ml の 0.1% PI (Sigma) を加えた単離培地に 39°C、10 分間遮光した状態で浸漬した。その後、COCs は PI を含まない単離培地で 2 回洗浄し、パラフィンオイル (Nakarai Tesque) で覆った 10 μl の単離培地の微小滴に移した。染色した COCs は蛍光装置を取り付けた倒立顕微鏡 (TS100-F, Nikon, Tokyo, Japan) 下で緑色蛍光フィルター (G-2A, Nikon) を用いて観察した。赤色に蛍光を発する卵丘細胞を細胞膜に傷害のある細胞として判定した。COCs の卵丘細胞正常性評価については、Ruppert-Lingham et al. (2006) の判定方法を一部修正して用いた。すなわち、COCs は、PI によって染色される卵丘細胞が 1/4 未満であるグレード 1、染色

される卵丘細胞が 1/4 から 1/2 であるグレード 2、および半分以上の卵丘細胞が染色されているグレード 3 に分類した (図 7)。これらの COCs は、さらに卵丘の形態によって、3 層以上の卵丘細胞を有するカテゴリー A、3 層未満のカテゴリー B、および放線冠のみ存在するカテゴリー C に分類した (図 8)。卵子直径は倒立顕微鏡に取り付けたデジタルカメラ (DP-11, Olympus, Tokyo, Japan) で撮影し、透明帯を除く卵細胞質を直交するふたつの直径の平均値として計測した。

体外成熟および核成熟の評価

細胞膜の正常性および卵丘形態の評価を行った後、COCs を第 1 および 2 章と同様の成熟培養液で 1 回洗浄した。次に COCs はパラフィンオイル (Nakarai Tesque) で覆った 10 μ l の成熟培地の微小滴内で 39°C、5% CO₂ 気相下で 30 時間培養した。

成熟培養後、ピペッティングによって卵子から卵丘細胞を除去した。卵子はエタノールと酢酸の混合液 (3: 1) で固定し、1%アセトオルセイン液で染色した。位相差顕微鏡を用いて核の状態を評価し、染色体が赤道面に整列し、第一極体の観察される MII に達した卵子を成熟卵子と判定した。

実験計画

まず、400~800 (小型) もしくは 800 μ m (大型) 以上の卵胞から得られた卵子の直径および IVM 後の核成熟率を比較した。次に、卵丘の形態と卵丘細胞の細胞膜の正常性が卵子直径と核成熟率に与える影響について検討した。最後に、細胞膜が正常な卵丘を有し (グレード 1)、数層の卵丘 (カテゴリー A) に覆われ

た卵子の核成熟能を評価した。

統計解析

統計解析はソフトウェア JMP Version 8.0.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) によって行った。卵子の直径の比較には Student's t-test もしくは一元配置分散分析 (ANOVA) を行った後に Turkey-Kramer's HSD test を行った。卵子の核成熟率は χ^2 検定で比較した。 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

結果

本章では、8頭のネコ（1頭あたり 33.4 ± 13.9 個、平均±標準偏差）から267個の卵子を採取し、実験に使用した。表9に示したとおり、800 μm 以上の大型卵胞から得られた卵子は400~800 μm の小型卵胞と比較して直径が有意に大きく、核成熟率が高かった ($p < 0.05$)。表10に示したとおり、同じ大きさの卵胞から得られた卵子の卵細胞質の直径と核成熟率は卵丘の形態が異なっても、有意差はみられなかった。一方、表11に示した通り、グレード1と判定された卵子は、グレード3と判定された卵子に比べて、高い核成熟能を示した ($p < 0.05$)。さらに、小型の卵胞から得られたグレード1の卵丘細胞をもつ卵子はグレード2および3の卵丘細胞をもつ卵子よりも直径が有意に大きかったが ($p < 0.05$)、これらの卵子は大型卵胞から得られたグレード1の卵丘細胞をもつ卵子より直径および核成熟率が低かった。大型卵胞において、形態学的にカテゴリーAと分類された卵子の核成熟率 (92.0%、 $n = 75$) は、グレード1の卵丘細胞をもつ卵子と同等であった (93.8%、 $n = 80$)。しかし、大型の卵

胞から採取されたカテゴリーA の卵子は膜正常性によりグレード 1 (72%、54/75) およびグレード 2 と 3 (28%、21/75) に分類され、グレード 1 に分類された卵子の核成熟率 (96.3%, n = 54) は、グレード 2 と 3 に分類された卵子に比べて有意に高かった (81.0%、n = 21) ($p < 0.05$)。

表 9. イエネコの小型卵胞および大型卵胞における卵子直径と核成熟能の関係

卵胞直径 (μm)	卵子数 (供試ネコ数)	卵子直径 (μm)	核成熟率 (%)
400-800	130 (8)	$104.0 \pm 6.1^{\text{a}}$	60.8 ^a
≥ 800	137 (8)	$107.7 \pm 5.5^{\text{b}}$	89.8 ^b

卵子直径は平均 \pm 標準偏差.

*データは 8 頭をプールして使用.

^{a,b} 同列の異符号間で有意差あり ($p < 0.05$).

表 10. 卵丘の形態が小型および大型卵胞から得られたイエネコ卵子の直径と核成熟能に与える影響

卵胞直径 (μm)	卵丘の形態学的カテゴリー*		
	A	B	C
卵細胞の 直径 (μm)			
400-800	104.4 \pm 5.6 ^a (59)	104.5 \pm 6.9 ^a (41)	102.6 \pm 5.8 ^a (30)
≥ 800	107.4 \pm 5.2 ^b (75)	108.2 \pm 6.4 ^b (43)	107.5 \pm 3.9 ^b (19)
核成熟率 (%)			
400-800	67.8 ^a	61.0 ^a	46.7 ^a
≥ 800	92.0 ^b	86.0 ^b	89.5 ^b

卵子直径は平均 \pm 標準偏差.

^{a,b} 同列の異符号間で有意差あり ($p < 0.05$).

* カテゴリーA: 3層以上の卵丘, B: 3層未満の卵丘, C: 放線冠のみ存在.

表 11. 卵丘細胞の膜正常性が小型および大型卵胞由来のイエネコ卵子直径と核成熟能に与える影響

卵胞直径 (μm)	卵丘細胞の膜正常性グレード*		
	1	2	3
卵細胞質の 直径 (μm)	105.7 \pm 6.1 ^{aA} (68)	102.5 \pm 5.4 ^{AB} (31)	101.8 \pm 5.9 ^{aB} (31)
≥ 800	107.8 \pm 5.6 ^b (80)	107.2 \pm 4.9 ^b (31)	107.7 \pm 5.8 ^b (26)
核成熟率 (%)	67.6 ^a	54.8 ^a	51.6 ^a
≥ 800	93.8 ^{bA}	90.3 ^{bAB}	76.9 ^{bbB}

卵子直径は平均土標準偏差.

^{a,b} 同列の異符号間で有意差あり ($p < 0.05$).

^{A,B} 同行の異符号間で有意差あり ($p < 0.05$).

*グレード 1: PI によって染色された卵丘細胞が 1/4 未満, グレード 2: 染色された卵丘細胞が 1/4 から 1/2, グレード 3: 半分以上の卵丘細胞が染色される.

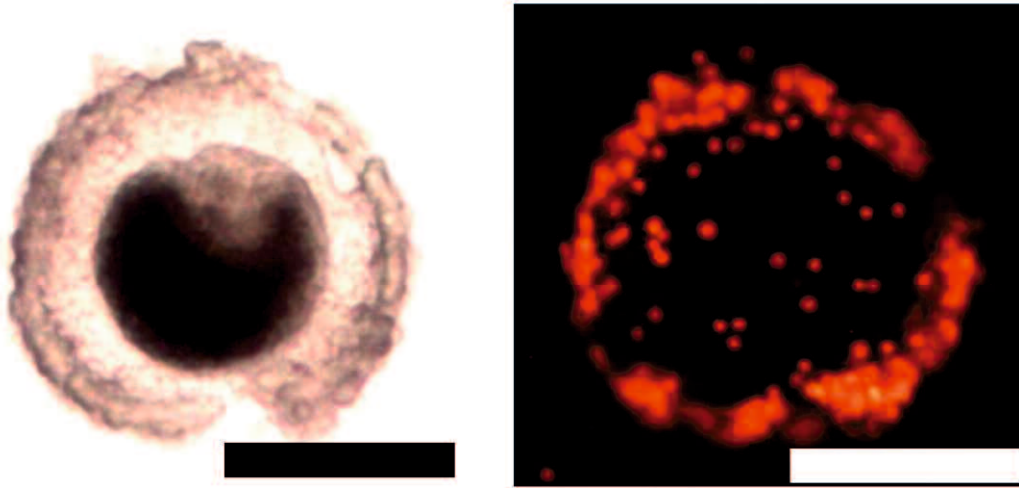


図 7. 可視光下 (写真左、カテゴリーC) および蛍光下 (写真右、グレード 3) におけるヨウ化プロピジウム染色を行った卵丘卵子複合体
スケールバー = 100 μm .

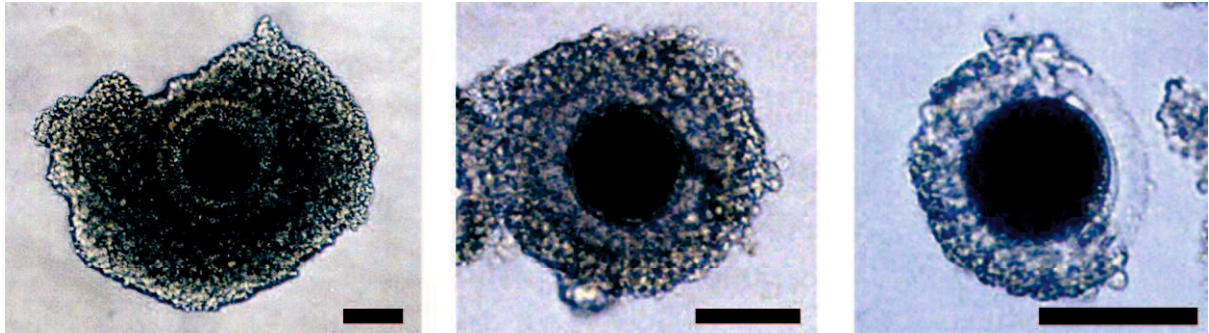


図 8. 卵丘の形態による分類

カテゴリーA: 3層以上の卵丘細胞を有する卵子 (写真左)、カテゴリーB: 3層未満の卵丘細胞を有する卵子 (写真中央)、カテゴリーC: 放線冠のみ有する卵子 (写真右).

スケールバー = 100 μm .

考察

本研究において、ネコの大型卵胞 ($\geq 800 \mu\text{m}$) から採取した卵子が小型卵胞 ($400\text{-}800 \mu\text{m}$) 由来卵子より直径が大きく、核成熟能が高かったことから、ネコ卵子は卵胞直径が $800 \mu\text{m}$ に達するまで発育が継続することを示唆している。様々な動物種で報告されている (Sato et al., 1990; Fair et al., 1995; Arlotto et al., 1996; Otoi et al., 1997; Ledda et al., 1999) のと同様に、ネコにおいても卵子直径は核成熟能に影響があると考えられていた。これまでに、ネコ卵子の直径と核成熟能の関係については報告 (Otoi et al., 2001) されているが、卵胞の大きさと核成熟能については調べられていなかった。本研究の結果は、ネコにおける卵子発育や核成熟能の向上は卵胞発育とともに進行することを裏付けた。ネコ卵胞の顆粒層細胞では、LH レセプターは $800 \mu\text{m}$ 以上で観察されることが報告 (Saint-Dizier et al., 2007) されている。今後、直径 $800 \mu\text{m}$ 以上の卵胞における卵子の高い核成熟能と LH レセプターとの関連性について調査することで、卵胞における卵子の核成熟能獲得のメカニズム解明が可能かもしれない。

牛においては、多層の卵丘をもつ卵子は裸化卵子や放線冠のみの卵子と比べて、核成熟率、受精率および体外発生能の高いことが示されている (Xu et al., 1986; Shioya et al., 1988; Yang and Lu, 1990; Madison et al., 1992; Momozawa and Fukuda, 1995; Stojkovic et al., 2001)。しかし、本研究においては、卵丘細胞の付着の程度が異なるネコ卵子の核成熟能に明らかな差異を見つけることは出来なかった。一方で、大型卵胞から得られた同じ大きさの卵子において、PI 染色を用いて判定した、正常な細胞膜機能の卵丘細胞をもつ卵子 (グレード 1) の

核成熟能は、細胞膜機能が失われた卵丘をもつ卵子 (グレード3) に比べ、有意に高いことを明らかにした。さらに、小型の卵胞から得られた膜機能が正常な卵丘細胞をもつ卵子では膜機能に異常をきたした卵丘細胞をもつ卵子よりも直径が有意に大きかった。これらの結果は、卵胞発育を通じて膜機能が正常な卵丘細胞がネコ卵子の発育および核成熟能に必要であること示唆している。また、大型卵胞から採取された3層以上の卵丘に囲まれた卵子 (カテゴリーA) のうち、膜正常性が高いグレード1に分類された卵子の核成熟能は、同じカテゴリーAでありながら卵丘細胞の膜正常性が低下している卵子よりも核成熟能が低かったことから、実態顕微鏡下で肉眼的に確認できる卵丘の形態だけでなく卵丘細胞膜の正常性を評価することで、ネコのIVP効率を向上させられることを示唆している。

PIはDNAと結合することにより特有の赤色蛍光が増強される核酸染色色素であり、生細胞の細胞膜は透過せず、死細胞内にのみ入り込む (Krishan, 1975)。生細胞内へ透過しないことから、本研究における短時間の染色液中の培養では卵丘や卵子への影響は少ないと考えられる。事実、生細胞に及ぼす悪影響に関する報告は見つからなかった。PI染色によるネコ卵子の体外発生能への悪影響については注意深く検討した上で実用化を目指す必要がある。一方で、近年PIの代わりにブタにおいて、眼の角膜傷害の検査に用いられており、細胞へ影響が少ないリサミングリーンBの染色によって卵丘細胞の膜正常性を評価し、ブタ卵子の体外発生能の予測が可能であったという報告がされている (Dutta et al., 2016)。このことから今後は、ネコ卵子においてPI染色に加えて、リサミングリーンB染色が有用であるかを調査する必要があるだろう。

以上の結果から、超生体染色を用いて卵丘細胞の膜正常性を評価することは

ネコ卵子の核成熟能の予測する手法として有用であると考えられる。今後は、体外受精を実施し、卵丘細胞の膜機能の正常性と正常受精率や胚盤胞への発生率との関係を精査する必要がある。

総括

野生ネコ科動物に対して、人工授精や体外受精などの生殖補助技術を用いることは、遺伝的多様性を維持させることでこれらの種の保存のために有効となると考えられる。そのためにはこれら技術において、多くの遺伝資源を活用し産子作出につなげることが重要と考えられる。雄においては雄性生殖器に存在する精祖細胞や精子が、雌においては卵巣に存在する原始卵胞を含む前胞状卵胞や胞状卵胞内の卵子が活用可能な遺伝資源の有力な候補である。雄においてネコや一部の野生ネコ科動物では射出精液や精巣上体精子を凍結保存し、人工授精する事で産子作出に成功している (Howard and Wildt, 2009)。また雌においても同様に、卵巣内の胞状卵胞から得られた卵子を用いた体外受精によって胚を作出し、それらを移植する事で産子を生産したと報告されている (ネコ、Goodrowe et al., 1988; トラ、Donoghue et al., 1990; ステップヤマネコ、Pope et al., 1993; リビアヤマネコ、Pelican et al., 2006; カラカル、Pelican et al., 2006; オセロット、Wildt, 2009)。これらのことから様々な日齢にあるネコ科動物の卵巣にどのような状態の卵胞や卵子が存在するかについて明らかにするとともに、それらの体外発生能について明らかにすることは、遺伝資源保存に重要と考えられる。

そこで第1章では性成熟前のネコにおける卵胞発育を調査するとともに、卵胞内卵子が胚のIVPに適するかどうかを評価した。卵巣重量は推定日齢100日まで急速に増加することを明らかにした。また、二次および胞状卵胞の卵胞直径および正常卵子の割合も日齢が増加するにしたがい増加することを明らかにした。100~120日齢の性成熟前のネコから得られた卵子を用いてIVPを行った結果、性成熟前のネコから採取された卵子の体外発生能は性成熟後のネコと比較して低いことが明らかとなったものの、100日齢以上のネコの卵巣には胚

盤胞への体外発生能を有する卵子が存在し、移植可能胚を体外で作出可能であることを示した。一方で、100日齢以下の卵巢では卵子を遺伝資源として活用するためには、性成熟後のネコよりも数多く存在すると考えられる原始、一次および二次卵胞の体外培養法の開発が必要である事を明らかにした。

近年、ネコの二次卵胞の体外培養において馬絨毛性腺刺激ホルモンを培養液に添加することで発育が促進されたと報告されている (Chansaenroj et al., 2019)。また、ネコの原始卵胞の体外培養において性成熟前のネコでは培養液中への上皮成長因子 (epidermal growth factor, EGF) 添加がその生存性と間質細胞の増殖を促進したのに対して、性成熟後のネコでは効果がみられなかったことが報告されている (Fujihara et al., 2014)。このようなネコ卵胞の体外培養の知見が増えることで、様々な日齢の卵巢内の卵子を遺伝資源として有効活用出来るようになる事が期待される。

より現実的な遺伝資源の活用法として、ネコ胞状卵胞内卵子の利用に着目すると、第1章の結果から卵巢内の胞状卵胞の大きさはネコの日齢によって異なる事がわかった。性成熟後のネコでは、季節 (Freistedt et al., 2001; Spindler and Wildt, 1999)、卵巢周期 (Freistedt et al., 2001; Johanston et al., 1989; Karja et al., et al., 2002; Naoi et al., 2008)、卵丘および卵子の形態学的性状 (Kaska-Ksiazkiewicz et al., 2003; Naoi et al., 2008; Pope et al., 1997; Wood and Wildt, 1997) が胞状卵胞内卵子の体外発生能に与える影響について報告されているが、胞状卵胞の大きさの影響については報告されていない。そこで第2章ではネコ卵子の形態学的性状 (卵丘や卵細胞質) および核成熟能に与える卵巢周期および卵胞直径の影響を調査した。卵巢周期を未成熟期 (性成熟前のネコ)、非活動期、卵胞期および黄体期に分類したところ、それぞれの卵巢周期において卵胞の発育段階が進

むに従って卵胞数は減少し、卵子の形態学的正常性は向上した。卵子を1個ずつ成熟培養したところ、核成熟率は卵胞直径が増加するに従って上昇した。直径800~1,200 μm の卵胞において、未成熟期の正常卵子率および核成熟率は性成熟後のネコの卵巣に比較して高かった。卵子直径は卵胞直径の発育と共に増加する傾向にあった。第二章の結果から、性成熟後のネコでは、卵巣周期に関係なく、大きな卵胞から卵子を採取する事で体外発生能がより高い卵子を得る事が出来ることを示した。性成熟前のネコにおいては、直径の小さい卵胞であっても、性成熟後のネコの同サイズの卵胞由来卵子に比較して核成熟能は高いこと明らかにした。第1章において性成熟後に比較して性成熟前のネコ卵子の体外発生能が低かった理由として直径の小さい卵胞から得られた卵子を体外培養に用いた可能性が考えられた。このことから発達した胞状卵胞をもつ卵巣を有する性成熟前のネコからは体外発生能を有する卵子を得られると考えられる。

第2章では卵巣内において胞状卵胞の直径が大きくなるにつれて卵胞数は減少したことから、一部の卵胞は発育の過程で閉鎖退行していることが考えられた。このことから卵胞発育にともなって卵子の核成熟能が獲得されることが示唆される一方で、卵胞の閉鎖退行に伴って卵子および卵丘細胞が死滅することで核成熟能が失われている可能性がある。以上のことから第3章ではネコ卵子の非侵襲的な核成熟能の評価のために、卵丘細胞の膜正常性と体外培養後の核成熟率の関係性を調査した。ネコのCOCsを小型(400~800 μm)もしくは大型($\geq 800 \mu\text{m}$)卵胞から採取し、卵丘細胞を形態で評価し、死滅細胞のみに侵入するPIで染色した。大型卵胞において卵丘細胞の膜正常性の高い卵子の核成熟率(93.8%)は低い卵子(76.9%)よりも有意に高かった。このことからPI染色

による卵丘細胞の膜正常性の評価は卵子の核成熟能の予測に有用であることを明らかにした。一般的に IVP では複数の COCs もしくは胚を同一培養液内で培養することで、それらがお互いに影響しあって発生が促進されることが知らされている (Reed et al., 2011)。このことから第 3 章で示された PI 染色による体外発生能の予測に基づき、共培養する COCs を選抜することでネコにおいて移植可能胚の作出効率を向上できる可能性がある。今後は、この技術を用い、体外培養する卵子の発生率を向上させる技術の検討を行っていく必要があると考えられる。

最後に、本研究によって性成熟前のネコ卵巢にも移植可能な胚盤胞まで発生可能な卵子が存在することが明らかになったことから、野生や保護管理施設において事故などで死亡した性成熟前のネコ科動物の卵巢についても、体外胚生産に供することで、遺伝資源の損失を防ぐことが出来ると考えられる。また、日齢の若いネコ卵巢に発育段階の低い卵胞が数多く存在することが明らかになったことから、幼若ネコ科動物の卵巢内卵胞を体外で発育させる方法を開発することで多くの遺伝資源が利用可能となり、野生ネコ科動物の保護・増殖に貢献すると考えられる。今後も、それらの動物の卵巢にどのような発育段階の卵子が存在するかの調査に加えて、卵巢内の卵子の保存および体外培養法の確立が求められる。

謝辞

本研究論文をまとめるにあたり終始ご指導を賜りました山口大学大学院連合獣医学研究科 菊地 和弘 客員教授に心から感謝しお礼申し上げます。また、御審査の労をとって下さいました、山口大学大学院連合獣医学研究科 (山口大学共同獣医学部) 高木 光博 教授、同 西垣 一男 教授、同 谷口 雅康 准教授に心から感謝申し上げます。また、御審査の労をとって頂くと同時に、本研究を遂行した山口大学大学院連合獣医学研究科でご教授いただいた鳥取大学農学部共同獣医学科 菱沼 貢 教授に心から感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたりご指導をいただいた北里大学獣医学部動物資源科学科 永野 昌志 教授に心より感謝申し上げます。

また、研究の補助をしていただいた鳥取大学農学部獣医学科獣医繁殖学教室の後輩の皆さんに心よりお礼申し上げます。

参考文献

- Alm H, Kuhlmann S, Langhammer M, Tuchscherer A, Torner H, Reinsch N. Occurrence of polyovular follicles in mouse lines selected for high fecundity. *J Reprod Dev* 2010; 56: 449-453.
- Anderson RA, Sciorio R, Kinnell H, Bayne RA, Thong KJ, de Sousa PA, Pickering S. Cumulus gene expression as a predictor of human oocyte fertilization, embryo development and competence to establish a pregnancy. *Reproduction* 2009; 138: 629-637.
- Arlotto T, Schwartz JL, First NL, Leibfried-Rutledge ML. Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology* 1996; 45: 943-956.
- Armstrong DT, Holm P, Irvin B, Petersen BA, Stubbings RB, McLean D, Stevens G, Seamark RF. Pregnancies and live birth from in vitro fertilization of calf oocytes collected by laparoscopic follicular aspiration. *Theriogenology* 1992; 38:667-678.
- Armstrong DT. Effect of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology* 2001; 55: 1303-1322.
- Assidi M, Dufort I, Ali A, Hamel M, Algrlany O, Dielemann S, Sirard MA. Identification of potential markers of oocyte competence expressed in bovine cumulus cells matured with follicle-stimulating hormone and/or phorbol myristate acetate in vitro. *Biol Reprod* 2008; 79: 209-222.
- Assou S, Haouzi D, Mahmoud K, Aouacheria A, Guillemin Y, Pantesco V, Reme T, Dechaud H, De Vos J, Hamamah S. A non-invasive test for assessing embryo

- potential by gene expression profiles of human cumulus cells: a proof of concept study. *Mol Hum Reprod* 2008; 14: 711-719.
- Assou S, Haouzi D, De Vos J, Hamamah S. Human cumulus cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes. *Mol Hum Reprod* 2010; 16: 531-538.
- Bettegowda A, Patel OV, Lee KB, Park KE, Salem M, Yao J, Ireland JJ, Smith GW. Identification of novel bovine cumulus cell molecular markers predictive of oocyte competence: functional and diagnostic implications. *Biol Reprod* 2008; 79: 301-309.
- Brackett BG, Oliphant G. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol Reprod* 1975; 12: 260-274.
- Bristol-Gould S, Woodruff TK. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology* 2006; 66: 5-13.
- Caro TM, Laurenson MK. Ecological and genetic-factors in conservation - a cautionary tale. *Science* 1994; 263: 485-486.
- Chansaenroj A, Songsasenb N, Chatdarong K. Equine chorionic gonadotropin induces in vitro follicular growth from the multi-layered secondary developmental stage in cats. *Theriogenology* 2019; 123: 116-122
- Damiani P, Fissore RA, Cibelli JB, Long CR, Balise JJ, Robl JM, Duby RT. Evaluation of developmental competence, nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes. *Mol Reprod Dev* 1996; 45: 521-534.
- Davis AM, Gomez MC, Pope CE, Harris RF, Dresser BL. A comparison of in vitro developmental competence of oocytes collected from prepubertal and adult domestic cats. *Theriogenology* 2001; 55: 422.
- Deag JM, Lawrence CE, Manning A. The consequences of differences in litter size for

- the nursing cat and her kittens. *J Zool* 1987; 213: 153-179.
- Desjardins C, Hafs HD. Maturation of bovine female genitalia from birth through puberty. *J Anim Sci* 1969; 28: 502-507.
- Donoghue AM, Johnston LA, Seal US, Armstrong DL, Tilson RL, Wolf P, Petrini K, Simmons LG, Gross T, Wildt DE. In vitro fertilization and embryo development in vitro and in vivo in the tiger (*Panthera tigris*). *Biol Reprod* 1990; 43: 733-744.
- Dutta R, Li S, Fischer K, Kind A, Flisikowska T, Flisikowski K, Rottmann O, Schnieke A. Non-invasive assessment of porcine oocyte quality by supravital staining of cumulus-oocyte complexes with lissamine green B. *Zygote* 2016; 24: 418-427
- Fair T, Hyttel P, Greve T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev* 1995; 42: 437-442.
- Festing MF, Bleby J. Breeding performance and growth of SPF cats (*Felis-catus*). *J Small Anim Prac* 1970; 11: 533-542.
- 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.
- Fujihara M, Comizzoli P, Keefer CL, Wildt DE, Songsasen N. Epidermal growth factor (EGF) sustains in vitro primordial follicle viability by enhancing stromal cell proliferation via MAPK and PI3K pathways in the prepubertal, but not adult, cat ovary. *Biol Reprod*, 2014; 90: 86, 1-10
- Gilchrist RB, Nayudu PL, Nowshari MA, Hodges JK. Meiotic competence of marmoset monkey oocytes is related to follicle size and oocyte-somatic cell associations. *Biol Reprod* 1995; 52: 1234-1243.

- Goodrowe KL, Wall RJ, Wildt DE. Influence of gonadotropins on and developmental competence of in vitro fertilized feline follicular oocytes. *Theriogenology* 1988; 29: 250
- Goudet G, Bezard J, Duchamp G, Gerard N, Palmer E, Equine oocyte competence for nuclear and cytoplasmic in vitro maturation: Effect of follicle size and hormonal environment. *Biol Reprod* 1997; 57: 232-245.
- Harada M, Miyano T, Matsumura K, Osaki S, Miyake M, Kato S. Bovine oocytes from early antral follicles grow to meiotic competence in vitro: effect of FSH and hypoxanthine. *Theriogenology* 1997; 48: 743-755.
- Hoffert KA, Anderson GB, Wildt DE, Roth TL. Transition from maternal to embryonic control of development in IVM/IVF domestic cat embryos. *Mol Reprod Dev* 1997; 48: 208-215.
- Howard JG, Wildt DE. Approaches and efficacy of artificial insemination in felids and mustelids. *Theriogenology* 2009; 71: 130-148.
- IUCN, 2007: IUCN Red List of Threatened Species. World Conservation Union, Gland, Switzerland.
- Iwamatsu T, Yanagimachi R. Maturation in vitro of ovarian oocytes of prepubertal and adult hamsters. *J Reprod Fertil* 1975; 45: 83-90.
- Jefferson W, Newbold R, Padilla-Banks E, Pepling M. Neonatal genistein treatment alters ovarian differentiation in the mouse: inhibition of oocyte nest breakdown and increased oocyte survival. *Biol Reprod* 2006; 74: 161-168.
- Jewgenow K, Pitra C. Hormone-controlled culture of secondary follicles of domestic cats. *Theriogenology* 1993; 39: 527-535.

- Johnston LA, O'Brien SJ, Wildt DE. In vitro maturation and fertilization of domestic cat follicular oocytes. *Gamete Res* 1989; 24: 343-356.
- Karja NWK, 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.
- 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.
- Ledda S, Bogliolo L, Leoni CA, Naitana S. Follicular size affects the meiotic competence of in dtromatured prepubertal and adult oocytes in sheep. *Reprod Nutr Dev* 1999; 39: 503-508.
- Lévesque JT, Sirard MA. Proteins in oocytes from calves and adult cows before maturation: relationship with their development capacity. *Reprod Nutr Dev* 1994; 34:133-139.
- Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in-vitro. *Mol Reprod Dev* 1994; 37: 48-53.
- Madison V, Avery B, Creve T. Selection of immature bovine oocytes for developmental potential in vitro. *Anim Reprod Sci* 1992; 27: 1-11.
- Mahdi D, Khallili K. Relationship between follicle growth and circulating gonadotrophin levels during postnatal development of sheep. *Anim Reprod Sci* 2008; 106: 100-112.

- Momozawa K, Fukuda Y. In vitro maturation and in vitro fertilization of bovine oocytes with heterogeneous ooplasm. *Anim Sci Technol* 1995; 66: 605-409.
- Monniaux D, Huet C, Besnard N, Clement F, Bosc M, Pisselet C, Monget P, Mariana JC. Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. *J Reprod Fertil* 1997; 51: 3-23.
- Moor RM, Trounson AO. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent developmental capacity. *J Reprod Fertil* 1997; 49: 101-109.
- Motlik J, Crozet N, Fulka J. Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J Reprod Fertil* 1984; 72: 323-328.
- Motlik J, Fulka J. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology* 1984; 25: 87-96.
- Nagano M, Katagiri S, Takahashi Y. ATP content and maturational / developmental ability of bovine oocytes with various cytoplasmic morphologies. *Zygote* 2006a; 14: 299-304.
- Nagano M, Katagiri S, Takahashi Y. Relationship between bovine oocyte morphology and in vitro developmental potential. *Zygote* 2006b; 14: 53-61.
- Nagano M, Uchikura K, Takahashi Y, Hishinuma M. Effect of duration of in vitro maturation on nuclear maturation and fertilizability of feline oocytes. *Theriogenology* 2008; 69: 231-236.
- Naoi H, Agung B, Karja NWK, Wongsrikeao P, Shimizu R, Taniguchi M, Otoi T. Effects of the reproductive status on morphological oocyte quality and developmental competence of oocytes after in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer in

- cat. *Reprod Domest Anim* 2008; 43: 157-161.
- O'Brien JK, Catt SL, Ireland KA, Maxwell WM, Evans G. In vitro and in vivo developmental capacity of oocytes from prepubertal and adult sheep. *Theriogenology* 1997; 47: 1433-1443.
- Otoi T, Yamamoto K, Koyama N, Tachikawa S, Suzuki T. Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. *Theriogenology* 1997; 48: 769-774.
- Otoi T, Murakami M, Ooka A, Karja NWK, Suzuki T. Effects of size and storage temperature on meiotic competence of domestic cat oocytes. *Vet Rec* 2001; 148: 116-118.
- Pavlok A, Lucas-Hahn A, Niemann H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol Reprod Dev* 1992; 31: 63-67.
- Pelican KM, Wildt DE, Pukazhenti B, Howard J. Ovarian control for assisted reproduction in the domestic cat and wild felids. *Theriogenology* 2006; 66: 37-48.
- Peters H, McNatty KP. *The ovary* Berkeley and Los Angeles, CA: University of California Press; 1980.
- Pope CE, Keller GL, Dresser BL. In vitro fertilization in domestic and non-domestic cats including sequences of early nuclear events, development in vitro, cryopreservation and successful intra- and interspecies embryo transfer. *J Reprod Fertil Suppl* 1993; 47: 189-201.
- 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.

- Pope CE. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. *Theriogenology* 2000; 53: 163-174.
- Pope CE, Gomez MC, Dresser BL. In vitro production and transfer of cat embryos in the 21st century. *Theriogenology*, 2006a; 66: 59-71.
- Pope CE, Gomez MC, Dresser BL. In vitro embryo production and embryo transfer in domestic and nondomestic cats. *Theriogenology* 2006b; 66: 1518-1524.
- Pope CE, Crichton EG, Gomez MC, Dumas C, Dresser BL. Birth of domestic cat kittens of predetermined sex after transfer of embryos produced by in vitro fertilization of oocytes with flow-sorted sperm. *Theriogenology* 2009; 71: 864-871.
- Presicce GA, Jiang S, Simkin M, Zhang L, Looney CR, Godke RA, Yang X. Age and hormonal dependence of acquisition of oocyte competence for embryogenesis in prepubertal calves. *Biol Reprod* 1997; 56: 386-392.
- Ptak G, Loi P, Dattena M, Tischner M, Cappai P. Offspring from one-month-old lambs: Studies on the developmental capability of prepubertal oocytes. *Biol Reprod* 1999; 61: 1568-1574
- Ptak G, Tischner M, Bernabo N, Loi P. Donor-dependent developmental competence of oocytes from lambs subjected to repeated hormonal stimulation. *Biol Reprod* 2003; 69: 278-285.
- Ptak G, Matsukawa K, Palmieri C, Della Salda L, Scapolo PA, Loi P. Developmental and functional evidence of nuclear immaturity in prepubertal oocytes. *Hum Reprod.* 2006; 21: 2228-2237
- Pukazhenthil BS, Wildt DE. Which reproductive technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife? *Reprod Fertil Dev* 2004; 16: 33-46.

- Reed ML, Woodward BJ, Swain JE. Single or group culture of mammalian embryos: the verdict of the literature. *J Reprod Stem Cell Biotechnol* 2011; 2: 77-87.
- Revel F, Mermillod P, Peynot N, Renard JP, Heyman Y. Low developmental capacity of in vitro matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows. *J Reprod Fertil.* 1995; 103: 115-120.
- Reynaud K, Gicquel C, Thoumire S, Chebrout M, Ficheux C, Bestandji M, Chastant-Maillard S. Folliculogenesis and morphometry of oocyte and follicle growth in feline ovary. *Reprod Domest Anim* 2009a; 44: 174-179.
- Reynaud K, Viaris de Lesengo C, Chebrout M, Thoumire S, Chastant-Maillard S. Follicle population, cumulus mucification, and oocyte chromatin configuration during the periovulatory period in the female dog. *Theriogenology* 2009b; 72: 1120-1131
- Rosenstein L, Berman E. Postnatal body-weight changes of domestic cats maintained in an outdoor colony. *Am J Vet Res* 1973; 34: 575-577.
- Ruppert-Lingham CJ, Paynter SJ, Godfre J, Fuller BJ, Shaw RW. Membrane integrity and development of immature murine cumulus-oocyte complexes following slow cooling to -60°C: the effect of immediate rewarming, plunging into LN₂ and two-controlled-rate-stage cooling. *Cryobiology* 2006; 52: 219-227.
- Saint-Dizier M, Malandain E, Thoumire S, Remy B, Chastant-Maillard S. Expression of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone receptors during follicular growth in the domestic cat ovary. *Mol Reprod Dev* 2007; 74: 989-996.
- Sato E, Matsuo M, Miyamoto H. Meiotic maturation of bovine oocytes in vitro: improvement of meiotic competence by dibutyl cyclic adenosine 3',5'-

- monophosphate. *J Anim Sci* 1990; 68: 1182-1187.
- Schramm RD, Tennier MT, Boatman DE, Bavister BD. Chromatin configurations and meiotic competence of oocytes are related to follicular diameter in nonstimulated rhesus monkeys. *Biol Reprod* 1993; 48: 349-356.
- Shehata R. Polyovular Graafian follicles in a newborn kitten with a study of polyovuly in the cat. *Acta Anat* 1974; 89: 21-30.
- Sneider ME. Rhythms of ovogenesis before sexual maturity in the rat and cat. *Am J Anat* 1940; 67: 471-499.
- Shioya Y, Kuwayama M, Fukushima M, Iwasaki S, Hanada A. In metro fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured in vitro. *Theriogenology* 1988; 30: 489-496.
- Sorensen RA, Wassarman PM. Relationship between growth and meiotic maturation of mouse oocyte. *Dev Biol* 1976; 50: 531-536.
- Spindler RE, Wildt DE. Circannual variations in intraovarian oocyte but not epididymal sperm quality in the domestic cat. *Biol Reprod* 1999; 61: 188-194.
- Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zhkhartchenko V, Hutzler P, Goncalves PB, Wolf E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol Reprod* 2001; 64: 904-909.
- Statistics and Graphics Guide, 2004: JMP. SAS Institute Inc, Cary NC, USA, Version 5.1.1 of JMP.
- Takahashi Y, First NL. In vitro development of bovine one-cell embryos: influence of

glucose, lactate, pyruvate, amino-acids and vitamins. *Theriogenology* 1992; 37: 963-978.

Takahashi Y, Hishinuma M, Matsui M, Tanaka H, Kanagawa H. Development of in vitro matured / fertilized bovine embryos in a chemically defined medium: influence of oxygen concentration in the gas atmosphere. *J Vet Med Sci* 1996; 58: 897-902.

Tanghe S, Van Soon A, Nauwynck H, Coryn M, de Kruif A. Minireview: Functions of the cumulus oophoms during oocyte maturation ovulation and fertilization. *Mol Reprod Dev* 2002; 61: 414-424.

Taneja M, Bols PE, Van de Velde A, Ju JC, Schreiber D, Tripp MW, Levine H, Echelard Y, Riesen J, Yang X. Developmental competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo: influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. *Biol Reprod* 2000; 62: 206-213.

Telfer E, Gosden RG. A quantitative cytological study of polyovular follicles in mammalian ovaries with particular reference to the domestic bitch (*Canis familiaris*). *J Reprod Fertil* 1987; 81: 137-147.

Trounson A, Anderiesz C, Jones G. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reproduction* 2001; 121: 51-75.

Tsuji K, Sowa M, Nakano R. Relationship between human oocyte maturation and different follicular sizes. *Biol Reprod* 1985; 32: 413-417.

Tsutsui T, Tanaka A, Takagi Y, Nakagawa K, Fujimoto Y, Murai M, Anzai M, Hori T. Unilateral intrauterine horn insemination of frozen semen in cats. *J Vet Med Sci* 2000; 62: 1247-1251.

Tsutsui T, Wada M, Anzai M, Hori T. Artificial insemination with frozen epididymal

- sperm in cats. *J Vet Med Sci* 2003; 65: 397-399.
- Vercellini R, Gobello C, D'Francisco, F, Olguín, S, Arizmendi, A, Rodríguez, R, Arias DO, Blanco PG. Ultrasonographic evaluation of ovarian morphology and blood flow in prepubertal and pubertal cats. *Reprod Domest Anim* 2018; 53: 74-78.
- Wielebnowski, N. Reassessing the relationship between juvenile mortality and genetic monomorphism in captive cheetahs. *Zoo Biol* 1996; 15: 353-369.
- Wildt DE, Chan SYW, Seager SWJ, Chakraborty PK. Ovarian activity, circulating hormones, and sexual behaviour in the cat. I. Relationships during the coitus-induced luteal phase and the estrous period without mating. *Biol Reprod* 1981; 25: 15-28
- Wildt DE, Roth TL. Assisted reproduction for managing and conserving threatened felids. *Int Zoo Yb* 1997; 35: 164-172.
- Wildt DE, Rescuing endangered animals with assisted reproductive technology. *Sex Reprod Memo* 2009; 7: 21-25
- 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.
- 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.
- Xu KP, Greve T, Smith S, Hyttel P. Chronological Changes of bovine follicular oocyte maturation in vitro. *Acta Vet Scand* 1986; 27: 505-519.
- Yang YB, Lu KH. The influence of bovine oocyte type on in vitro fertilization and subsequent development in vitro. *Theriogenology* 1990; 83: 355.