



哺乳類卵母細胞の体外発育に関する研究

平尾, 雄二

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

1993-03-31

(Date of Publication)

2012-06-15

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1187

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.11501/3092466>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001187>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

哺乳類卵母細胞の体外発育に
関する研究

平成5年1月

神戸大学大学院自然科学研究科

平尾雄二

博士論文

哺乳類卵母細胞の体外発育に
関する研究

平成5年1月

神戸大学大学院自然科学研究科

平尾雄二

哺乳類卵母細胞の体外発育に関する研究

第 1 章	緒論	1
第 2 章	マウス卵母細胞の体内発育	
第 1 節	緒言	3
第 2 節	卵母細胞における減数分裂の進行	4
第 3 節	卵母細胞の発育と卵胞の発達	18
第 4 節	小括	23
第 3 章	マウス卵母細胞の体外発育	
第 1 節	緒言	24
第 2 節	器官培養卵巣における卵母細胞の初期発育	26
第 3 節	発育途上卵母細胞の体外発育	40
第 4 節	小括	52
第 4 章	体外発育マウス卵母細胞の体外成熟および体外受精	
第 1 節	緒言	53
第 2 節	体外発育卵母細胞の体外成熟	54
第 3 節	体外発育卵母細胞の成熟能力	61
第 4 節	体外発育・成熟卵母細胞の体外受精	68
第 5 節	小括	74
第 5 章	ブタ卵母細胞の体外発育	
第 1 節	緒言	75
第 2 節	卵胞の採取方法および培養方法	76
第 3 節	卵母細胞の体外発育	89
第 4 節	小括	99
第 6 章	体外発育ブタ卵母細胞の体外成熟および体外受精	
第 1 節	緒言	100
第 2 節	体外発育卵母細胞の成熟能力	101
第 3 節	体外発育・成熟卵母細胞の体外受精	106
第 4 節	小括	110
第 7 章	総括・謝辞・引用文献	111

第1章 緒論

哺乳類における卵母細胞の形成は胎子期に始まる。雌胎子の卵巣原基に移入した始原生殖細胞は、卵原細胞として有糸分裂により増数したのち、減数分裂を開始して卵母細胞となる。卵母細胞は出生後の卵巣において第Ⅰ減数分裂前期で停止したまま発育し、同時にそれを包む卵胞も発達する。卵胞内で発育を完了した卵母細胞は、下垂体から放出される性腺刺激ホルモンの刺激によって減数分裂を再開し、染色体の半分を第1極体として放出して、第Ⅱ減数分裂中期へと成熟する。ほとんど全ての哺乳類では、この段階で排卵が起こり、卵母細胞は受精の場である卵管へと排出される。

幼若哺乳類の卵巣内には、数万から数十万個にも上る莫大な数の未発育卵母細胞が含まれている¹⁾。しかし、そのほとんどは発育開始以前、または発育途上で退行する。このように生体内では退行する多数の卵母細胞を体外で発育させるための培養系を確立することは、哺乳類における卵母細胞の形成機構を解明するうえで重要であり、また、雌家畜の潜在的繁殖能力の利用拡大という実用的観点からも極めて有意義と考えられる。

1977年に、Eppig²⁾は、マウス卵巣から分離した発育途上卵母細胞は、顆粒膜細胞との接触が保たれる状態で培養されれば、最終段階まで発育し、その後の成熟培養により一部は第Ⅱ減数分裂中期へと成熟することを見出した。さらに、1989年に、EppigとSchroeder³⁾は、低率ではあるが体外発育マウス卵母細胞に由来する産子の誕生を報告し、それを契機として、卵母細胞の体外発育に関する研究がにわかに脚光を浴びることになった。しかし、マウス以外の動物種におけるこの種の研究としては、Eppigの培養系を用いてラット卵母細胞の体外発育に成功したDanielら⁴⁾の報告をあげうるにすぎない。

本研究では、家畜の発育途上卵母細胞の発育培養系を確立する目的で、まず発育途上マウス卵母細胞の体外発育に影響する諸要因について検討するとともに、最終段階まで発育した卵母細胞について成熟能力および受精能力を調べた。ついで、マウスで得られた知見をもとに、発育途上ブタ卵母細胞の発育培養を

試み，得られた体外発育卵母細胞の成熟能力および受精能力について検討した。

第2章 マウス卵母細胞の体内発育

第1節 緒言

マウスやラットの卵原細胞は、胎子の卵巣内で減数分裂を開始して卵母細胞となる⁵⁾。減数分裂開始に関わる機構は未だ不明であるが、その開始から第I減数分裂前期のディプロテン期で停止するまでの染色体の形状変化は、多くの卵母細胞でほぼ同調して起こるとされている⁶⁻¹⁰⁾。ディプロテン期に達した卵母細胞は、その周囲を扁平な卵胞細胞(または顆粒膜細胞の前駆細胞)によって包まれる。原始卵胞の形成である。出生後、一部の原始卵胞内で卵母細胞は発育を開始する。マウス卵母細胞ではその直径が約15 μm から80 μm へと増大し、同時にその周囲に透明帯が形成される。卵母細胞の発育に伴って、それを包む卵胞も発達する。宮野ら¹¹⁾によれば、直径39 μm の卵母細胞において、連続した透明帯が形成され、その周囲の顆粒膜細胞に形態変化が起こり、それに続いて顆粒膜細胞が急速に増数する。

本章の実験は、マウス生体内における卵母細胞の減数分裂の進行過程および卵母細胞の最終段階までの発育とそれに伴う卵胞の発達過程を明確にする目的で行われた。

第2節 卵母細胞における減数分裂の進行

マウス卵巣内における減数分裂の進行過程を明らかにする目的で、妊娠14日齢から出生後8日齢までのマウスから卵巣を採取し、それぞれの日齢における生殖細胞の数およびそれらの核相の変化を調べた。また、生殖細胞の発育開始時期および卵胞の形成時期を明らかにする目的で、各日齢における生殖細胞の直径を測定するとともに、卵巣の組織染色標本を作製して卵巣内の生殖細胞および顆粒膜細胞の形態を観察した。なお、胎子期の卵巣内には卵原細胞と卵母細胞とが混在していたため、本節ではこれらをまとめて生殖細胞と呼ぶ。

材料および方法

1) 卵巣の採取

ddY系成熟雌マウス(日本エスエルシー株式会社)を同系統の成熟雄マウスと自然交配させ、得られた雌胎子および雌産子を実験に供した。腔栓の認められた日を妊娠1日とし、妊娠14日、妊娠16日および妊娠18日の雌マウスを頸部脱臼法で屠殺後開腹し、子宮を採取した。子宮を切開し、100 μ g/mlの硫酸ストレプトマイシン(明治製菓)および200IU/mlのペニシリンGカリウム(明治製菓)を含む37 $^{\circ}$ CのDulbeccoのカルシウム、マグネシウム欠リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中に胎子を取り出した。実体顕微鏡下で胎子を開腹し、卵巣を中腎の付着した状態で採取した。また、出生直後(0日齢)、4日齢および8日齢の雌マウスについては、開腹したのち実体顕微鏡下に卵管および卵巣囊の付着した状態で卵巣を採取した。卵巣をあらかじめ37 $^{\circ}$ Cに加温しておいたEagleの最少必須培養液(MEM, 日水製薬)中に移し、卵巣囊を切開し、卵管を除去して卵巣を得た。

2) 卵巣組織染色標本の作製および生殖細胞数の算出

採取した卵巣を4 $^{\circ}$ Cの10%中性緩衝ホルマリンに2日間浸漬して固定し、50

%のエタノールに移して18時間脱水したのち、70%、80%、90%および100%のエタノール上昇系列にそれぞれ30分間浸漬して脱水した。これらの卵巣をメタクリレート系樹脂JB-4 (Polysciences Inc.) に包埋し、ミクロトームを用いて3 μ mの連続切片を作製した。切片を過ヨウ素酸-Schiff法(PAS法)で染色したのち、Ehrlichのヘマトキシリンで後染色した。卵巣当たりの生殖細胞数の算出にあたっては、同一生殖細胞を複数回加算しないよう、各卵巣について15 μ mごとに切片を観察し、核が認められる生殖細胞数を数えて合計値を求めた。データの統計的有意性は、t検定によって判定した。

3) 生殖細胞の核相の観察

胎子および新生子の卵巣から前述と同様の方法で卵巣を採取し、0.2%の濃度でプロナーゼ(アクチナーゼE, 科研製薬)を含むMEMに浸漬し、炭酸ガス培養装置内(37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂-95%空気)に30分間静置した。酵素処理後4mg/mlのウシ血清アルブミン(BSA, 和光純薬)および50 μ g/mlのピルビン酸ナトリウム(ナカライテスク)を含むMEMに卵巣を移して数分間ピペッティングし、卵巣細胞を分散させた。この細胞浮遊液を90gで5分間遠心分離したのち上清を除去し、沈澱に1mlの1%クエン酸ナトリウム水溶液を加えて細胞を再浮遊させ、室温に30分間静置して低張処理を施した。処理後、5~6滴のエチルアルコールと氷酢酸の1:1混合液(固定液)を滴下し、均一な細胞浮遊液とした。細胞浮遊液にさらに固定液を加えて10mlとし、ピペッティングにより細胞を均一に浮遊させた。170gで5分間遠心分離して上清を除去したのち、固定液10mlに再浮遊させた。再び170gで5分間遠心分離し、上清を取り除いたのち固定液0.3mlを加えて均一に攪拌した。細胞浮遊液をスライドガラスの中央に2, 3滴落とし、ほぼ等量の氷酢酸を加えたのちに乾燥させ、標本をギムザ染色して核相を観察した。まず、体細胞と生殖細胞とを区別した。生殖細胞については卵原細胞と、プレプロトテン期、レプトテン期、サイゴテン期、パキテン期およびディプロテン期にある卵母細胞に分類し、全生殖細胞に対するそれぞれの細胞の占める割合を求めた。データの統計的有意性は、 χ^2 検

定によって判定した。

4) 生殖細胞の直径の測定

各日齢のマウスから採取した卵巢をMEMで2回洗浄したのち、上述の酵素処理法によって卵巢細胞を分散させた。各日齢とも600個の生殖細胞について、その直径を倒立顕微鏡に接続した測微接眼レンズ(日本光学工業)を用いて0.5 μ m単位で測定した。

結果

妊娠14日齢では、生殖腺は卵巢、精巣ともに縦長の形態を示したが、卵巢組織は均質であるのに対し(図1, a), 精巣には縞状の精巣索が観察され(図1, b), 両者は容易に区別できた。妊娠16日齢では、卵巢が縦長であるのに対し、精巣は楕球形であった。妊娠18日齢では、卵巢、精巣ともに楕球形であったが(図1, c, d), 卵巢は腎臓背面に、精巣は下降して膀胱付近に位置していた。出生直後、4日齢および8日齢のマウス卵巢は、卵巢嚢に包まれた状態で腎臓の背面に位置していた。

妊娠14日齢から出生後8日齢にいたるマウス卵巢内の生殖細胞数の変化を図2に示す。妊娠14日齢から妊娠16日齢にかけて、生殖細胞数に有意な変化は認められなかったが、妊娠16日齢から妊娠18日齢にかけて生殖細胞数は有意に減少した。妊娠18日齢から出生直後までの間、生殖細胞数に有意な変化は認められなかったが、出生直後から4日齢にかけて生殖細胞数は再び減少した。4日齢および8日齢の間では生殖細胞数に有意な変化は認められなかった。

卵巢における生殖細胞の核相を図3に、それぞれの生殖細胞の占める割合を表1に示す。生殖細胞の核は円形であったのに対し、体細胞の核は扁平あるいはいびつな形状をしており、生殖細胞と体細胞の核は容易に区別できた(図3, b)。全検査細胞数に対する体細胞の割合は、妊娠14日で最も少なく53%であったが、その後日齢が進むとともに増加し、出生後8日齢では99%となっ

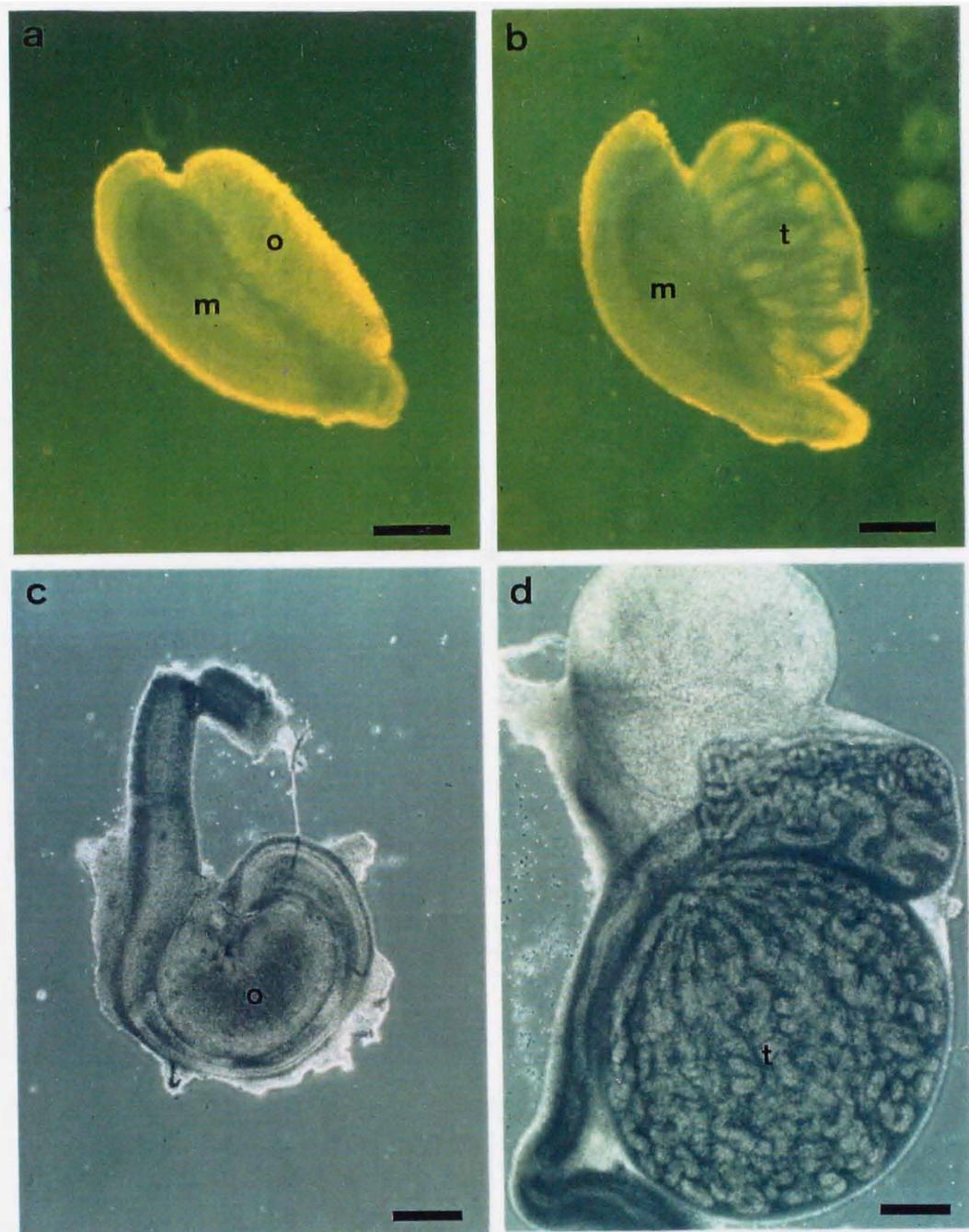


図1 胎児卵巢および胎児精巢
 a 妊娠14日齢マウス卵巢 (o).
 b 妊娠14日齢マウス精巢 (t).
 c 妊娠18日齢マウス卵巢 (o).
 d 妊娠18日齢マウス精巢 (t).
 胎児の生殖腺は中腎(m)に付着している。
 バーは300 μ mを示す。

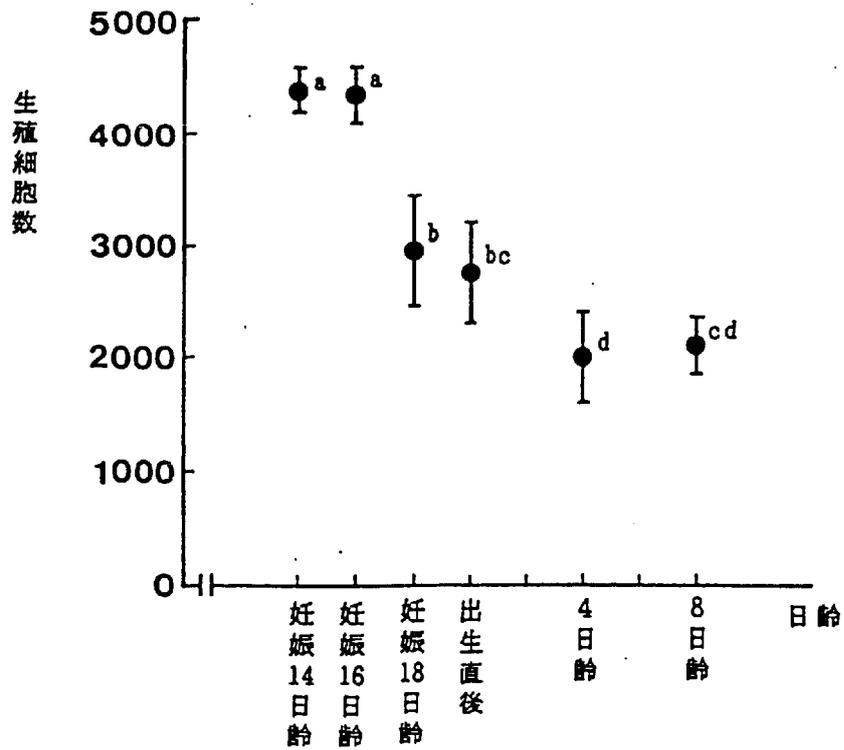


図2 マウス卵巣における生殖細胞数の変化
 それぞれの値は平均値±標準偏差(n=4)を表す。
 a-d 異なる肩文字を持つ数値間の差は有意。P<0.05, t検定。

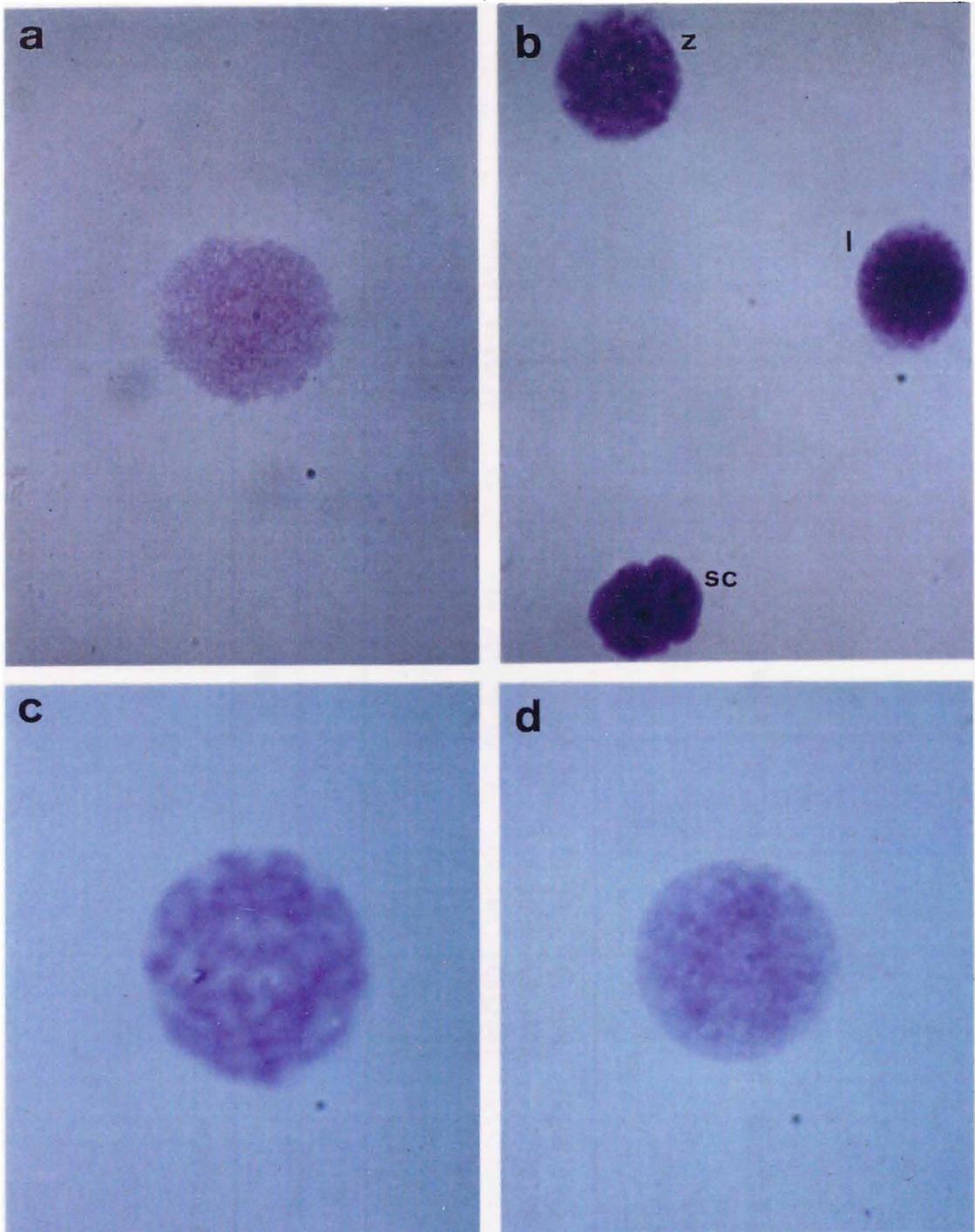


図 3 雌性生殖細胞の核相
 a 卵原細胞。
 b 体細胞(sc)とレプトテン期(l)およびサイゴテン期(z)の卵母細胞。
 c パキテン期の卵母細胞。
 d ティプロテン期の卵母細胞。

表1 マウス卵巣における生殖細胞の核相の分布

日齢	検査細胞数		生殖細胞数							
	細胞数	体細胞数 (%) ^a	計 (%) ^a	oo (%) ^b	pl (%) ^b	l (%) ^b	z (%) ^b	p (%) ^b	d (%) ^b	
妊娠14日齢	673	356(53) ^o	317(47) ^o	77(24) ^o	68(21) ^o	147(46) ^o	22(7) ^o	3(1) ^o	0(0)	
妊娠16日齢	2430	1902(78) ^d	528(22) ^d	2(0)	41(8) ^d	217(41) ^o	78(15) ^d	98(19) ^d	92(17) ^o	
妊娠18日齢	579	420(73) ^o	159(27) ^o	3(2) ^d	0(0)	36(23) ^d	11(7) ^o	12(8) ^o	97(60) ^d	
出生直後	1262	1095(87) ^f	167(13) ^f	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	4(2) ^o	163(98) ^o	
4日齢	3612	3312(92) ^g	304(8) ^g	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	304(100)	
8日齢	4189	4159(99) ^h	30(1) ^h	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	30(100)	

oo: 卵原細胞, pl: プレプロトテレン期, l: レプトテレン期, z: ザイゴテレン期, p: パキテレン期,

d: デイプロテレン期の卵母細胞.

^o: 検査細胞数に対する割合.

^b: 生殖細胞数に対する割合.

^{o-h}: 同じ列内の異なる肩文字を持つ数値間の差は有意. $P < 0.05$, χ^2 検定.

た。また、妊娠14日齢では、生殖細胞の24%は減数分裂を開始しておらず、卵原細胞であった。また、卵原細胞から減数分裂前期のレプトテン期の生殖細胞が92%を占め、ディプロテン期の生殖細胞は認められなかった。日齢とともにディプロテン期の生殖細胞の割合は増加し、その値は妊娠16日齢、妊娠18日齢および出生直後でそれぞれ17%、60%および98%となった。4日齢および8日齢では生殖細胞の全てがディプロテン期に達していた。

妊娠14日齢から出生後8日齢のマウス卵巣における生殖細胞の直径分布を図4に示す。いずれの日齢においても、直径 $20.0\mu\text{m}$ 未満の生殖細胞の割合が80%以上を占めた。出生後日齢が進むとともに一部の生殖細胞は直径を増大させ、直径 $25.0\mu\text{m}$ 以上の生殖細胞が4日齢で4%、8日齢で9%認められた。また、8日齢の卵巣では直径 $50.0\mu\text{m}$ 以上に発育した生殖細胞も認められた。

妊娠日齢、出生後日齢の経過に伴うマウス卵巣の組織像の変化を図5、図6および図7に示す。胎子期ではいずれの日齢においても生殖細胞は密接して存在し、卵胞の形成は認められなかった(図5, a-dおよび図6, aとb)。また、中腎より移入したと考えられる体細胞^{1,2)}が、生殖細胞の間隙に認められた(図5, b)。出生直後の卵巣内には直径 $20.0\mu\text{m}$ 未満の未発達な生殖細胞が多数存在していたが、透明帯は形成されておらず、周囲の顆粒膜細胞も扁平であった(図6, cとd)。4日齢では、一部の生殖細胞には透明帯が形成されており、その周囲を1~3層の立方化した顆粒膜細胞が取り囲んでいた(図7, aとb)。8日齢の卵巣には、より発達した卵胞が認められ、一部の卵胞では卵胞腔が形成されていた(図7, cとd)。

考察

卵巣内の生殖細胞数の日齢に伴う変化を調べる目的で、まず卵巣を酵素処理して細胞を分散させ、卵巣当たりの全生殖細胞数の測定を試みた。しかし、酵素処理あるいは遠心分離の過程で培養皿や遠沈管に付着した生殖細胞を完全に回収できず、安定した結果が得られなかった。そこで、本実験では卵巣の $3\mu\text{m}$

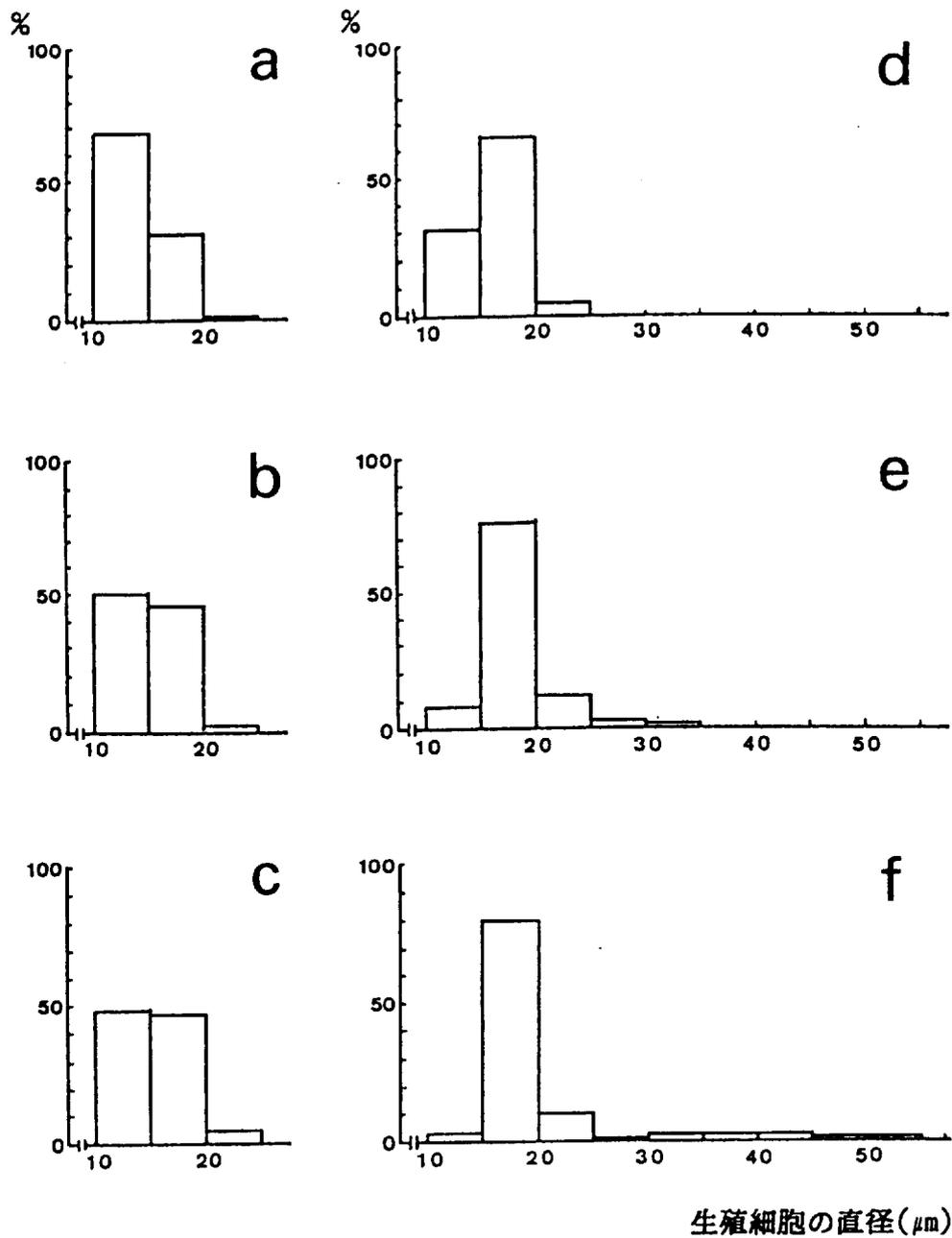


図4 マウス卵巢における生殖細胞の直径分布
 a 妊娠14日齢 (n=600).
 b 妊娠16日齢 (n=600).
 c 妊娠18日齢 (n=600).
 d 出生直後 (n=600).
 e 4日齢 (n=600).
 f 8日齢 (n=600).

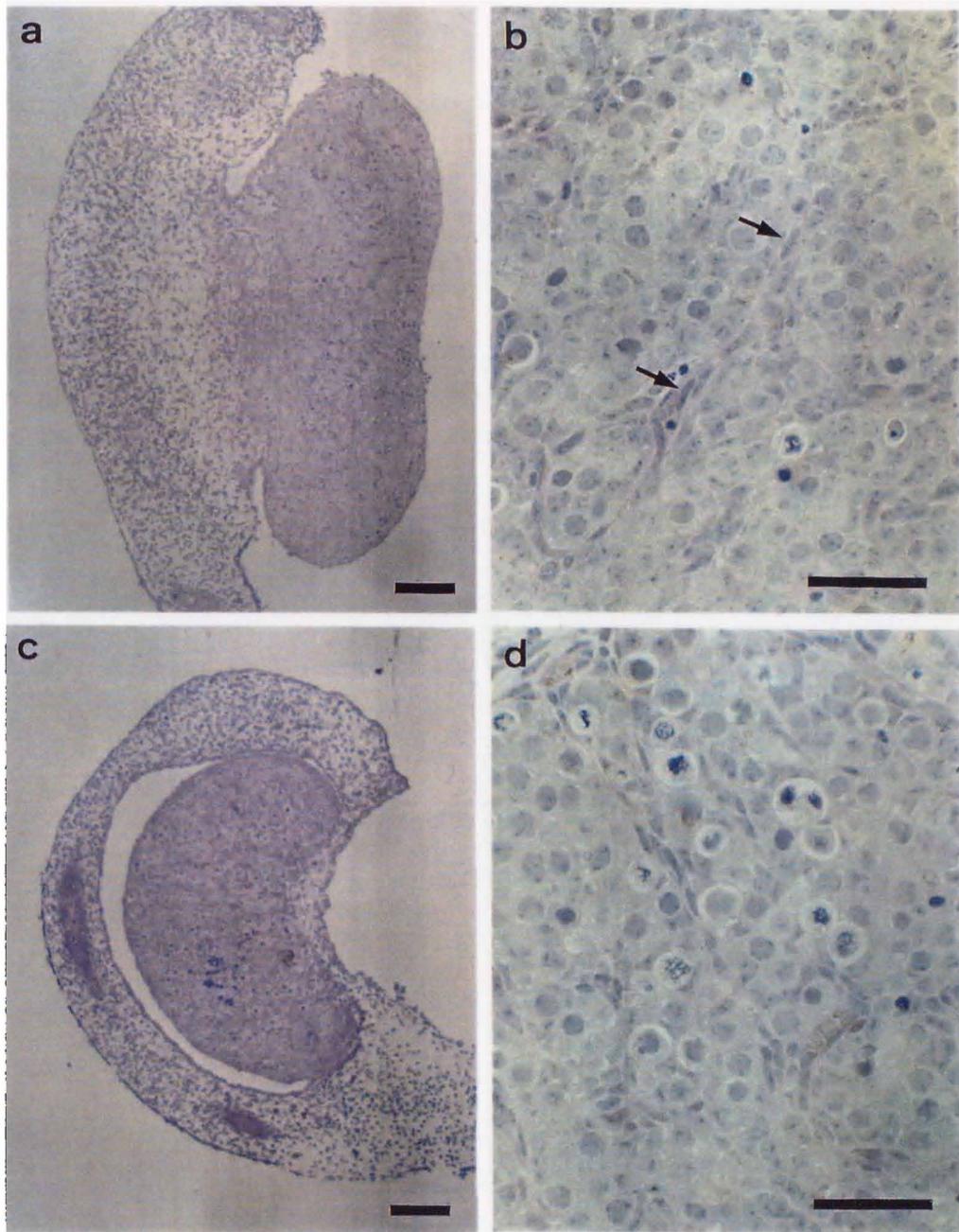


図5 妊娠14日齢および16日齢のマウス卵巢組織
 a 妊娠14日齢マウスの卵巢。
 b aの拡大像，生殖細胞の間に体細胞(→)が入り込んでいる。
 c 妊娠16日齢マウスの卵巢。
 d cの拡大像。
 a, c: バーは100 μ mを示す。
 b, d: バーは50 μ mを示す。

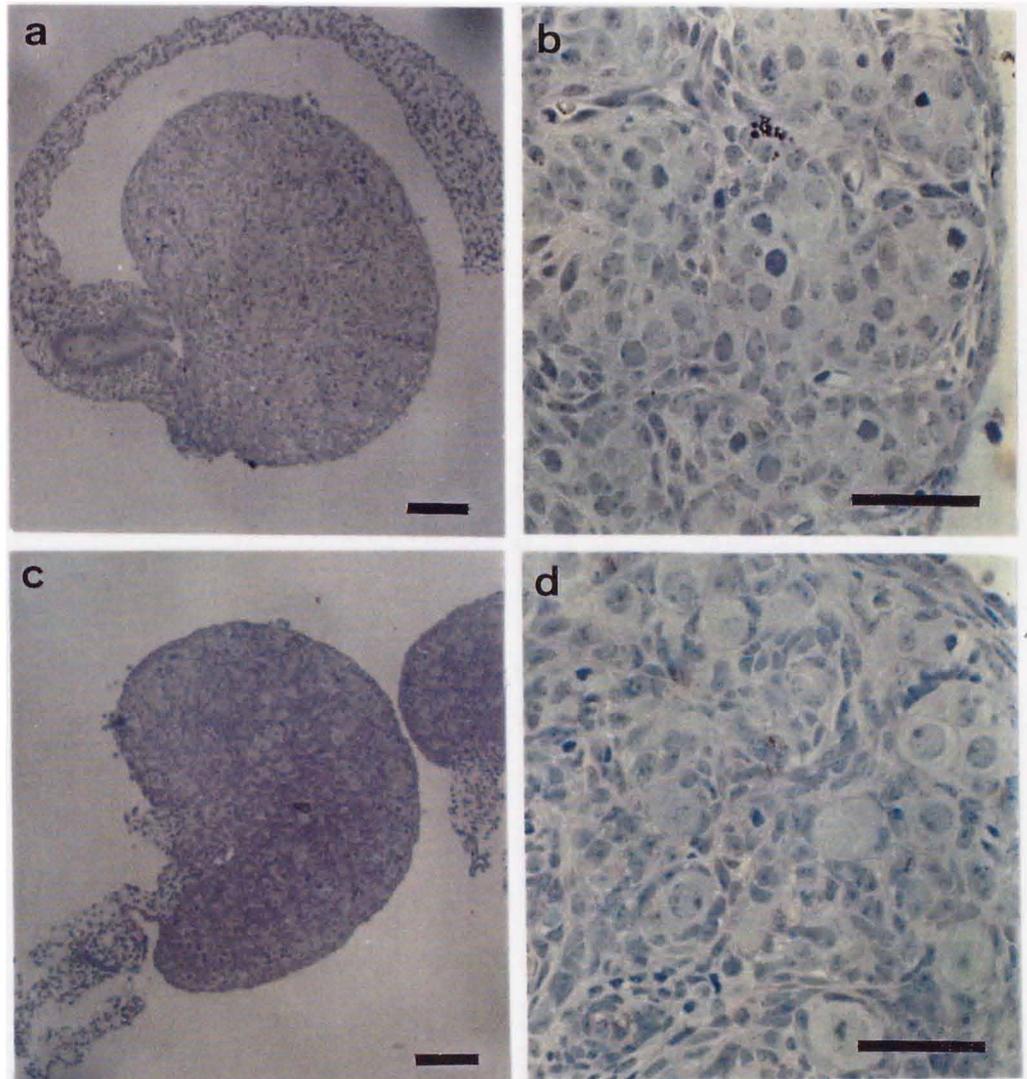


図6 妊娠18日齢および出生直後のマウス卵巢組織
 a 妊娠18日齢マウスの卵巢。
 b aの拡大像。
 c 出生直後マウスの卵巢。
 d cの拡大像，卵母細胞は扁平な顆粒膜細胞に取り囲まれている。
 a, c: バーは100 μ mを示す。
 b, d: バーは50 μ mを示す。

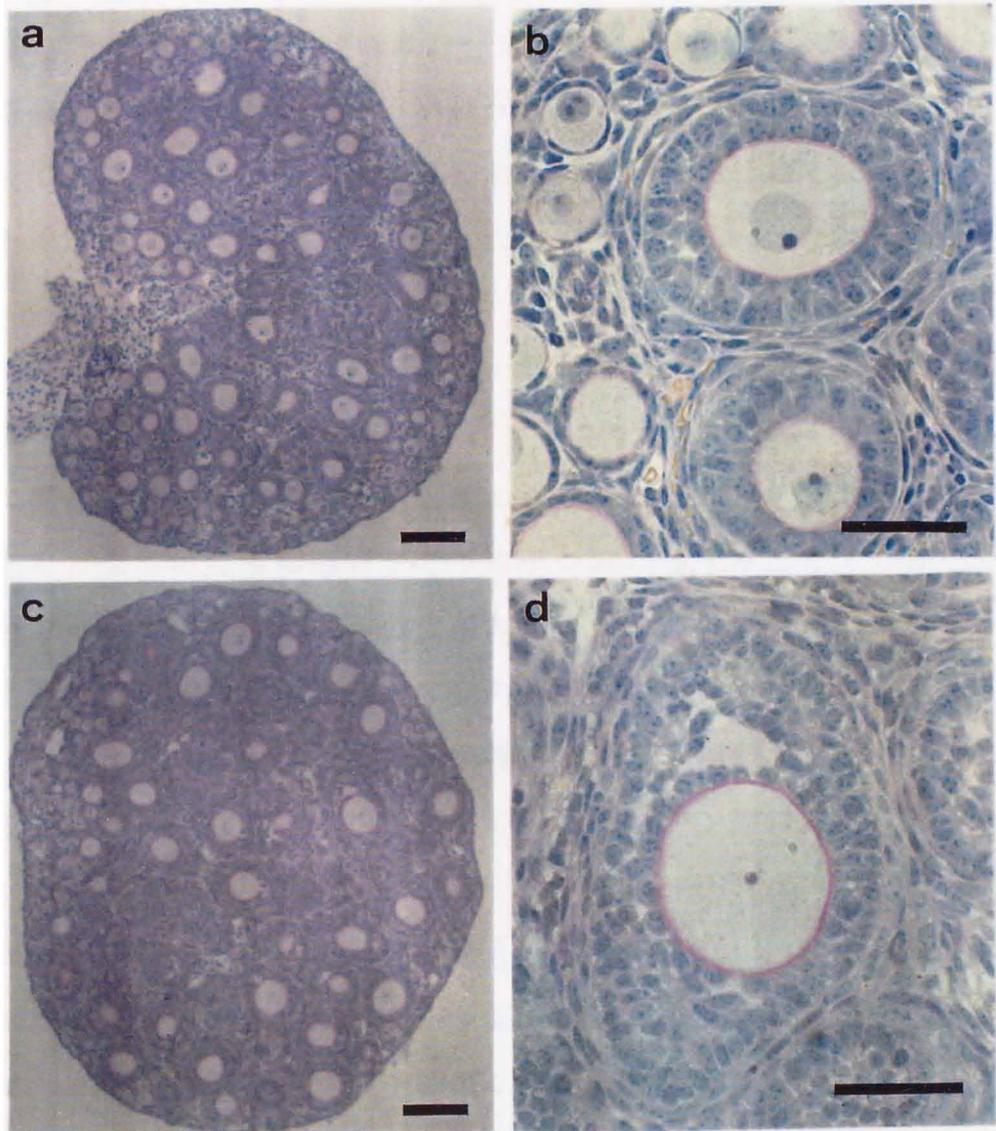


図7 4日齢および8日齢のマウス卵巢組織
 a 4日齢マウスの卵巢。
 b aの拡大像，発育した卵母細胞は，周囲に透明帯が形成され，2層ないし3層の立方状の顆粒膜細胞に取り囲まれている。
 c 8日齢マウスの卵巢。
 d dの拡大像，卵胞腔が形成された卵胞。
 a, c: バーは100 μ mを示す。
 b, d: バーは50 μ mを示す。

の連続切片を作製し、15 μ mごとに観察することによって生殖細胞数を算出した。

マウス胎子卵巣における生殖細胞の減数分裂の開始および進行に関しては、いくつかの報告が見られる。BakkenとMcClanahan⁶⁾およびEvansら⁷⁾は、妊娠14日齢卵巣内の生殖細胞のうちそれぞれ41%および19.5%が第I減数分裂のレプトテン期に達すると報告している。一方、Borum⁸⁾は、妊娠14日齢では大部分の生殖細胞がレプトテン期あるいはサイゴテン期にあったとしている。本実験において生殖細胞の核相を観察したところ、妊娠14日齢では46%の生殖細胞がレプトテン期以降に達していたが、この点ではBakkenとMcClanahan⁶⁾の報告とよく一致している。Borum⁸⁾も指摘しているように、妊娠14日齢では生殖細胞の核相の変化が著しいために、同一日齢であっても卵巣の採取時期によって結果に差異が生じると考えられる。サイゴテン期およびパキテン期への進行時期に関しては、研究者により若干の相違があるが、いずれにしても出生時にはほとんど全ての生殖細胞がディプロテン期に達している⁶⁻¹⁰⁾。本実験においても、出生時には98%の生殖細胞がディプロテン期に達していた。

減数分裂を開始した雌性生殖細胞、すなわち卵母細胞はもはや増殖しない。Baker¹³⁾は、ヒトにおいて第I減数分裂前期のパキテン期およびディプロテン期に多数の生殖細胞が退行すると報告している。パキテン期における退行の原因としては、相同染色体の対合の失敗が考えられており¹⁴⁾、またディプロテン期では卵胞形成の失敗がその原因と考えられている^{15, 16)}。本実験においても、生殖細胞数は、その多くがパキテン期を通過する妊娠16日齢から妊娠18日齢にかけて、また全てがディプロテン期に達し、卵胞形成も開始される出生直後から4日齢にかけて有意に減少した。卵巣内における体細胞および生殖細胞の割合を調べた結果、妊娠14日齢ではほぼ半数にすぎなかった体細胞が、8日齢では卵巣細胞の99%を占めた。胎子期においては中腎から卵巣内へ体細胞が移入すると考えられているが¹²⁾、減数分裂を開始した生殖細胞は減少するのに対し、体細胞は活発に有糸分裂を繰り返して増数したためと考えられる。

生殖細胞の直径は、卵原細胞から卵母細胞へ移行する時期、およびレプトテン期からディプロテン期へ移行する時期に増大すると報告されている¹⁷⁾。

本実験においても、直径10.0~14.5 μm の生殖細胞の割合は妊娠14日齢から出生直後にかけて減少し、15.0~19.5 μm の生殖細胞の割合が増加した。しかし、この間ほとんど全ての生殖細胞は直径20 μm 未満であり、出生後4日齢以降に観察されるような顕著な発育は認められなかった。

胎子期卵巣内の生殖細胞の周囲には卵胞形成は認められず、出生直後の卵巣において初めて一層の顆粒膜細胞が観察された。これらの顆粒膜細胞は、生殖細胞がディプロテン期に達したのちに、卵巣網由来の細胞が分化したものと考えられる¹²⁾。生殖細胞周囲の顆粒膜細胞は生殖細胞が一定の直径に発育したのち立方化し、その後増数することが報告されている¹¹⁾。本実験においても、立方状へと変化した顆粒膜細胞は4日齢および8日齢の卵巣内で発育途上にある生殖細胞の周囲にのみ認められた。

第3節 卵母細胞の発育と卵胞の発達

本節の実験では6日齢から22日齢のマウスを用い、卵巣内における卵母細胞の最終段階までの発育過程ならびに卵胞の発達過程を明らかにしようとした。

材料および方法

6日齢、10日齢、14日齢、18日齢および22日齢のd d Y系雌マウスから実体顕微鏡下に卵巣を採取した。卵巣をEagleのMEMで2回洗浄したのち、0.2%の濃度でプロナーゼを添加したMEMに浸漬し、炭酸ガス培養装置内(37℃, 5% CO₂-95% 空気)に30分間静置した。22日齢のマウス卵巣をプロナーゼ処理した場合、卵胞液と考えられる粘調な物質によって細胞の分散が阻害されたため、プロナーゼと150U/mlのヒアルロニダーゼ(Sigma)を併用して同様に処理した。酵素処理後、15%のウシ胎児血清(fetal calf serum; FCS, M. A. Bioproducts)を含むMEMに卵巣を移して数分間ピペティングし、卵巣の細胞を分散させて卵母細胞を裸化した。卵母細胞の直径は、40 μ m以上のものについて、倒立顕微鏡に装着した測微接眼レンズにより0.5 μ m単位で直径を測定した。また、各日齢の卵巣の組織染色標本を前節と同様の方法で作製し、卵母細胞の発育および卵胞の発達状況を調べた。

結果

6日齢から22日齢までのマウスから採取した卵巣を酵素処理した結果、卵巣組織は個々の細胞にまで分散し、卵母細胞は完全に裸化した状態で得られた(図8)。

図9に日齢に伴う卵母細胞の直径分布の変化を示す。いずれの日齢においても直径40.0 μ m以上の卵母細胞が認められたが、日齢が進むとともにより大きな直径の卵母細胞の占める割合は増加した。6日齢では、直径40.0 μ m以上の卵母

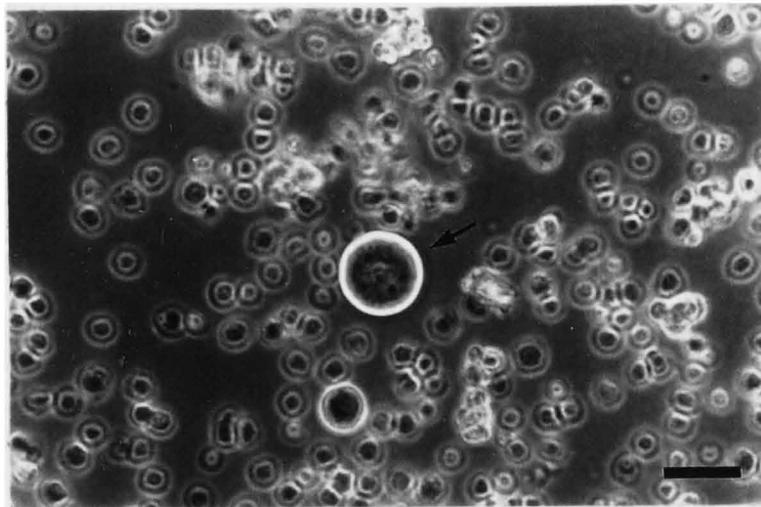


図8 6日齢マウス卵巣から酵素処理によって得られた裸化卵母細胞(→)。バーは50 μ mを示す。

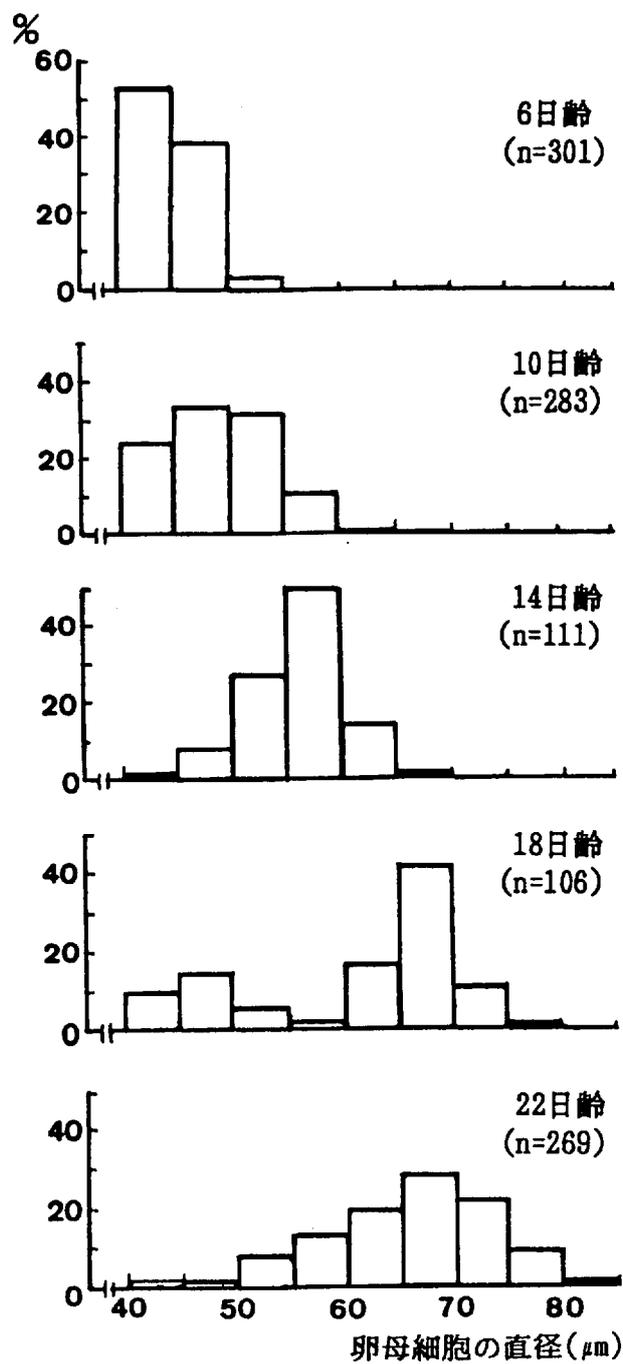


図9 マウス卵母細胞の直径の日齢に伴う変化

細胞のうち50.0 μ m未満のものが95%を占めた。しかし、10日齢では50.0 μ m以上の卵母細胞の占める割合が43%となり、14日齢では88%と増加した。18日齢および22日齢では、70.0 μ m以上の卵母細胞がそれぞれ12%および31%を占めた。

図10にそれぞれの日齢の卵巣組織を示す。いずれの日齢においても発育途上の卵母細胞は卵核胞期にあった。一方、卵胞の構造は日齢が進むとともに大きく変化した。すなわち、6日齢の卵巣では(図10, a), 発育を開始していない卵母細胞が卵巣白膜下に多数認められ、それらは扁平な1層の顆粒膜細胞で取り囲まれていた(一次卵胞)。他方、発育途上の卵母細胞は2層から3層の立方状の顆粒膜細胞に取り囲まれていた(二次卵胞)。また、一部の卵母細胞の周囲には透明帯が形成されていた。10日齢では(図10, b), 発育途上の卵母細胞を取り囲む顆粒膜細胞層は3層ないし4層へと増加しており、卵胞腔を形成した卵胞(胞状卵胞)も観察された。14日齢では(図10, c), 胞状卵胞数が増加し、18日齢および22日齢では胞状卵胞が卵巣組織の大部分を占めた(図10, d)。

考察

出生後6日齢から22日齢までのマウス卵巣内の卵母細胞の直径を調べたところ、18日齢において初めて直径70.0 μ m以上の卵母細胞が観察された。出生直後の卵巣では、ほとんど全ての卵母細胞は発育を開始していないことを考えると、卵母細胞が発育を完了するには18日間程度を要することになる。これまでマウスの卵母細胞の発育完了には2~3週間を要すると報告されており¹⁸⁾、本実験結果はこれと一致している。

出生後2週間で卵巣内における卵母細胞の50%が退行するとの報告がある¹⁸⁾。一方、この時期に最も多くの卵母細胞が発育を開始することも報告されている¹⁸⁾。本実験においても、この時期に発育を開始したと考えられる卵母細胞の集団、いわゆる“first wave”が現われ、日齢の経過とともに一層発育することが直径分布の変化から知られた。また、18日齢では胞状卵胞が卵巣組織の大部分を占めており、このことから多数の卵母細胞がそろって発育の最終段階に達するものと考えられる。

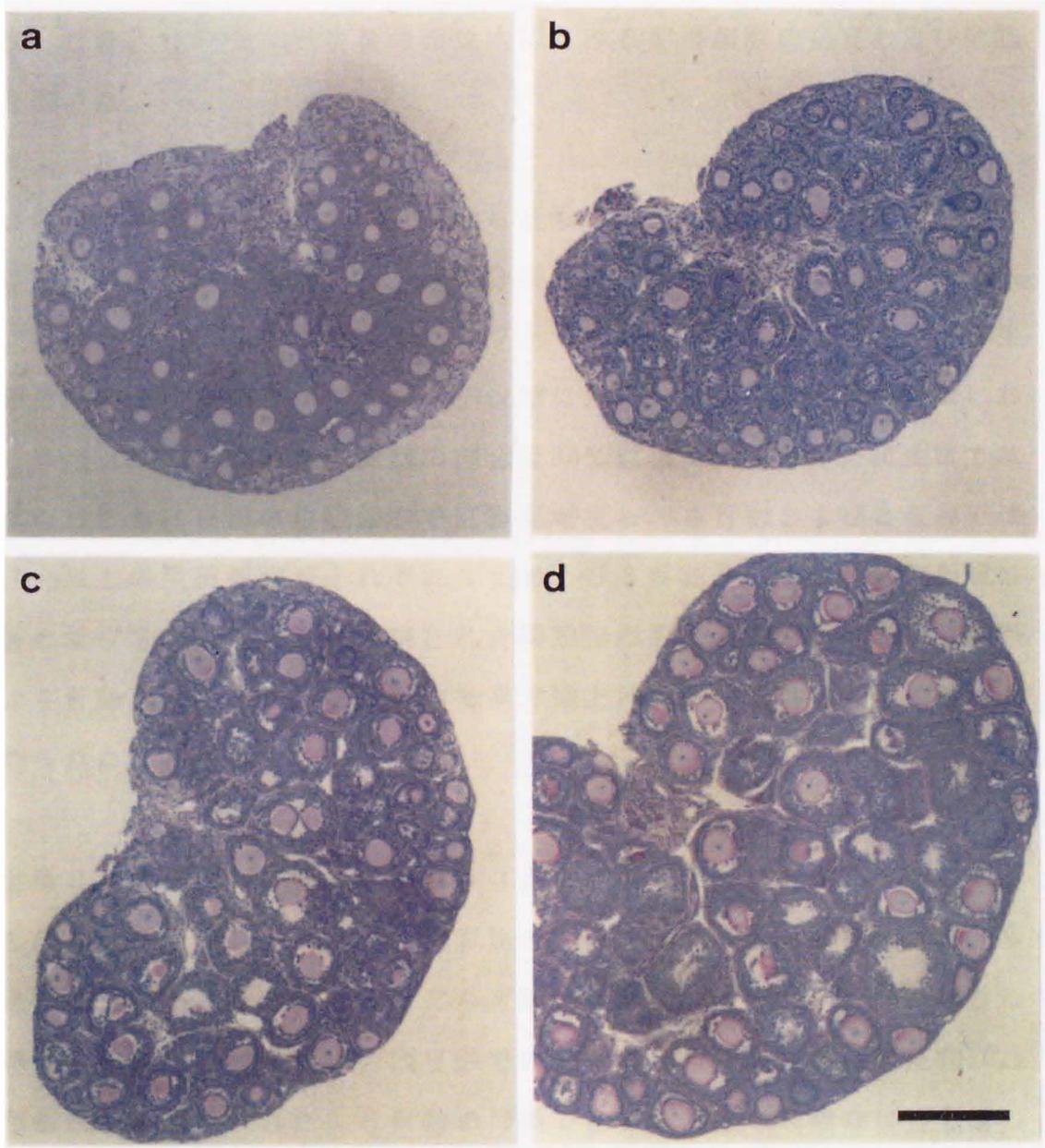


図10 マウス卵巣の発達
a 6日齢マウスの卵巣.
b 10日齢マウスの卵巣.
c 14日齢マウスの卵巣.
d 18日齢マウスの卵巣.
バーは200 μ mを示す.

第4節 小括

妊娠14日齢から出生後8日齢にいたるマウスの卵巣を用い、生殖細胞数の変化、減数分裂の進行過程、生殖細胞の発育開始時期、および卵胞の形成時期について検討した。ついで、出生後の卵巣内における卵母細胞の発育および卵胞の発達を調べた。

1) 卵巣内の生殖細胞数は妊娠16日齢から妊娠18日齢の間、および出生直後から4日齢にかけて有意に減少した。減数分裂の進行状態を調べたところ、妊娠14日齢において半数以上の生殖細胞がレプトテン期以降へと進んでおり、出生直後の卵巣内ではほぼ全てがディプロテン期に達していた。いずれの日齢においても、直径 $20.0\mu\text{m}$ 未満の生殖細胞の割合は80%以上であったが、出生後では日齢が進むとともに一部の生殖細胞で直径が増大し、4日齢および8日齢では直径 $25.0\mu\text{m}$ 以上の生殖細胞がそれぞれ4%および8%認められた。卵胞形成は出生直後のマウス卵巣で初めて観察され、顆粒膜細胞の扁平から立方状への形態変化は4日齢および8日齢の卵巣内で発育途上卵母細胞を含む卵胞においてのみ認められた。

2) 出生後6日齢から22日齢までのマウスから採取した卵巣を酵素処理して卵母細胞を裸化し、直径 $40.0\mu\text{m}$ 以上の発育途上卵母細胞の直径分布を調べた。6日齢では $50.0\mu\text{m}$ 以上の卵母細胞はほとんど認められなかったが、日齢が進むとともに卵母細胞の直径は増大し、18日齢では発育の最終段階である直径 $70.0\mu\text{m}$ 以上の卵母細胞が認められた。6日齢の卵巣では卵母細胞は2層ないし3層の立方状の顆粒膜細胞に取り囲まれていたが、10日齢では顆粒膜細胞が3層ないし4層へと増加しており、卵胞腔の形成も認められた。18日齢および22日齢では発達した胞状卵胞が卵巣組織の大部分を占めた。

第3章 マウス卵母細胞の体外発育

第1節 緒言

卵巣内で第I減数分裂前期のディプロテン期にある卵母細胞の一部は、卵胞の発達とともに、減数分裂を停止したまま発育する。卵母細胞の発育を開始させる因子は知られていないが、卵胞発達の開始については一過性の卵胞刺激ホルモン(FSH)濃度の増加が関与するとの考えがある¹⁹⁾。雌マウスでは、4日齢から13日齢にかけて、血清中のFSH濃度が急激に増加するが²⁰⁾、この時期に卵巣内の卵胞が発達を開始し、同時に卵母細胞は発育を開始する。これまで、卵胞の発達に対する性腺刺激ホルモンの作用は、下垂体を切除した動物に性腺刺激ホルモンを投与することによって調べられてきた。Raoら²¹⁾は、24日齢で下垂体を切除した雌ラットにFSHを投与すると顆粒膜細胞の増数が促進されると述べ、Hirshfield²²⁾は、下垂体を切除した雌ラットに妊馬血清性性腺刺激ホルモン(PMSG)を投与すると顆粒膜細胞の分裂速度が早められると報告している。性腺刺激ホルモンが顆粒膜細胞の増数に関与することは卵巣を器官培養した実験でも示唆されている^{2, 23)}。しかし、卵胞の発達開始あるいは卵母細胞の発育開始に及ぼす性腺刺激ホルモンの作用に関する報告は見当たらない。

前章の実験において、出生直後のマウス卵巣内には、直径10~20 μ mの卵母細胞が多数存在することが知られた。それらの卵母細胞は、第I減数分裂前期のディプロテン期に達し、扁平な顆粒膜細胞で包まれてはいるが、未だ発育を開始していないと推定された。出生直後の卵巣を器官培養すれば、生体内では影響を及ぼす種々の要因を排除した条件下で、卵母細胞や卵胞の発達を開始させる因子を調べることができる。本章第2節では、出生直後のマウスの卵巣を器官培養し、卵母細胞の発育が体外において開始するか否かを調べるとともに、培養液中に性腺刺激ホルモンを添加し、その作用について検討した。

発育途上にある直径50 μ m程度の卵母細胞は体外においても発育することが知

られている²³⁾。卵母細胞の体外発育には共培養する細胞の有無²³⁾，細胞の種類²⁴⁾，卵母細胞と共培養細胞との接触状態²⁵⁾などが影響するとされているほか，cAMP類縁体²⁵⁾やヒポキサンチン²⁶⁾が発育に影響することも報告されている。しかし，卵母細胞の体外発育に十分な条件は未だ見出されていない。第2章第3節に記述したように，10日齢のマウス卵巣には直径45～55 μ mの卵母細胞が多数存在していた。本章第3節においては，これら発育途上にある卵母細胞を最終段階まで体外で発育させる培養条件について検討した。

第2節 器官培養卵巣における卵母細胞の初期発育

本節では、出生直後のマウスから採取した卵巣を器官培養し、体外における卵母細胞の発育、透明帯の形成、顆粒膜細胞の立方化および増数を調べるとともに、培養液中の性腺刺激ホルモンの影響について検討した。一般に、器官培養にはFCSを添加した培養液が用いられるが、FCS中には微量ながらFSHが含まれるため²⁷⁾、本節では、まずFCSを含まない、すなわち化学的に組成の明らかな培養液中での卵巣の器官培養を試みた。

材料および方法

1) 培養液

50 μ g/mlのピルビン酸ナトリウム(ナカライテスク)を含むMEMを基礎培養液として用い、必要に応じてFCS、BSAまたはその両者を添加したのち、濾過滅菌し、炭酸ガス培養装置内(37℃、5%CO₂-95%空気)に静置して温度およびpHを平衡させた。なお、PMSGの影響につき検討する実験では、10%FCSまたは4mg/mlのBSAを含む基礎培養液を用い、培養開始直前にPMSG(セロトロピン、帝国臓器)を最終濃度で2、10および50IU/mlとなるよう添加した。

2) 卵巣の器官培養

出生直後のddY系雌マウス(0日齢)から実体顕微鏡下に卵管および卵巣囊の付着した状態で卵巣を採取した。卵巣をあらかじめ37℃に加温しておいたMEM中に移し、卵巣囊を切開し、卵管を除去して卵巣を得た。卵巣をMEMで洗浄したのち、宮野ら²⁸⁾の方法に準じて器官培養した。すなわち、プラスチック製の培養皿(35×10mm, Falcon)の中心に卵巣を置き、それぞれの培養液を卵巣の表面に薄い培養液の層ができる程度(約0.8ml)に加え、炭酸ガス培養装置内で培養した。また、2日毎に培養液を新鮮なものと交換した。

3) 卵母細胞の直径測定および組織学的検討

培養4日および8日後に卵巣を回収し、MEMで2回洗浄したのち、2 mg/mlの濃度でプロナーゼを含むMEM中に移し、炭酸ガス培養装置内で30分間酵素処理した。卵巣を10% FCSを含む基礎培養液で1回洗浄したのち、同じ組成の培養液2 ml中に移し、ピペッティング操作を繰り返して卵巣内の細胞を分散させ、卵母細胞を完全に裸化した。各群200個ないし400個の卵母細胞を無作為に抽出し、その直径を、倒立顕微鏡に装着した測微接眼レンズを用いて測定した。データの統計的有意性は、Mann-Whitney検定によって判定した。

培養4日および8日後の卵巣から第2章第2節と同様の方法で組織染色標本を作製し、卵母細胞の発育、透明帯の形成状態、および顆粒膜細胞の形態を調べた。各卵巣について壊死組織が認められない切片を3枚選び、位相差顕微鏡下($\times 100\sim 400$)で切片中の全ての卵胞を観察した。透明帯については、形成されていないもの、形成されているが不連続なもの、および連続して卵母細胞の全周を取り囲んでいるものに分類した。顆粒膜細胞については、その形態が扁平なもの、立方状で単層のもの、および立方状で重層のものに分類し、全卵胞に対するそれぞれの占める割合を求めた。データの統計的有意性は、 χ^2 検定によって判定した。なお、対照として出生直後、4日齢および8日齢のマウスから採取した卵巣を用い、上述の方法で卵母細胞の発育、透明帯の形成状態および顆粒膜細胞の形態を観察した。

結果

FCS、BSAまたはその両者を含む培養液中で器官培養した卵巣における卵母細胞の平均直径を表2に示す。卵母細胞の直径は培養4日後、8日後ともに、全ての実験区で対照区(生体内)と同程度に増大していた。また、図11に示すように、卵母細胞の直径分布は、培養4日後および8日後ともに各区間で明瞭な差は認められなかった。

表2 FCSまたはBSA添加の培養液中で器官培養したマウス
 卵巣における卵母細胞の発育

培養液	卵母細胞の平均直径±標準偏差 ^a (μm)		
	0	培養日数 ^b 4	8
対照 (生体内)	15.9±2.3	18.0±3.0 ^d	19.1±6.4 ^d
10% FCS		17.1±2.8 ^e	21.1±5.4 ^e
1.0% FCS +3.6mg/ml BSA		18.6±3.5 ^e	18.7±4.0 ^e
0.1% FCS +3.96mg/ml BSA		17.9±3.2 ^d	20.3±4.4 ^e
4mg/ml BSA		18.9±4.0 ^e	20.8±4.8 ^e

^a n = 400.

^b 対照区ではマウスの日齢を表す.

^{c-e} 同じ列内の異なる肩文字を持つ区間の差は有意. P<0.05.
 Mann-Whitney検定.

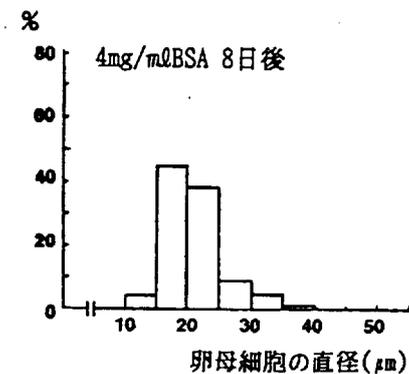
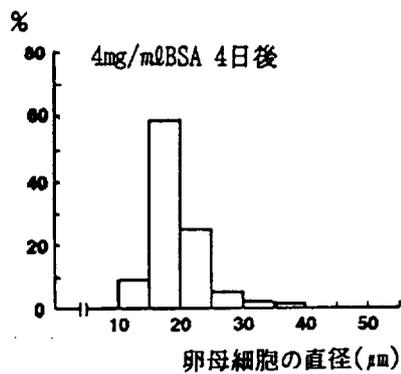
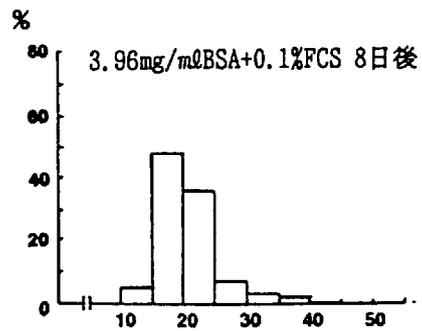
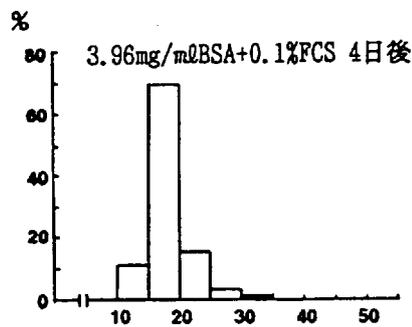
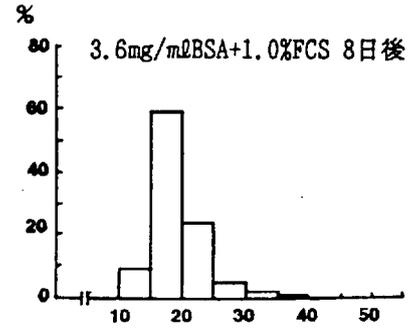
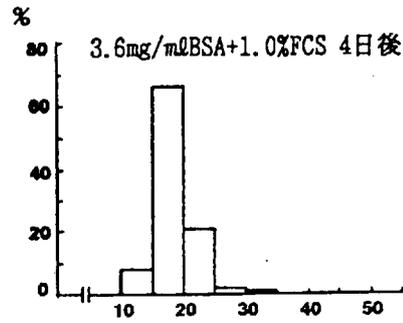
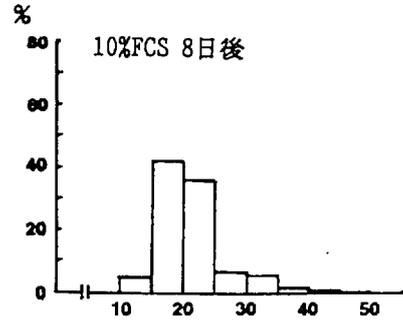
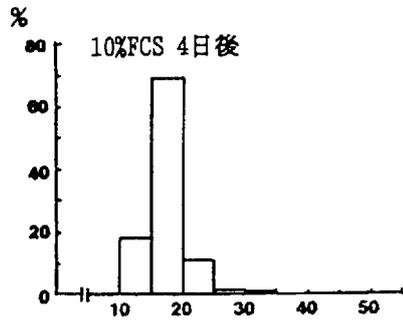


図11 FCSまたはBSA添加培養液中で器官培養したマウス卵巣における卵母細胞の直径分布 (n=400).

器官培養卵巣内の卵母細胞の直径に及ぼすPMSGの影響につき検討した結果を表3に示す。培養4日後の卵母細胞の平均直径は、FCS添加区およびBSA添加区ともにPMSG濃度の上昇に伴って増大した。培養8日後の直径については、FCS添加区ではPMSG濃度による差は見られなかった。しかし、BSA添加区では、10および50IU/mlのPMSG濃度で直径の増加が著しかった。また、卵母細胞の直径はBSA添加区よりもFCS添加区においてやや大であった。卵母細胞の直径分布に及ぼす影響については、FCS添加区(図12)、BSA添加区(図13)のいずれにおいても、PMSGの添加によって15.0~24.5 μ mの卵母細胞の割合が増加する傾向が認められた。

器官培養卵巣の組織染色標本を観察したところ、すべての卵巣において中央部および培養皿底面に接した部分で種々の程度の壊死が認められた。培養4日後および8日後の卵巣では出生直後よりも直径の増大した卵母細胞が認められた。

器官培養卵巣内の卵母細胞の透明帯の形成に及ぼすPMSGの影響につき検討した結果を表4に示す。透明帯を有する卵母細胞の割合は、培養4日後、8日後ともにBSA添加区よりもFCS添加区において高かった。FCS添加区内で比較すると、培養4日後では、連続した透明帯を有する卵母細胞の割合はPMSG添加により有意に上昇したが、培養8日後ではPMSGの効果は認められなかった。また、BSA添加区内では、透明帯を有する卵母細胞の割合はPMSG添加区(10および50IU/ml)において高く、培養8日後では連続した透明帯を有する卵母細胞の割合は全てのPMSG添加区において有意に高かった。

器官培養卵巣内の顆粒膜細胞の形態変化に及ぼすPMSGの影響について検討した結果を表5に示す。培養4日後および8日後ともに、立方化した顆粒膜細胞を有する卵胞の割合はPMSG添加の有無に関わりなく対照区(生体内)の値よりも有意に低かった。重層化した顆粒膜細胞を有する卵胞はFCS添加区で8日間培養した場合にのみ観察されたが、PMSGによる促進作用は認められなかった。また、顆粒膜細胞の立方化した卵胞の占める割合はBSA添加区

表3 器官培養マウス卵巣内の卵母細胞の直径に及ぼすPMSGの影響

培養液	PMSG (IU/ml)	卵母細胞の平均直径±標準偏差 ^a (μm)		
		0	培養日数 ^b 4	8
対照 (生体内)		15.7±2.4	18.4±3.5 ^{°d}	19.6±8.0 ^f
10% FCS	0		18.1±3.9 [°]	20.4±5.5 ^{d°}
	2		18.6±3.9 ^{d°f}	20.3±5.3 ^{d°}
	10		18.9±2.8 [°]	19.8±3.7 ^{d°}
	50		18.7±3.2 ^{d°*}	20.7±5.7 [°]
4 mg/ml BSA	0		18.2±3.9 [°]	19.8±5.2 ^d
	2		18.1±2.8 ^{°f}	17.1±2.0 [°]
	10		18.7±3.8 ^{d°f}	19.8±4.2 ^d
	50		20.5±4.8 [*]	20.3±5.2 ^{d°}

^a n=200.

^b 対照区では日齢を表す.

^{°*} 同じ列内の異なる肩文字を持つ区間の差は有意. P<0.05.
Mann-Whitney検定.

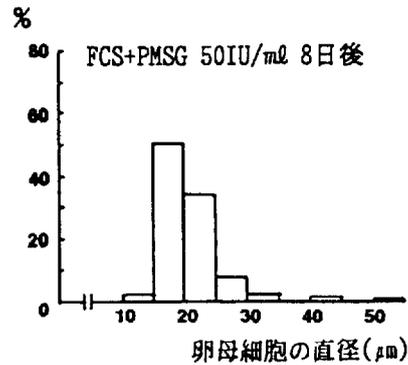
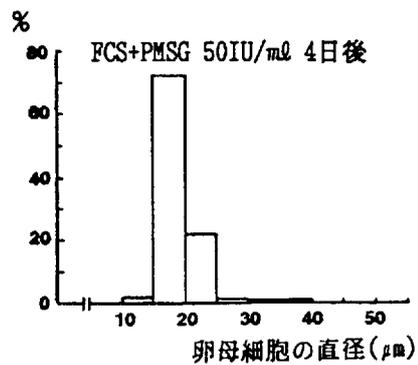
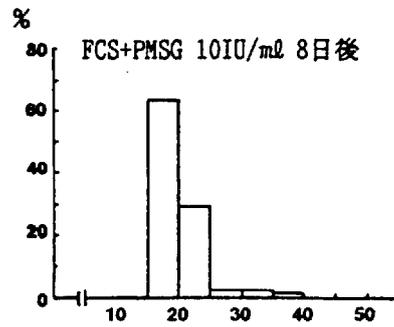
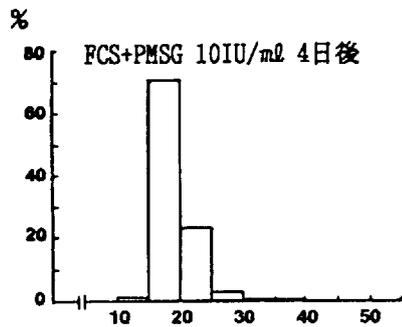
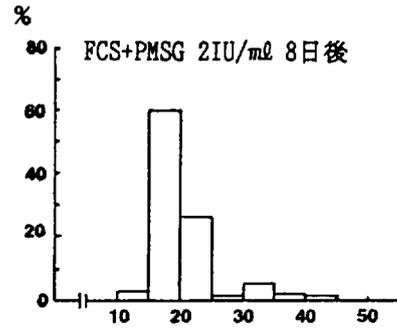
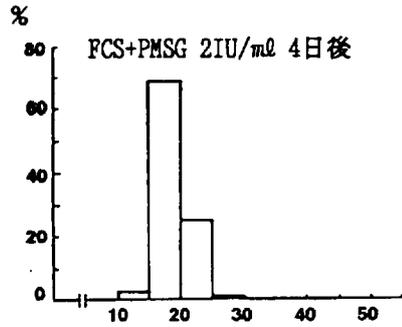
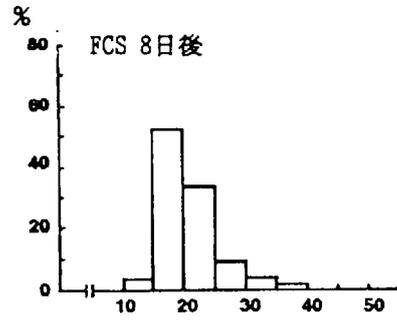
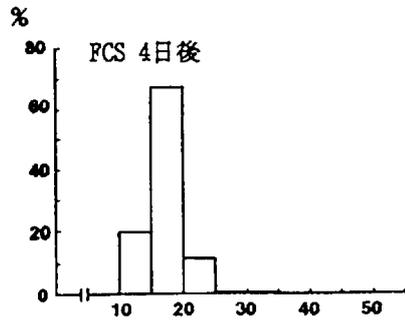


図12 FCS添加培養液中で器官培養したマウス卵巣内の卵母細胞の直径分布に及ぼすPMSGの影響(n=200).

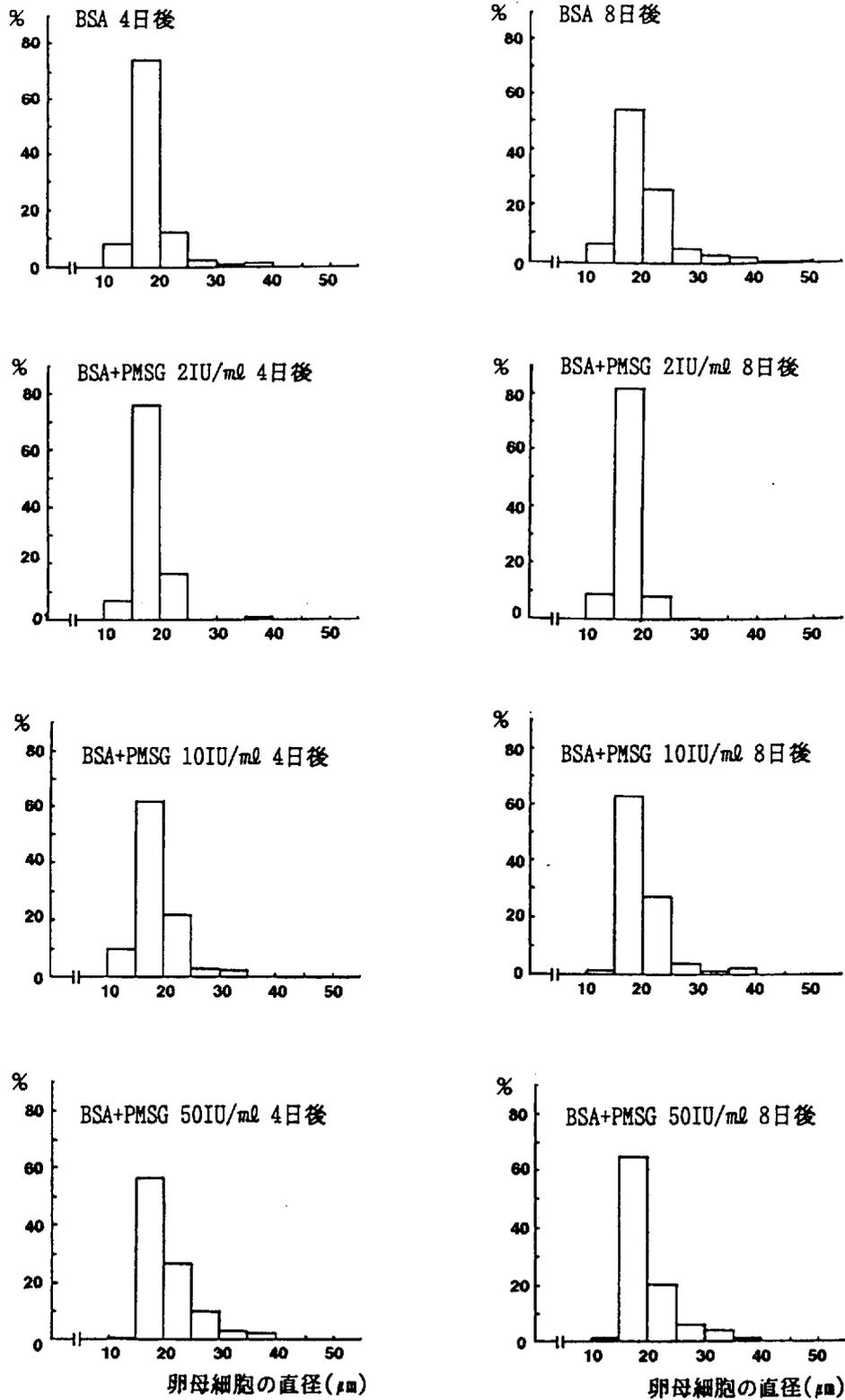


図13 B S A 添加培養液中で器官培養したマウス卵巣内の卵母細胞の直径分布に及ぼす P M S G の影響 (n=200).

表4 器官培養マウス卵巣における卵母細胞の透明帯形成に及ぼすPMSGの影響

培養日数	培養液	PMSG (IU/ml)	検査卵母 細胞数	卵母細胞数 (%)			
				無し ^a	不連続 ^a	連続 ^a	
0 (対照区) ^b	—	—	637	637(100)	0(0)	0(0)	
4 (対照区) ^b	—	—	627	441(70.3)	79(12.6)	107(17.1)	
8 (対照区) ^b	—	—	487	295(61.3)	45(9.3)	144(29.8)	
4	10% FCS	0	454	378(83.3) ^d	68(15.0)	8(1.8) ^d	
		2	556	441(79.3) ^d	72(12.9)	43(7.7) ^{c,d}	
		10	489	364(74.4)	84(17.2)	41(8.4) ^{c,d}	
		50	443	370(83.5) ^d	53(12.0)	20(4.5) ^{c,d}	
	4 mg/ml BSA	0	732	660(90.2) ^d	53(7.2) ^d	19(2.6) ^d	
		2	730	655(89.7) ^d	73(10.0)	2(0.3) ^{c,d}	
		10	422	339(80.3) ^{c,d}	77(18.2) ^c	6(1.4) ^d	
		50	536	459(85.6) ^{c,d}	47(8.8) ^d	30(5.0) ^{c,d}	
	8	10% FCS	0	438	289(66.0)	54(12.3)	95(21.7) ^d
			2	305	212(69.5) ^d	31(10.2)	62(20.3) ^d
10			321	214(66.7)	40(12.5)	67(20.9) ^d	
50			545	378(69.4) ^d	36(6.6) ^c	131(24.0) ^d	
4 mg/ml BSA		0	1076	884(82.2) ^d	129(12.0)	63(5.9) ^d	
		2	408	305(74.8) ^{c,d}	28(6.9) ^c	75(18.4) ^{c,d}	
		10	469	345(73.6) ^{c,d}	51(10.9)	73(15.6) ^{c,d}	
		50	622	497(79.9) ^d	36(5.8) ^{c,d}	89(14.3) ^{c,d}	

^a透明帯の形成状態.

^b対照区(生体内)では卵巣採取時のマウスの日齢を表す.

^cPMSG無添加区の数値との差は有意. $P < 0.05$, χ^2 検定.

^d対照区(生体内)の数値との差は有意. $P < 0.05$, χ^2 検定.

表5 器官培養マウス卵巣における顆粒膜細胞の形態変化に及ぼすPMSGの影響

培養日数	培養液	PMSG (IU/ml)	検査 卵胞数	卵胞数 (%)			
				扁平 ^a	立方・単層 ^a	立方・重層 ^a	
0(対照区) ^b	—	—	637	637(100)	0(0)	0(0)	
4(対照区) ^b	—	—	627	529(84.4)	41(6.5)	57(9.1)	
8(対照区) ^b	—	—	484	340(70.2)	7(1.4)	137(28.3)	
4	10% FCS	0	454	452(99.6) ^d	2(0.4) ^d	0(0)	
		2	556	545(98.0) ^{od}	11(2.0) ^d	0(0)	
		10	489	480(98.2) ^{od}	9(1.8) ^d	0(0)	
		50	443	440(99.3) ^d	3(0.7) ^d	0(0)	
	4 mg/ml BSA	0	732	726(99.2) ^d	6(0.8) ^d	0(0)	
		2	730	729(98.2) ^d	1(0.1) ^d	0(0)	
		10	422	422(100)	0(0)	0(0)	
		50	536	524(97.2) ^d	12(2.2) ^d	0(0)	
	8	10% FCS	0	438	402(92.8) ^d	15(3.4)	21(4.8)
			2	305	275(90.1) ^d	27(8.9) ^{od}	3(1.0) ^{od}
10			321	298(92.8) ^d	22(6.9) ^{od}	1(0.3) ^{od}	
50			545	527(96.7) ^{od}	17(3.1)	1(0.3) ^{od}	
4 mg/ml BSA		0	1076	1070(99.4) ^d	6(0.6)	0(0)	
		2	408	393(96.3) ^{od}	15(3.7) ^c	0(0)	
		10	469	458(97.7) ^{od}	11(2.3) ^c	0(0)	
		50	622	612(98.4) ^d	10(1.6)	0(0)	

^a顆粒膜細胞の形態

^b対照区(生体内)では卵巣採取時のマウスの日齢を表す。

^cPMSG無添加区の数値との差は有意。P<0.05, χ^2 検定。

^d対照区(生体内)の数値との差は有意。P<0.05, χ^2 検定。

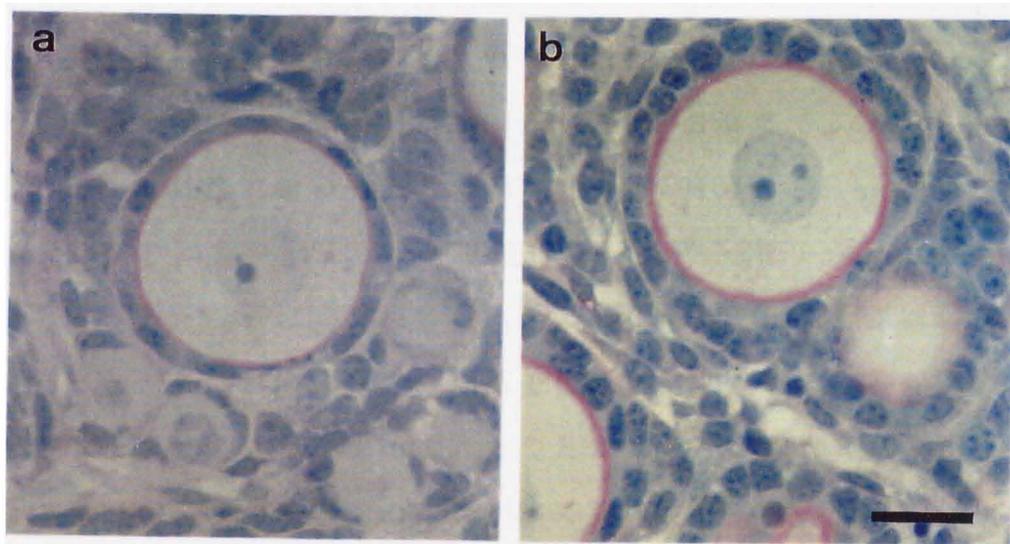


図14 器官培養8日後のマウス卵巣内における卵母細胞および顆粒膜細胞
a B S A 添加培養液中で発育した卵母細胞。周囲の顆粒膜細胞は扁平なままである。
b F C S 添加培養液中で発育した卵母細胞。周囲の顆粒膜細胞は立方状へと変化している。
バーは20 μ mを示す。

よりも F C S 添加区において高い値を示した(図14)。

考察

Eppig²⁾は、8日齢の雌マウスの卵巣を器官培養すると、卵母細胞が発育することを報告している。卵母細胞とその周囲の顆粒膜細胞との間にはギャップ結合が存在し²⁹⁾、それを介して種々の物質交換が行われると考えられている^{30, 31)}。また、発達途上の卵胞を採取し、体外培養した実験でも、ギャップ結合が維持された場合にのみ卵母細胞が発育することが知られている²⁾。本実験の器官培養卵巣内においても卵母細胞が発育が認められたが、卵母細胞と顆粒膜細胞と間のギャップ結合が維持されていたものと考えられる。

F C S または B S A を含む培養液に 2 ~ 50 IU/ml の濃度で P M S G を添加したところ、培養4日後において B S A 添加区では 50 IU/ml の P M S G 濃度で、また F C S 添加区では 2 ~ 50 IU/ml の濃度において直径 20.0 μ m 以上の卵母細胞の割合が増加した。しかし、P M S G による卵母細胞の発育促進は培養8日後では不明瞭となった。P M S G 無添加区では添加区に比べると壊死部分以外においても卵母細胞数の減少が認められたことから、小さな卵母細胞が退行した結果、相対的に大きな卵母細胞の割合が高くなった可能性が考えられる。生体内においては 20.0 μ m 未満の卵母細胞の割合が高いまま維持されることを考えると、P M S G の添加によって培養卵巣内の卵母細胞を取りまく環境が生体内のそれに近づき、直径 20.0 μ m 未満の卵母細胞が維持された可能性がある。Hardyら³²⁾は下垂体を除去したラットでは顆粒膜細胞の膜構造に異常が生じることを認め、そのような卵巣では顆粒膜細胞の突起数が減少するが、F S H を投与することによって回復すると報告している。また、体外培養されたブタ顆粒膜細胞では、F S H やインシュリンが顆粒膜細胞間のギャップ結合や小胞体の形成を促進するとの報告³³⁾もある。本実験においても P M S G 添加によりギャップ結合が維持され、卵母細胞の退行が抑制されたと考えられる。

いずれの実験区においても透明帯の形成が認められた。透明帯は卵母細胞

によって形成されることが、近年、標識したアミノ酸や糖の取り込みによって³⁴⁾、また透明帯に対する抗体を用いた間接蛍光抗体法³⁵⁾によって示唆されている。宮野ら¹¹⁾は、生体内および器官培養卵巣内においてマウス卵母細胞の直径が $39\mu\text{m}$ に達すると透明帯が形成されると報告している。本実験で器官培養した卵巣においても、一定の直径に達した卵母細胞は生体内と同様に透明帯の形成を開始したと思われる。PMSGの添加によって透明帯を有する卵母細胞の割合は増加したが、これはPMSG添加によって卵母細胞の発育が促進された結果と考えられる。また、透明帯の形成率はBSA添加区よりもFCS添加区で高かった。透明帯は3種類の糖タンパクより構成されており³⁶⁾、培養卵巣内では、培養液中のアミノ酸や糖の含有量がその形成に影響すると思われる。FCS中には、各種アミノ酸や糖が多量に存在することから、FCS添加による透明帯形成率の上昇は、培養液中に含まれる透明帯の前駆物質濃度の上昇に起因すると考えられる。あるいはFCS中に含まれるインシュリン様成長因子とPMSGの相乗効果によってギャップ結合の形成が促進された結果、顆粒膜細胞から卵母細胞への透明帯前駆物質の移行が促進された可能性も考えられる。

生体内では、顆粒膜細胞は扁平な形態から立方化したのち、急速に増数する¹¹⁾。器官培養した卵巣では、立方化した顆粒膜細胞を有する卵胞の割合は生体内の値より低く、また顆粒膜細胞の増数はPMSG添加によっても促進されなかった。下垂体を切除した未成熟雌ラットにFSH²¹⁾やPMSG²²⁾を投与することによって、あるいは4日齢のラット²³⁾あるいは8日齢のマウス²⁾の卵巣をそれらのホルモン存在下に器官培養することによって、顆粒膜細胞の増数が促進されることが報告されている。本実験において用いた出生直後の卵巣では顆粒膜細胞はすべて立方化する前の段階にあった。そのため、顆粒膜細胞が立方化したのちの卵胞について調べたこれらの報告^{2, 21-23)}とは異なる結果が得られたと考えられる。顆粒膜細胞の形態変化には性腺刺激ホルモンが関与しているとの考えもあるが³⁷⁾、その変化を誘導する因子は未だ不明である。本研究では立方化した顆粒膜細胞を有する卵胞の割合はいずれのP

M S G 濃度においても，B S A 添加区より F C S 添加区において高い値を示した。F C S 中に含まれているホルモンや種々の成長因子が顆粒膜細胞の形態変化に関与しているのかも知れない。

雌マウスでは，4日齢から13日齢にかけて血清中の F S H 濃度が急激に上昇し，18日齢まで高濃度のまま維持されたのち，低下することが報告されている²⁰⁾。この F S H 濃度の上昇は顆粒膜細胞の F S H 受容体の形成を促進することが報告されている³⁸⁾。本実験では，P M S G 添加により卵母細胞の発達や透明帯の形成が促進されたことから，出生後における性腺刺激ホルモン濃度の上昇は，卵母細胞の初期の発達に対しても影響を及ぼすと考えられる。

第3節 発育途上卵母細胞の体外発育

前章において、10日齢のマウス卵巣内には発育途上にある直径45~55 μ mの卵母細胞が多数存在すること、また、18日齢から22日齢の間に卵母細胞は発育の最終段階である直径70 μ m以上となることが知られた。

本節では、10日齢のマウス卵巣から採取した顆粒膜細胞に包まれた状態の卵母細胞を種々の培養条件下で12日間培養し、卵母細胞が体外で最終段階まで発育するか否かを検討した。

材料および方法

1) 卵母細胞と顆粒膜細胞の複合体の採取

10日齢のd d Y系雌マウスから採取した卵巣をMEMで3回洗浄したのち、2 mg/mlのコラゲナーゼ(和光純薬)および50 μ g/mlのピルビン酸ナトリウムを含むMEMに浸漬して炭酸ガス培養装置内に30分間静置した。酵素処理した卵巣を4 mg/mlのBSAおよび50 μ g/mlのピルビン酸ナトリウムを含むMEM(基礎培養液)で1回洗浄したのち、新鮮な同培養液中に移して約2分間ピペティングし、卵母細胞と顆粒膜細胞の複合体(oocyte-granulosa cell complex, 以下OGCと略記)を得た。

2) OGCの培養

基礎培養液および同液に2 mMのヒポキサンチン(興人)を添加した培養液(ヒポキサンチン培養液)を用い、以下の3種類の方法によりOGCを12日間培養した。いずれの培養方法においても培養液の半量を4日ごとに新鮮なものと交換した。

a. 培養液小滴中における培養

培養皿の底面(60 \times 15mm, Falcon)に培養液を10 μ lずつ分注したのち、上面を

パラフィンオイル(ナカライテスク)で覆い、炭酸ガス培養装置内(37℃, 5% CO₂-95% 空気)に静置してあらかじめ温度およびpHを平衡させた。直径45~55 μ mの卵母細胞を含むOGCを、3回洗浄したのち、培養液の小滴中に1個ずつ移し、炭酸ガス培養装置内で培養した。2日間隔で卵母細胞の直径を測定するとともに、卵母細胞の状態および生存性を調べた。卵母細胞の細胞質の希薄化と縮小、細胞膜の崩壊および細胞質の漏出などの退行像が認められた卵母細胞を退行卵母細胞と判定した。

b. 無処理培養皿内における培養

6個の卵巣から得たOGCを含む卵巣細胞を2.5mlの培養液に浮遊させ、無処理の培養皿(35×10mm, Falcon)内で培養した。卵母細胞周囲の顆粒膜細胞は培養皿底面に付着し、伸展したため、培養4日後、8日後および12日後にピペティングによってOGCを剥離し、卵母細胞を裸化したのち、40.0 μ m以上の卵母細胞についてその直径を測定した。

c. 寒天処理培養皿内における培養

顆粒状の寒天(Difco)を蒸留水に溶解させて1%の寒天溶液とし、1mlを培養皿(35×10mm)の底面に流して室温で凝固させた。寒天中の蒸留水をMEMに置換したのち、4個の卵巣から得たOGCを含む卵巣細胞を2.5mlの培養液に浮遊させ、培養皿に移して培養した。培養期間中、OGCは浮遊して相互に付着し、凝集塊を形成したため、培養4日後、8日後および12日後にピペティングによって分散させ、卵母細胞を裸化したのち、40.0 μ m以上の卵母細胞についてその直径を測定した。

結果

a. 培養液小滴中における培養

OGC(図15)はヒポキサンチンの有無に関わりなく培養12日後までにほとん

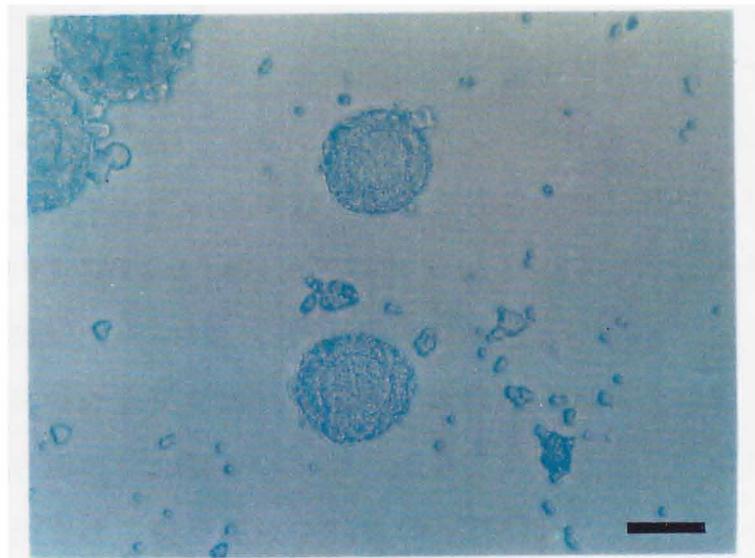


図15 10日齢マウス卵巣を酵素処理して得られた卵母細胞と顆粒膜細胞の複合体 (OGC)
バーは50 μ mを示す。

ど全ての卵母細胞が裸化し、その後退行した(図16)。

培養日数の経過に伴う卵母細胞の裸化率および生存率の推移を図17に示す。培養6日後における卵母細胞の裸化率は、基礎培養液およびヒポキサンチン培養液でそれぞれ56%(43/77)および32%(48/150)、培養8日後で86%(66/77)および60%(90/150)、培養10日後で100%(77/77)および91%(136/150)であり、ヒポキサンチン添加による有意な低下が認められた。一方、生存率は培養日数の経過とともに低下したが、培養8日および10日後ではヒポキサンチン培養液でやや高くなる傾向が認められた。卵母細胞の発育は、いずれの培養液を用いた場合にも認められなかった。

b. 無処理培養皿における培養

基礎培養液およびヒポキサンチン培養液のいずれを用いた場合でも、OGCは培養皿底面に付着して伸展し(図18)、培養6~8日後には底面から剥離した。同時に裸化した卵母細胞が出現し、培養8日および12日後の裸化率は基礎培養液でそれぞれ52%(652/1247)および59%(365/614)、ヒポキサンチン培養液で58%(428/737)および66%(459/695)となった。

卵母細胞の直径分布の変化を図19に示す。直径60.0 μ m以上の卵母細胞は培養開始時にはほとんど認められなかったが、培養日数の経過とともにその割合は増加し、培養12日後では基礎培養液で34%(90/266)、ヒポキサンチン培養液では40%(155/383)となった。また、いずれの培養液中においても、一部の卵母細胞は直径70.0 μ m以上へと発育した。

c. 寒天処理培養皿内における培養

OGCはいずれの培養液においても相互に付着して凝集塊を形成した(図20)。基礎培養液中で12日間培養した卵母細胞の裸化率は6%(26/416)であり、ヒポキサンチン培養液中では2%(13/609)であった。

卵母細胞の直径分布の変化を図21に示す。培養日数の経過とともに直径の大きな卵母細胞の割合は増加した。培養12日後には直径60.0 μ m以上の卵母細胞の

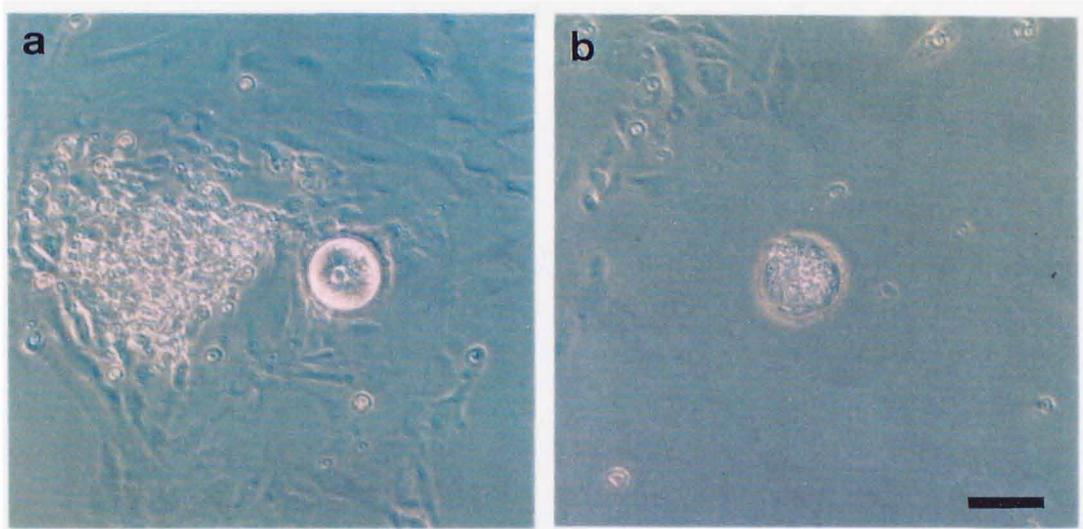


図16 培養液小滴中におけるOGCの培養
a 培養中に裸化した卵母細胞.
b 培養中に退行した卵母細胞.
バーは50 μ mを示す.

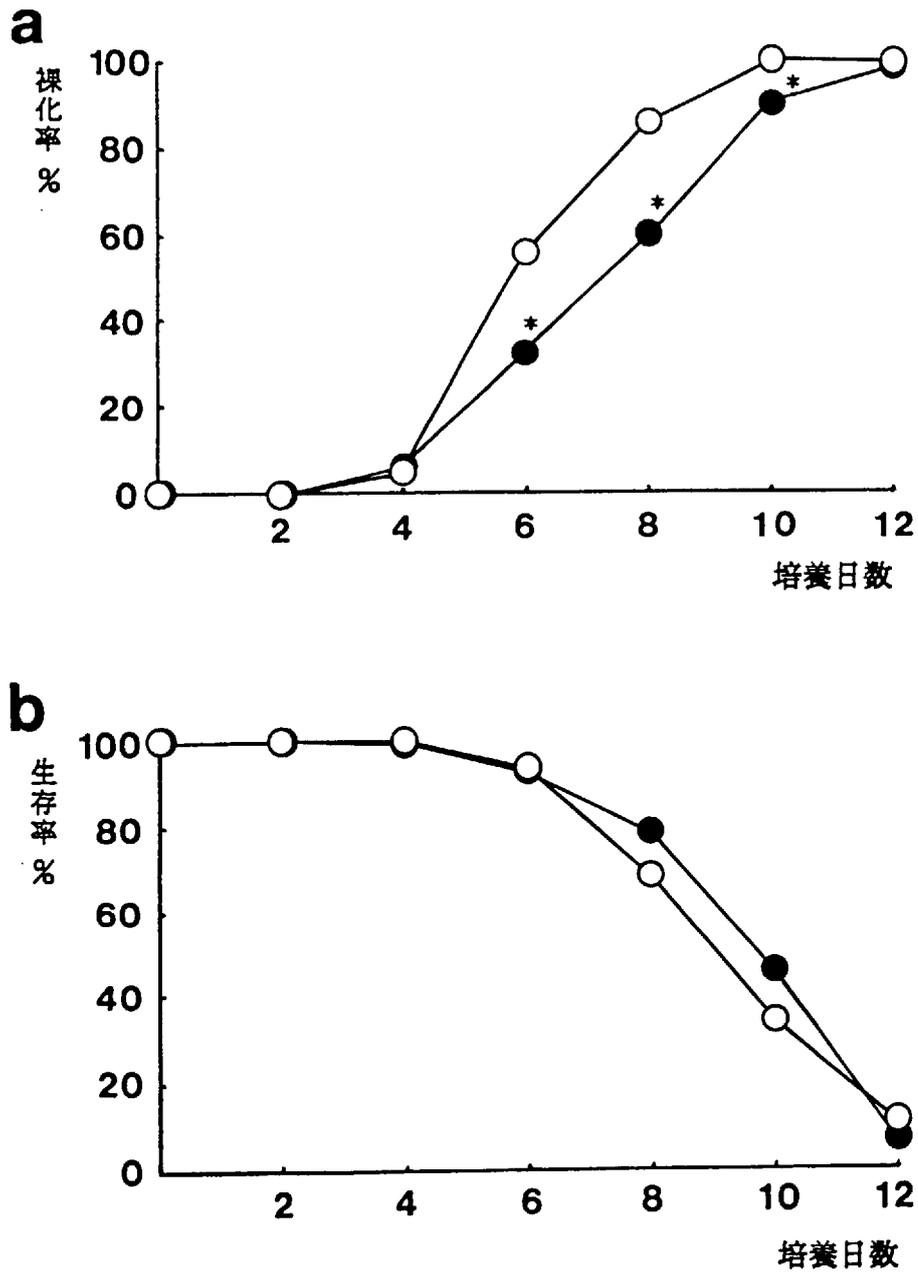


図17 培養液小滴中におけるマウス酵母細胞の裸化率および生存率の変化
 * 基礎培養液での数値との差は有意. $P < 0.05$, χ^2 検定.

○—○ 基礎培養液中 (n=77)
 ●—● ヒポキサンチン培養液中 (n=150)

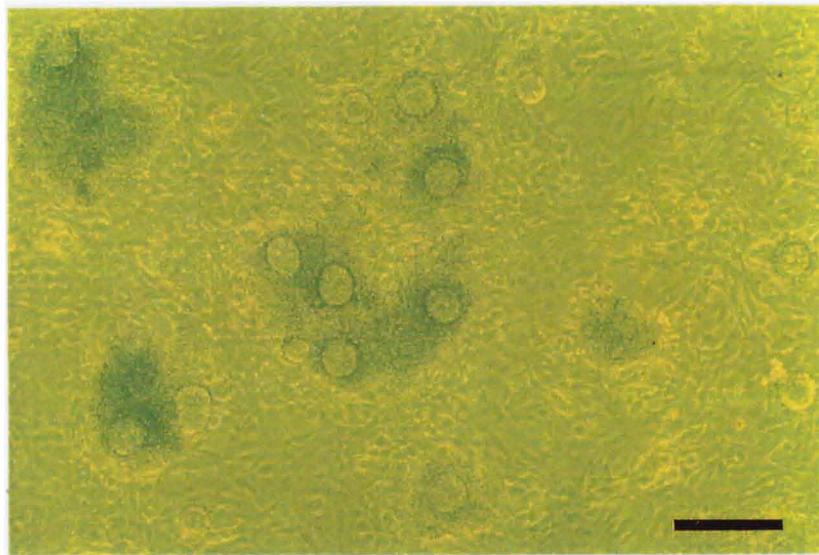


図18 無処理養皿の底面に付着した培養6日後のマウス卵母細胞と顆粒膜細胞の複合体(OGC)
バーは300 μ mを示す。

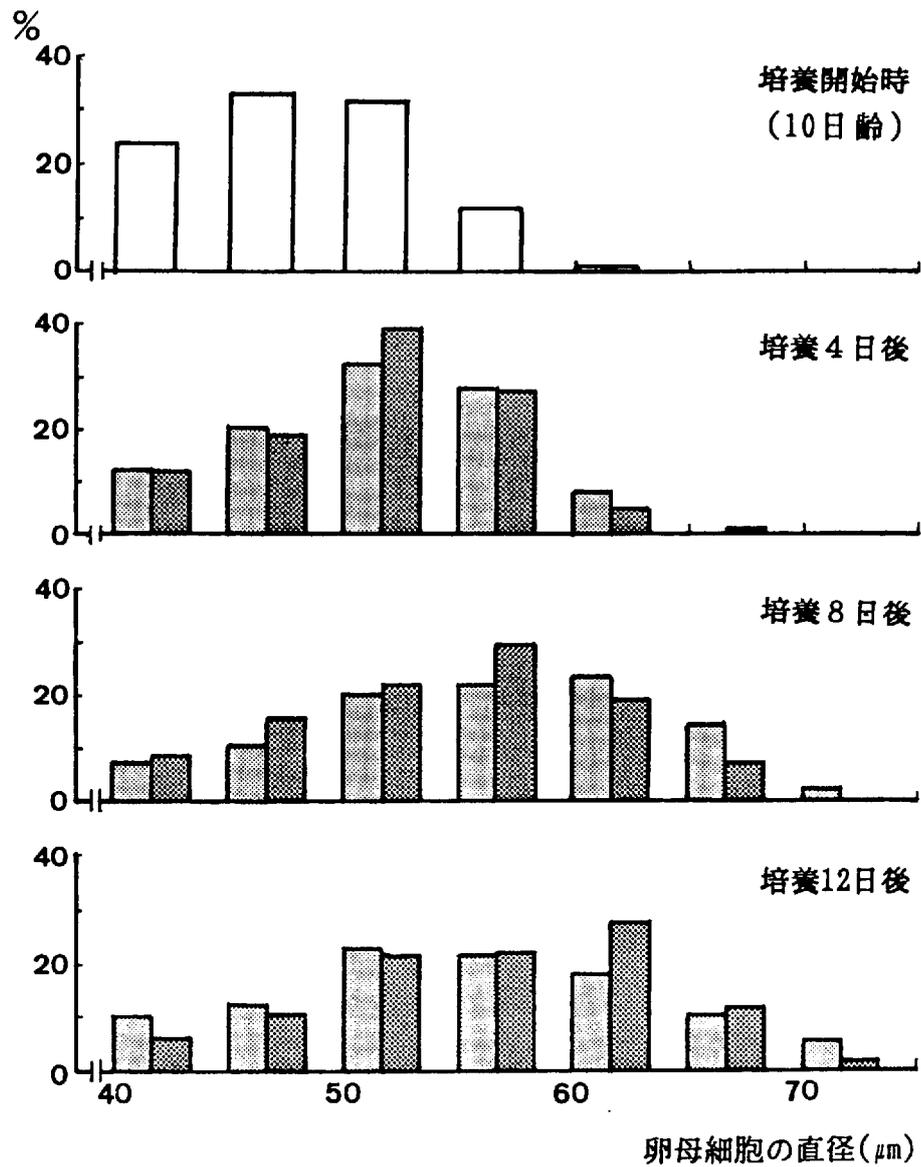


図19 無処理培養皿内で培養したマウス卵母細胞の直径分布
 (培養開始時の観察卵母細胞数, n=283)
 ■ 基礎培養液
 (培養4日後, n=400; 8日後, n=400; 12日後, n=266)
 ▨ ヒポキサンチン培養液中
 (培養4日後, n=400; 8日後, n=400; 12日後, n=383)

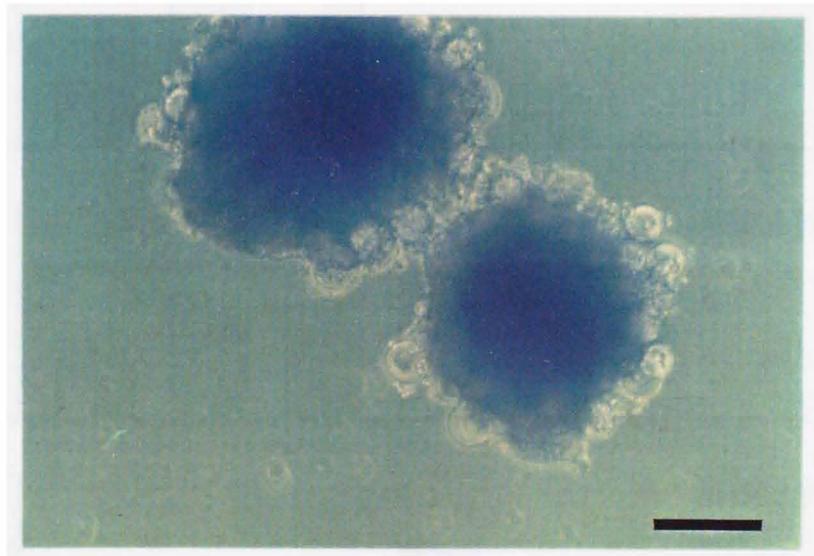


図20 寒天処理培養皿内で卵母細胞と顆粒膜細胞の複合体（OGC）が形成した凝集塊
バーは300 μ mを示す.

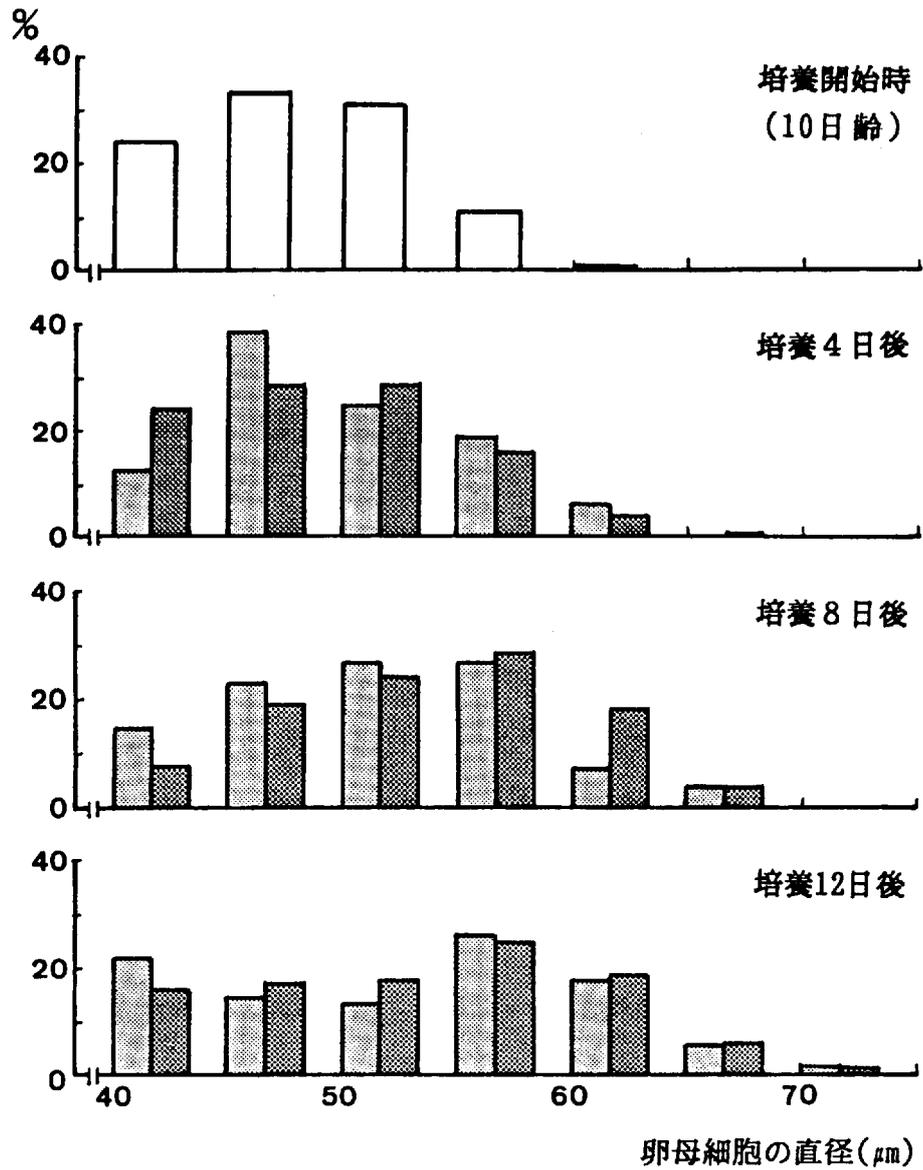


図21 寒天処理培養皿内で培養したマウス卵母細胞の直径分布
 (培養開始時の観察卵母細胞数, n=283)
 ■ 基礎培養液
 (培養4日後, n=81; 8日後, n=118; 12日後, n=219)
 ▨ ヒポキサンチン培養液
 (培養4日後, n=343; 8日後, n=351; 12日後, n=382)

割合は基礎培養液中で24% (53/219), ヒポキサンチン培養液中で25% (97/382) となり, いずれの培養液中においても一部の卵母細胞は直径70.0 μ m以上となった。また, 培養12日後の直径40.0~44.5 μ mの卵母細胞の割合は基礎培養液中で22% (48/219), ヒポキサンチン添加培養液中で16% (60/382)であり, それらは寒天処理していない培養皿内で培養した場合に比べて高かった。

考察

前章第3節の実験において10日齢のマウス卵巢をプロナーゼ処理した結果, 卵巢組織は個々の細胞にまで分散し, 卵母細胞は完全に裸化された。本節の実験では, 顆粒膜細胞に包まれた卵母細胞, すなわちOGCを用いるので, プロナーゼ処理は不適であり, 他の処理法を採用する必要があった。佐藤と宮本³⁹⁾は, 直径60 μ m以下のマウス卵母細胞を卵胞から分離するにはコラゲナーゼあるいはキモトリプシンによる処理が効果的であると報告している。また, Eppig²⁾も, 発達途上の卵胞を分離する際にはコラゲナーゼ処理が有効であるとしている。本節の実験に先立ち, コラゲナーゼ処理を試みた結果, 10日齢のマウス卵巢から多数の発達途上卵母細胞が顆粒膜細胞に包まれた状態で得られ, その効果が確認された。

Eppig²⁾は, 顆粒膜細胞と接触していない卵母細胞は体外発育しないと報告している。これは, 卵母細胞と顆粒膜細胞との間に存在するギャップ結合²⁹⁾を通して, 卵母細胞の発育に必要な物質が顆粒膜細胞から卵母細胞へ送り込まれており^{30, 31)}, この結合が解離すると卵母細胞は発育できなくなるためと考えられている。OGCを培養皿の底面に付着させた状態で体外培養すると, 卵母細胞が裸化すること²⁾, また多数のOGCを近接させて培養することにより卵母細胞の裸化が抑制されることも報告されている。本研究においても, 培養液の小滴中でOGCを個々に培養すると, 卵母細胞は裸化して退行した。しかし, 多数のOGCを無処理の培養皿内で培養すると, 12日後においても約40%の卵母細胞が顆粒膜細胞に包まれ, 一部は発育を完了したと考えられる直径

70.0 μm 以上に達していた。顆粒膜細胞は付着増殖性の細胞であり、適当な支持体の上で増殖する。付着増殖性の細胞は、confluentの状態、すなわち培養皿底面が細胞によって埋め尽くされた状態となるまで周囲に向って遊走する。小滴中で1個ずつ培養したOGCでは、底面に接着した顆粒膜細胞は外側に向って遊走し、卵母細胞から離脱する傾向を示した。一方、多数のOGCを培養した場合、局所的に細胞密度が高くなり、その結果顆粒膜細胞は接触抑制(contact inhibition)を受け、卵母細胞を包む状態が維持されたものと考えられる。OGCを寒天上で培養した場合は、卵母細胞の裸化率はさらに低下した。これは、顆粒膜細胞の培養皿底面への付着が寒天によって阻止されたため、顆粒膜細胞はOGCの凝集塊内で増殖し、卵母細胞を包みこむ状態が維持されたことによると思われる。

ヒポキサンチンは、発育培養中の卵母細胞の裸化を抑制すると報告されているが²⁶⁾、その作用機序は明らかではない。本実験において、顆粒膜細胞に包まれた状態で培養された卵母細胞は最終段階まで発育した。少なくともこのような培養条件下では、ヒポキサンチンの添加は必要でないと思われる。

培養皿の寒天処理の有無に関わりなく、培養後の卵母細胞の直径分布は類似していた。無処理培養皿においても、多くの卵母細胞が培養期間の後半まで顆粒膜細胞との結合を維持したため、卵母細胞がすでに発育を完了していたとも考えられる。しかし、寒天処理培養皿では培養期間中に裸化して退行した卵母細胞がほとんど認められなかったのに対し、無処理培養皿では認められた。また、寒天処理培養皿内で12日間培養した場合、直径40.0~44.5 μm の卵母細胞の割合が高かった。これは、培養開始時に1, 2層の顆粒膜細胞層に囲まれていた発育初期の卵母細胞が凝集塊を形成することによって裸化が阻止され、退行せず発育したものと思われる。

第4節 小括

本章では、まず、出生直後のマウス卵巢を器官培養し、体外における卵母細胞の初期発育を調べるとともに、発育に及ぼす性腺刺激ホルモンの影響を検討した。ついで、10日齢マウス卵巢から得た発育途上の卵母細胞を用い、卵母細胞を最終段階まで体外で発育させるための培養条件について検討した。

1) 出生直後のマウス卵巢を8日間器官培養したところ、一部の卵母細胞の直径は当初の約 $20\mu\text{m}$ から $40\mu\text{m}$ へと増大した。また、PMSG($10\sim 50\text{IU/ml}$)は卵母細胞の発育を促進した。透明帯の形成率はFCS添加区よりBSA添加区において低かったが、PMSG添加によって透明帯の形成は促進された。しかし、PMSG添加の有無に関わりなく、立方化した顆粒膜細胞を有する卵胞の割合は生体内に比べて低く、顆粒膜細胞層は単層のままであった。これらの結果から、器官培養卵巢内においても卵母細胞の初期発育および透明帯形成が起こること、PMSGは卵母細胞の発育を促進するが、顆粒膜細胞の増数には影響しないことが判明した。

2) 10日齢のマウス卵巢を酵素処理して発育途上の卵母細胞を含む卵母細胞と顆粒膜細胞の複合体(OGC)を得た。培養液の小滴中でOGCを個々に培養した結果、卵母細胞は裸化し、発育することなく退行した。多数のOGCを無処理の培養皿中で培養した場合、OGCは培養皿底面に付着して伸展したが、寒天処理した培養皿ではOGCは相互に付着して凝集塊を形成した。卵母細胞の裸化率は寒天処理した場合に低かったが、寒天処理の有無および培養液へのヒポキサンチン添加の有無に関わりなく、培養12日後には24~40%の卵母細胞は直径 $60.0\mu\text{m}$ 以上へと発育し、直径 $70.0\mu\text{m}$ 以上の卵母細胞も認められた。

第4章 体外発育マウス卵母細胞の体外成熟および体外受精

第1節 緒言

卵巣内で発育を完了した卵母細胞は、下垂体からのホルモンの刺激を受けて減数分裂を再開し、卵核胞崩壊したのち第1極体を放出し、第Ⅱ減数分裂中期で減数分裂を再び停止する^{1,9)}。この過程を卵母細胞の成熟と呼ぶ。発育を完了した卵母細胞を卵胞から培養液中に取り出した場合にも、卵母細胞は自発的に成熟することが知られている^{40, 41)}。SorensenとWassarman⁴²⁾は、幼若マウスの卵巣から卵母細胞を採取し、その成熟能力を調べた実験において、卵母細胞は発育完了前に減数分裂を再開する能力を獲得するが、第Ⅰ減数分裂を完了する能力はやや遅れた発育段階で獲得すると報告している。

第Ⅱ減数分裂中期で減数分裂を停止した卵母細胞は、精子侵入の刺激によって⁴³⁾、あるいは人為的な賦活化によって⁴⁴⁾減数分裂を再開し、第2極体を放出して減数分裂を完了する。マウスでは、発育を完了した卵母細胞を体外で成熟させ、受精させた卵子から産子が得られている⁴⁵⁾。体外発育卵母細胞であっても、体外で減数分裂を再開し、成熟すると報告されているが^{2, 26)}、その成熟能力や受精能力の詳細については未だ不明な点が多い。

前章の実験において、発育途上のマウス卵母細胞を、適切な培養条件下で体外培養すると、直径70 μm 以上へと発育することが明らかとなった。本章の実験は、体外で発育したマウス卵母細胞の成熟能力および受精能力を明らかにする目的で行われた。

第2節 体外発育卵母細胞の体外成熟

本節では、まず体内発育卵母細胞を用いて成熟培養を行い、卵核胞崩壊および第1極体の放出について経時的に観察した。ついで、体外発育卵母細胞で成熟培養を行い、体外発育卵母細胞が体内発育卵母細胞と同様に成熟するか否かを卵核胞の崩壊および第1極体の放出を指標として調べた。

材料および方法

1) 体内発育卵母細胞の採取および成熟培養

20日齢のマウスから採取した卵巣をMEMで1回洗浄したのち、4 mg/mlのBSA、50 μg/mlのピルビン酸ナトリウムおよび2 mMのヒポキサンチンを添加したMEM(ヒポキサンチン培養液)中に浸漬した。胞状卵胞を柄付き針で破碎し、卵丘細胞層に包まれた状態の卵母細胞を採取した。卵母細胞を裸化したのち、卵核胞期にある直径60.0 μm以上の卵母細胞を選び、4 mg/mlのBSAおよび50 μg/mlのピルビン酸ナトリウムを添加したMEM(基礎培養液)の100 μlの小滴中で3回洗浄した。ついで、基礎培養液の小滴中(10 μl)に卵母細胞を2, 3個ずつ移して24時間培養し、卵核胞崩壊および第1極体の放出について培養3時間後までは1時間間隔で、3時間以降は3時間間隔で倒立顕微鏡下(×200)に観察した。

2) 未発育卵母細胞の発育培養および成熟培養

10日齢マウスの6個の卵巣から前章第3節の方法でOGCを採取し、基礎培養液またはヒポキサンチン培養液を含む無処理の培養皿内で培養した。培養10日後に、直径60.0 μm以上に発育した卵母細胞を選び、顆粒膜細胞の付着した卵母細胞についてはピペッティングによって裸化したのち、また培養液中に浮遊する裸化卵母細胞についてはそのまま、上記2種類の培養液の小滴(100 μl)中に回収した。

基礎培養液中で発育した卵母細胞については、その全てを基礎培養液で洗浄したのち、同培養液の小滴(10 μ l)中に2, 3個ずつ移して24時間培養した。ヒポキサンチン培養液中で発育した卵母細胞については、半数をヒポキサンチン培養液で、残りを基礎培養液で3回洗浄し、それぞれの培養液の小滴(10 μ l)中に2, 3個ずつ移して24時間培養した。培養開始後、体内発育卵母細胞と同じ時間間隔で卵核胞の崩壊および第1極体の放出を観察した。

結果

20日齢のマウス卵巢から採取した裸化卵母細胞の7%(6/89)は、すでに減数分裂を再開していたため、それらは以降の観察から除外した。体内発育卵母細胞における成熟培養後の卵核胞崩壊率および第1極体放出率の変化を図22に示す。卵核胞崩壊率は培養2時間後まで急速に増加し、その後増加率は鈍化した。培養24時間後における卵核胞崩壊率は97%(35/36)であった。一方、第1極体の放出は、培養9時間後から認められ始めた。第1極体を放出した卵母細胞の割合は培養15時間後まで急速に増加したのち、培養24時間後に至るまで徐々に増加した。培養24時間後における第1極体の放出率は72%(26/36)であった。

10日齢のマウス卵巢から採取したOGCを10日間培養し、60.0 μ m以上へと発育した卵母細胞を観察した。その結果、基礎培養液中で発育した卵母細胞では18%(24/132)において卵核胞崩壊が認められた。一方、ヒポキサンチン培養液を用いた場合の卵核胞崩壊率は7%(25/351)であり、基礎培養液中における値よりも有意に低かった($P < 0.01$, χ^2 検定)。なお、卵核胞崩壊の認められた卵母細胞は、以下の成熟培養実験には用いなかった。

体外発育卵母細胞を用いて成熟培養を行った結果、一部の卵母細胞で卵核胞崩壊および第1極体の放出が観察された(図23)。成熟培養開始後の卵核胞崩壊率および第1極体放出率の変化は、図24に示す通りである。発育培養時および成熟培養時のヒポキサンチンの存否に関わりなく、卵核胞崩壊率は3時間後ま

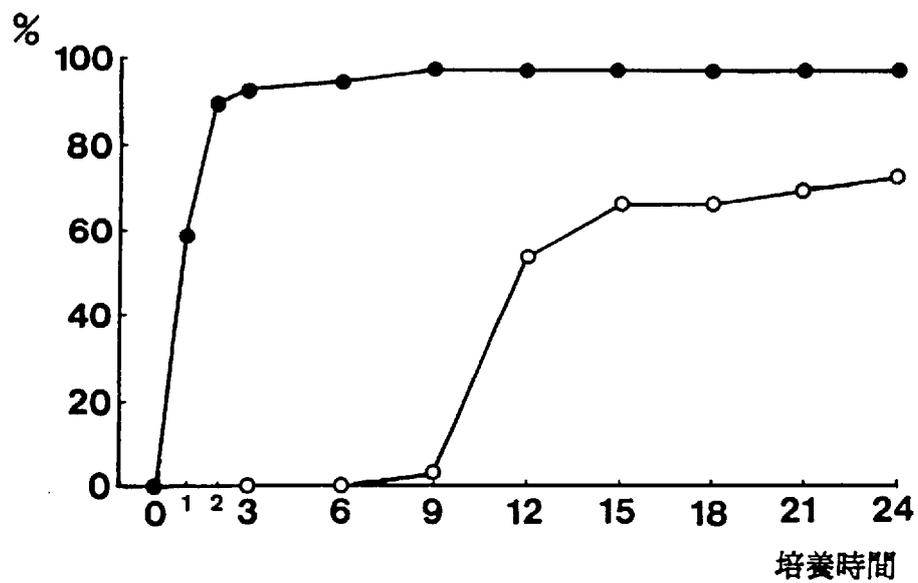


図 22 体内発育マウス卵母細胞の体外における経時的成熟変化 (n=36)

●—● 卵核崩壊
○—○ 第1極体放出

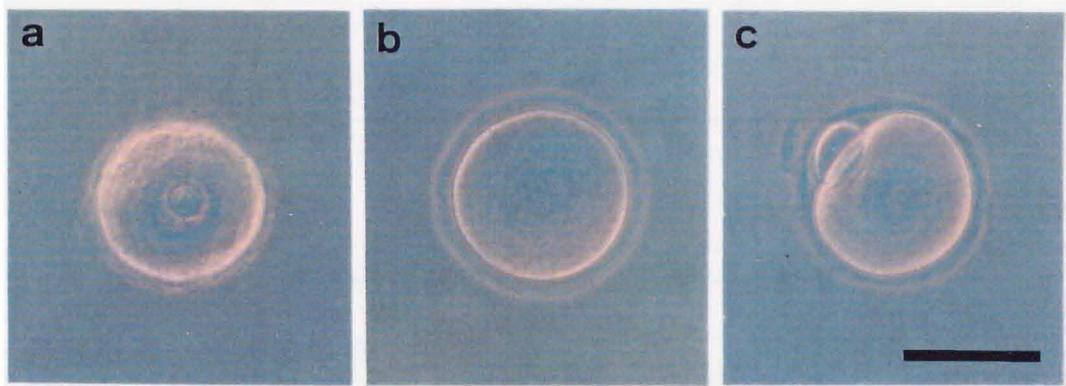


図23 体外発育マウス卵母細胞の体外における成熟変化
a 卵核胞期の卵母細胞。
b 卵核胞崩壊後の卵母細胞。
c 第1極体を放出した卵母細胞。
バーは50 μ mを示す。

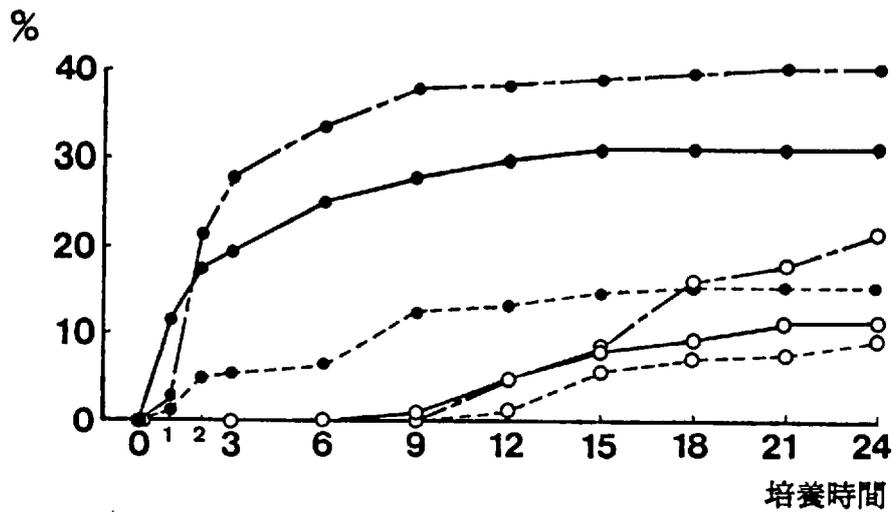


図24 体外発育マウス卵母細胞における経時的成熟変化

発育培養 → 成熟培養

HYP(-) → HYP(-), (n=108), ●—● 卵核胞崩壊, ○—○ 第1極体放出

HYP(+)-> HYP(-), (n=196), ●---● 卵核胞崩壊, ○---○ 第1極体放出

HYP(+)-> HYP(+), (n=130), ●----● 卵核胞崩壊, ○----○ 第1極体放出

HYP(-), 基礎培養液; HYP(+), 2mMヒポキサンチン培養液

で急速に増加し、それ以降の増加率は鈍化した。一方、第1極体の放出は、基礎培養液で発育培養し、成熟培養した場合には培養9時間後から、またヒポキサンチン培養液で発育培養し、基礎培養液またはヒポキサンチン培養液で成熟培養した場合は培養12時間後から認められ、いずれの場合も第1極体放出率は培養時間の経過とともに増加した。卵核胞崩壊および第1極体の放出が認められ始めた時期およびそれらの割合が増加した時期は、先述の体内発育卵母細胞で観察された時期とほぼ一致していた。しかし、卵核胞崩壊率および第1極体放出率は体内発育卵母細胞に比べて低かった。培養24時間後の卵核胞崩壊率は、発育培養時のヒポキサンチン培養液から成熟培養時に基礎培養液に移した場合に40% (78/196)と最も高く、基礎培養液から基礎培養液に移した群では31% (33/108)、ヒポキサンチン培養液からヒポキサンチン培養液へ移した群では15% (20/130)であった。また、第1極体の放出率は、それぞれ21% (42/196)、11% (12/108)および9% (12/130)であった。

考察

SorensenとWassarman⁴²⁾は、15日齢以前の幼若雌マウスの卵巣から採取した卵母細胞では成熟培養しても減数分裂は再開されないと報告している。本実験においては、10日齢のマウス卵巣から得たOGCを10日間培養し、発育した卵母細胞を用いて成熟誘起を試みた結果、31~40%の卵母細胞において卵核胞崩壊が認められた。このことは、卵母細胞が体外での発育中に減数分裂を再開する能力を獲得したことを示している。しかし、卵母細胞はその退行過程においても卵核胞を消失する⁴⁶⁾。そこで、卵核胞崩壊を経時的に観察し、体内発育卵母細胞のそれと比較するとともに、第1極体の放出を指標として、卵母細胞の第I減数分裂を完了する能力についても検討した。その結果から見ると、体外発育卵母細胞は体内発育卵母細胞とほぼ同じ時期に卵核胞を崩壊し、さらに第1極体を放出すると考えられる。

体外発育卵母細胞では卵核胞崩壊率、第1極体放出率ともに、体内発育卵母

細胞の値よりも低かった。卵巣内では卵母細胞は発育完了前に減数分裂を再開する能力を獲得し、それに遅れて第Ⅰ減数分裂を完了する能力を獲得すると考えられている⁴²⁾。体外発育卵母細胞のなかには直径の増大と成熟能力の獲得が一致しないものもあるのかも知れない。

卵核胞崩壊率および第1極体放出率は、ヒポキサンチン培養液中で卵母細胞を発育させた後、基礎培養液中で成熟させた場合に最も高く、発育培養および成熟培養ともにヒポキサンチン培養液を用いた場合に最も低い値を示した。体外で発育した卵母細胞においては、減数分裂の再開がヒポキサンチンによって抑制されたと考えられる。一方、基礎培養液中で発育した卵母細胞の18%は発育培養中に減数分裂を再開したが、31%は成熟培養中に減数分裂を再開した。この結果は、卵母細胞の減数分裂の再開が培養液中に添加したヒポキサンチン以外の因子によっても抑制されることを示唆している。生体内では卵丘細胞からギャップ結合を介して卵母細胞の減数分裂再開を抑制する因子が卵母細胞に送り込まれており、両者の結合が絶たれることによって減数分裂が再開するとの考えもある⁴⁷⁾。本実験では、成熟培養開始前に卵母細胞を裸化したことから、これが減数分裂再開の引き金となったと考えられる。

第3節 体外発育卵母細胞の成熟能力

前節の結果から、体外発育卵母細胞は体内で発育した卵母細胞と同様な時間経過で減数分裂を再開し、第1極体を放出することが明らかとなった。本節では、体外発育させた卵母細胞の発育段階と成熟能力との関係を明らかにすることを目的とし、卵母細胞の直径を測定したのち成熟を誘起し、各卵母細胞の成熟率を調べ、体内発育卵母細胞のそれと比較した。

材料および方法

1) 体内発育卵母細胞の成熟培養

20日齢のマウスから採取した卵巣をMEMで1回洗浄したのち、ヒポキサンチン培養液中に浸漬した。胞状卵胞を柄付き針で破碎することによって直径65 μm 以上の卵母細胞を得た。また、卵胞腔形成前の卵胞を0.4%のコラゲナーゼで処理したのち、ピペティングにより直径55~65 μm の卵母細胞を得た。ついで、ピペティングによって裸化し、卵核胞が認められる卵母細胞のみを選別して成熟培養に用いた。卵母細胞を任意に2区に分け、基礎培養液あるいはヒポキサンチン培養液の小滴(100 μl)中で3回洗浄し、それぞれの培養液の小滴(10 μl)中に卵母細胞を2, 3個ずつ移して24時間培養した。培養開始直後に卵母細胞の直径を測定し、培養終了後に卵核胞崩壊および第1極体の放出を倒立顕微鏡下($\times 200$)に調べた。

2) 未発育卵母細胞の発育培養および成熟培養

10日齢のマウス卵巣から酵素処理によって得たOGCを寒天処理培養皿内においてヒポキサンチン培養液中で培養した。培養10日後にピペティングによりOGCの凝集塊を分散させ、卵母細胞を裸化した。直径55 μm 以上の卵母細胞を、前項1)と同様に2区に分けて洗浄したのち、基礎培養液あるいはヒポキサンチン添加培養液中で24時間培養し、同様の観察を行った。

3) 卵母細胞の固定および観察

成熟培養後に卵母細胞を回収し、2.5%グルタルアルデヒドを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)で固定したのち、10%の中性ホルマリンで一晩固定した。0.25%の酢酸ラクモイドで卵母細胞を染色し、微分干渉顕微鏡下(×400)に卵母細胞の核の成熟段階を調べるとともに、染色体の状態を観察した。染色体の分散や前核の形成などの異状が認められたものを退行卵母細胞と判定した。データの統計的有意性は、 χ^2 検定により判定した。

結果

合計735個の体内発育卵母細胞および1240個の体外発育卵母細胞を成熟培養に供した。それらの培養開始時の直径、減数分裂再開率および第Ⅱ減数分裂中期への成熟率は表6に示す通りである。

体内発育卵母細胞を成熟培養した結果、59.5 μm 以下の卵母細胞では卵核胞崩壊はほとんど認められなかった。60.0 μm 以上の卵母細胞では卵核胞崩壊が認められ、基礎培養液中における卵核胞崩壊率は直径60.0~64.5 μm の卵母細胞で13%、65.0~69.5 μm で90%および70.0 μm 以上で95%と、直径の増大とともに増加した。また、卵核胞崩壊が認められた卵母細胞のうち第Ⅱ減数分裂中期まで成熟した卵母細胞の割合は直径60.0~64.5 μm の卵母細胞で17%、65.0~69.5 μm で52%および70.0 μm 以上で72%であり、直径の増大とともに成熟率も増加した。一方、ヒポキサンチン添加培養液中で培養した卵母細胞においても同様の傾向が認められた。すなわち、卵核胞崩壊率は直径65.0~69.5 μm の卵母細胞で64%と基礎培養液中に比べて低かったが、60.0~64.5 μm では9%、70.0 μm 以上では90%であり、ヒポキサンチンによる明確な抑制作用は認められなかった。卵核胞が崩壊した卵母細胞のうち第Ⅱ減数分裂中期へと成熟した卵母細胞の割合は、直径60.0~64.5 μm の卵母細胞で22%、65.0~69.5 μm で60%および70.0 μm 以上で79%であった。

体外発育卵母細胞では、合計106個で卵核胞崩壊が認められ、そのうち41個(39%)は第Ⅱ減数分裂中期に達していた(図25, a)。基礎培養液およびヒポ

表6 体内および体外で发育したマウス卵母細胞の直径と成熟率との関係

卵母細胞の发育	ヒポキサン添加 (2 mM)	卵母細胞の直径 (μm)	供試卵母細胞数	計 (%)	各成熟段階にある卵母細胞数 (%) ^a			
					第 I 減数分裂中期	第 I 減数分裂後期・終期	第 II 減数分裂中期	退行 ^b
体内	無	55.0—59.5	97	1 (1) ^o	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		60.0—64.5	96	12 (13) ^o	0 (0)	2 (17) ^{od}	1 (8) ^{ode}	
		65.0—69.5	71	64 (90) ^h	0 (0)	33 (52) ^{of}	2 (3) ^{od}	
		70.0—75.0	76	72 (95) ^h	0 (0)	52 (72) ^{hij}	0 (0)	
体外	有	55.0—59.5	111	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
		60.0—64.5	101	9 (9) ^{de}	0 (0)	2 (22) ^{oef}	1 (11) ^{ode}	
		65.0—69.5	89	57 (64) ^s	0 (0)	34 (60) ^{ofh}	1 (2) ^{od}	
		70.0—75.0	94	85 (90) ^h	1 (1)	67 (79) ^{ij}	1 (1) ^o	
体外	無	55.0—59.5	197	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
		60.0—64.5	297	27 (9) ^{de}	1 (4)	5 (19) ^o	3 (11) ^{ode}	
		65.0—69.5	94	35 (37) ^f	0 (0)	13 (37) ^{ods}	10 (29) ^o	
		70.0—75.0	19	19 (100)	0 (0)	13 (68) ^{ofj}	3 (16) ^{de}	
体内	有	55.0—59.5	64	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
		60.0—64.5	300	9 (3) ^o	0 (0)	2 (22) ^{oef}	2 (22) ^{de}	
		65.0—69.5	251	12 (5) ^{od}	0 (0)	7 (58) ^{dfi}	2 (17) ^{de}	
		70.0—75.0	18	4 (22) ^{ef}	0 (0)	1 (25) ^{ofsh}	0 (0)	

^a 卵核細胞の崩壊が認められた卵母細胞に対する割合。

^b 細胞質の萎縮、染色体の分散および前核の形成などが認められた卵母細胞。

^{o-fj} 同じ列内の異なる肩文字を持つ数値間の差は有意。P < 0.05, χ^2 検定。

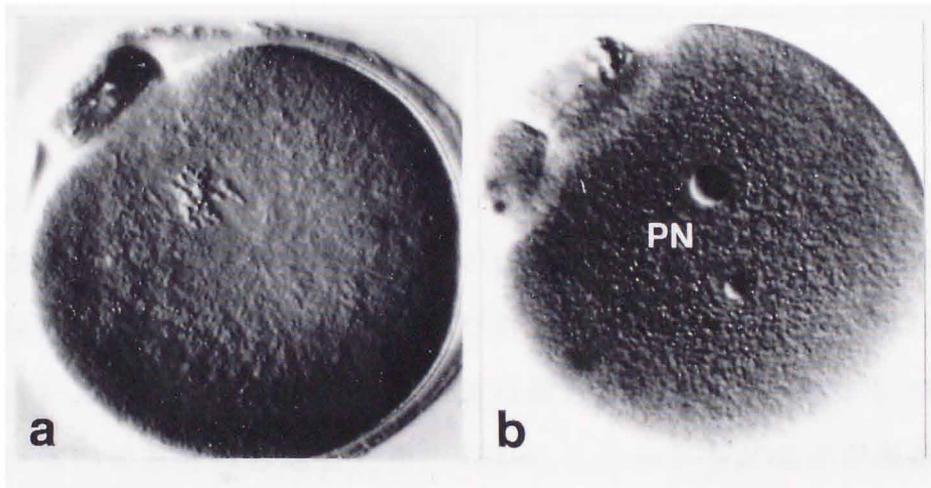


図25 成熟培養24時間後における体外発育マウス卵母細胞の核相
a 1個の極体とともに第Ⅱ減数分裂中期の染色体が認められる。
b 2個の極体とともに前核(PN)が認められる。

キサンチン培養液のいずれにおいても直径 $59.5\mu\text{m}$ 以下の卵母細胞では卵核胞崩壊は認められなかった(0/261)。基礎培養液中における卵核胞崩壊率は直径 $60.0\sim 64.5\mu\text{m}$ の卵母細胞で9%， $65.0\sim 69.5\mu\text{m}$ で37%および $70.0\mu\text{m}$ 以上で100%と、直径の増大とともに増加した。また、卵核胞が崩壊した卵母細胞のうち第Ⅱ減数分裂中期まで成熟していた卵母細胞の割合も、直径 $60.0\sim 64.5\mu\text{m}$ で19%， $65.0\sim 69.5\mu\text{m}$ で37%および $70.0\mu\text{m}$ 以上で68%と、直径の増大とともに増加した。一方、ヒポキサンチン培養液中における卵核胞崩壊率は基礎培養液中に比べて有意に低く、直径 $60.0\sim 64.5\mu\text{m}$ の卵母細胞で3%， $65.0\sim 69.5\mu\text{m}$ で5%および $70.0\mu\text{m}$ 以上で22%であった。なお、卵核胞崩壊が認められた体外発育卵母細胞のうち19%は、前核形成あるいは染色体の分散などの退行像を示した(図25, b)。

考察

前節の実験では、体外発育卵母細胞が減数分裂を再開し、第1極体を放出することを認めたが、卵核胞崩壊率および第1極体放出率は体内発育卵母細胞よりも低かった。本節の実験において、体外発育卵母細胞の直径別に成熟率を調べた結果、体内発育卵母細胞と同様、 $70\mu\text{m}$ 以上のほとんど全てが減数分裂を再開した。このことから、体外発育卵母細胞においても直径の増大と成熟能力の獲得は一致して起こると考えられる。

近年、卵母細胞の減数分裂の再開機序が分子レベルで解明されつつある^{48, 49)}。マウス卵母細胞の減数分裂の再開には、MPF (maturation promoting factor) と呼ばれる蛋白質の関与することが示唆されている^{50, 51)}。MPFの作用機序は未だ明らかではないが、減数分裂の再開に先立って細胞中にpre-MPFとして貯えられており、その活性化は酵母の細胞周期に関与するcdc2キナーゼと相同な蛋白質のチロシン残基の脱リン酸化によると考えられている⁵²⁾。また、減数分裂の再開に関与するとされている他の蛋白質、例えばサイクリンなども卵母細胞の発育途上で合成されると見られている⁵³⁾。し

かし、哺乳類の卵母細胞では、どの発育段階においてそれらの蛋白質が合成されるのかは明らかではない。SorensenとWassarman⁴²⁾は、減数分裂を再開する卵母細胞の平均直径が再開しないものよりも大きいことを認め、卵母細胞は特定の発育段階に達すると減数分裂を再開する能力を獲得すると推測している。本実験においても、体内発育、体外発育を問わず、直径60 μ m以上へと発育した卵母細胞においてのみ減数分裂の再開が認められ、その直径は体内発育卵母細胞で報告されている値、60 μ m⁴²⁾ないし65 μ m³⁹⁾とほぼ同じであった。MPFとの関連は明らかではないが、卵母細胞中の蛋白質のリン酸化が減数分裂の再開に関与することも示唆されている^{54, 55)}。Bornslaegerら⁵⁶⁾は、直径約60 μ mのマウス卵母細胞における減数分裂の再開と蛋白質のリン酸化との関係について調べ、減数分裂を再開した卵母細胞では発育を完了した卵母細胞内で起こると同様の蛋白質のリン酸化が起こるのに対し、再開しなかった卵母細胞においてはそのようなリン酸化は認められなかったとしている。これらのことを考え合わせると、本実験の体外培養条件下で発育した卵母細胞においても、体内発育卵母細胞と同じ発育段階で、MPFなどの卵母細胞の成熟に関与する蛋白質の合成やリン酸化が起こったと考えられる。

減数分裂を再開した体外発育卵母細胞のうち、第II減数分裂中期へと成熟した卵母細胞の割合は、体内発育卵母細胞と同様に、直径の大きな卵母細胞ほど高かった。減数分裂の再開後、第II減数分裂中期に成熟するためには新たな蛋白質の合成が必要とされている⁵⁷⁾。本実験の培養条件下で発育した卵母細胞は、体内発育卵母細胞と同様の発育段階において成熟に必要な蛋白質を合成する能力をも獲得したものと推定される。

Canipariら⁵⁸⁾は、線維芽細胞の単層上で体外培養した卵母細胞は直径の増大がなくても減数分裂を再開すると報告している。しかし、本実験では卵母細胞は直径60 μ m以上へと発育しないかぎり、減数分裂を再開しなかった。また、彼らの研究では、直径の増大がないまま減数分裂を再開した卵母細胞は、第I減数分裂中期で成熟を停止した。本実験結果は、卵母細胞の発育段階と第II減数分裂中期まで成熟する能力を獲得する時期とが密接に関係していること

を示唆している。

ヒポキサンチンによる成熟抑制は体外発育卵母細胞において顕著であった。卵母細胞の減数分裂再開を制御する物質としてcAMPが知られている⁵⁹⁾。マウスの卵母細胞では、卵核胞崩壊に先立ってcAMP濃度が急激に低下するとの報告があり⁶⁰⁾、また発育を完了した卵母細胞であっても、体外に取り出してcAMPレベルを人為的に上昇させると、減数分裂を再開しないことも知られている⁶¹⁻⁶⁵⁾。ヒポキサンチンはcAMPの分解酵素であるフォスフォジエステラーゼを阻害してcAMPレベルを上昇させ、卵母細胞の成熟を抑制するとの考えがある⁶⁶⁾。Downsら⁶⁷⁾は、裸化卵母細胞に対するヒポキサンチンの成熟抑制作用は卵丘細胞が付着している卵母細胞に比べて弱いことを認め、ヒポキサンチンの作用は主に卵丘細胞を介して作用すると考察している。本実験において、体内発育卵母細胞ではヒポキサンチンによる成熟抑制作用は認められなかったが、体外発育卵母細胞においては強い成熟抑制が認められた。この理由としては、長期間にわたる培養中に卵母細胞の膜になんらかの異常が生じ、ヒポキサンチンが過剰に取り込まれたことや、フォスフォジエステラーゼ活性の低下によって卵母細胞内のcAMPレベルの低下したことが推測される。

一方、卵核胞崩壊が認められた卵母細胞の一部は、極体を放出して雌性前核を形成した。このような卵母細胞は成熟培養中に第Ⅱ減数分裂中期を経たと考えられる。ほとんど全ての脊椎動物では、第Ⅱ減数分裂中期にある卵母細胞は精子侵入の刺激を受けて初めて活性化する。MasuiとMarkert⁶⁸⁾は、ヒヨウガエルの未受精卵の細胞質中に核を第Ⅱ減数分裂中期で停止させる作用を持つ因子(cytostatic factor, CSF)を見出した。最近、ガン原遺伝子c-mosの産物がCSFと相同な物質であることがアフリカツメガエルで明らかにされ⁶⁹⁾、マウスの卵母細胞でもc-mos蛋白質が検出されている⁷⁰⁾。これらのことから見ると、体外発育卵母細胞ではCSFの合成が不十分であったか、CSFの活性化が正常に起こらず、第Ⅱ減数分裂中期で停止することなく前核が形成されたのかもしれない。

第4節 体外発育・成熟卵母細胞の体外受精

前節までの実験結果から、体外発育マウス卵母細胞はその発育に伴って減数分裂を再開する能力および第Ⅱ減数分裂中期へと成熟する能力を獲得することが明らかとなった。本節の実験は、体外で発育および成熟させた卵母細胞が正常に受精するか否かを明らかにする目的で行われた。

材料および方法

1) 卵母細胞の発育培養

10日齢のマウスから前章第3節と同様の方法でOGCを採取し、寒天処理した培養皿に移して10日間培養した。培養液には10%のFCS、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のピルビン酸ナトリウムおよび2 mMのヒポキサンチンを含むMEMを用い、培養液の半量を4日毎に交換した。

2) 卵母細胞の成熟培養および体外受精

発育培養後、直径50 μm 以上へと発育した卵母細胞を10% FCSおよび50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のピルビン酸ナトリウムを含むMEM中に回収し、裸化したのち3回洗浄し、同培養液の小滴(10 μl)中で成熟培養した。培養20時間後、倒立顕微鏡下($\times 200$)に卵母細胞を観察し、卵核胞崩壊が認められた卵母細胞をTYH液⁷¹⁾中で3回洗浄し、同培養液の小滴(400 μl)中に20~30個ずつ移し、豊田ら⁷¹⁾の方法に準じて体外受精した。すなわちddY系成熟雄マウスより精巣上体尾部を採取してパラフィンオイル内に移し、精巣上体管の一部を柄付き針で破碎して噴出してきた精子塊をTYH液の小滴(400 μl)中に導入した。精子を1.5時間前培養したのち、卵母細胞を含む小滴中へ最終精子濃度が150 cells/mlとなるように媒精した。

対照としては、18日齢のマウスに3 IUのPMSGを、さらにその48時間後に3 IUのヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG, プベローゲン, 三共ゾーキ)を腹腔内投与して過排卵を誘起し、hCG投与の15~16

時間後に卵管膨大部より採取した卵子を用いた。卵丘細胞に覆われた状態の卵母細胞をTYH液の小滴(400 μ l)中に導入し、上述の方法で媒精した。

3) 受精の判定

媒精の6~7時間後に、本章第3節と同様の方法で卵子を固定、染色し、受精の有無および卵子の核の状態を微分干渉顕微鏡下に観察した。精子の尾部をともなった膨化精子頭部あるいは雄性前核が認められた卵子を受精卵と判定した。データの統計的有意性は、 χ^2 検定によって判定した。

結果

10日齢のマウス卵巢から得たOGCは、発育培養中に集合して凝集塊を形成した。培養10日後、卵母細胞をヒポキサンチンを含まない培養液に移して成熟を誘起した結果、直径60.0 μ m以上の卵母細胞の一部において1時間後から卵核胞崩壊が認められた。卵核胞崩壊率は、直径60.0~64.5 μ m, 65.0~69.5 μ mおよび70.0 μ m以上の卵母細胞でそれぞれ10%(28/267), 53%(112/212)および86%(115/133)であった。

媒精6時間後における第II減数分裂中期への成熟率および受精率を表7に示す。卵核胞崩壊が認められた体外発育卵母細胞のうち74%は第II減数分裂中期以降へと成熟しており、その72%は受精していた(図26, a)。受精卵のうち、膨化精子頭部を有する卵子は13%であり、雄性前核を形成した卵子は87%であった。一方、対照の排卵卵子では、受精率および雄性前核形成率はそれぞれ91%および99%と高い値を示した。単精子受精率は体外発育・成熟卵母細胞および排卵卵子でそれぞれ87%および80%であり、いずれも高い値を示した。

受精卵の核の状態の詳細を表8に示す。対照の排卵卵子では、99%

表7 体外発育・成熟卵母細胞および排卵卵子の体外受精

卵母細胞の 発育・成熟	媒精した 卵母細胞数	第Ⅱ減数分裂 中期以降の 卵子数(%)	受精卵子数			
			計(%) ^a	膨化精子 頭部を有する 卵子数(%) ^b	雄性前核を 有する 卵子数(%) ^b	単精子受精 卵子数(%) ^b
体外	255	189 (74)	136 (72) ^a	17 (13) ^a	119 (87) ^a	118 (87)
体内	113	112 (99)	102 (91) ^d	1 (1) ^d	101 (99) ^d	82 (80)

^a第Ⅱ減数分裂中期へと成熟した卵母細胞に対する割合。

^b受精卵子に対する割合。

^{c, d}同じ列内の異なる肩文字を持つ数値間の差は有意。P<0.01, χ^2 検定。

表8 体外発育・成熟卵母細胞および排卵卵子における受精後の核の状態

卵母細胞の 発育・成熟	検査 卵子数	第Ⅱ減数分裂 中期の 卵子数(%)	1個の雌性 前核を有する 卵子数(%)	2個の雌性 前核を有する 卵子数(%)	雌性前核を 有さない 卵子数 ^a (%)
体外	136	2 (1)	101 (74) ^b	28 (21) ^b	5 (4)
体内	102	0 (0)	101 (99) ^c	1 (1) ^c	0 (0)

^a凝縮した染色体または分散した核を有する卵子。

^{b, c}同じ列内の異なる肩文字を持つ数値間の差は有意。P<0.01, χ^2 検定。

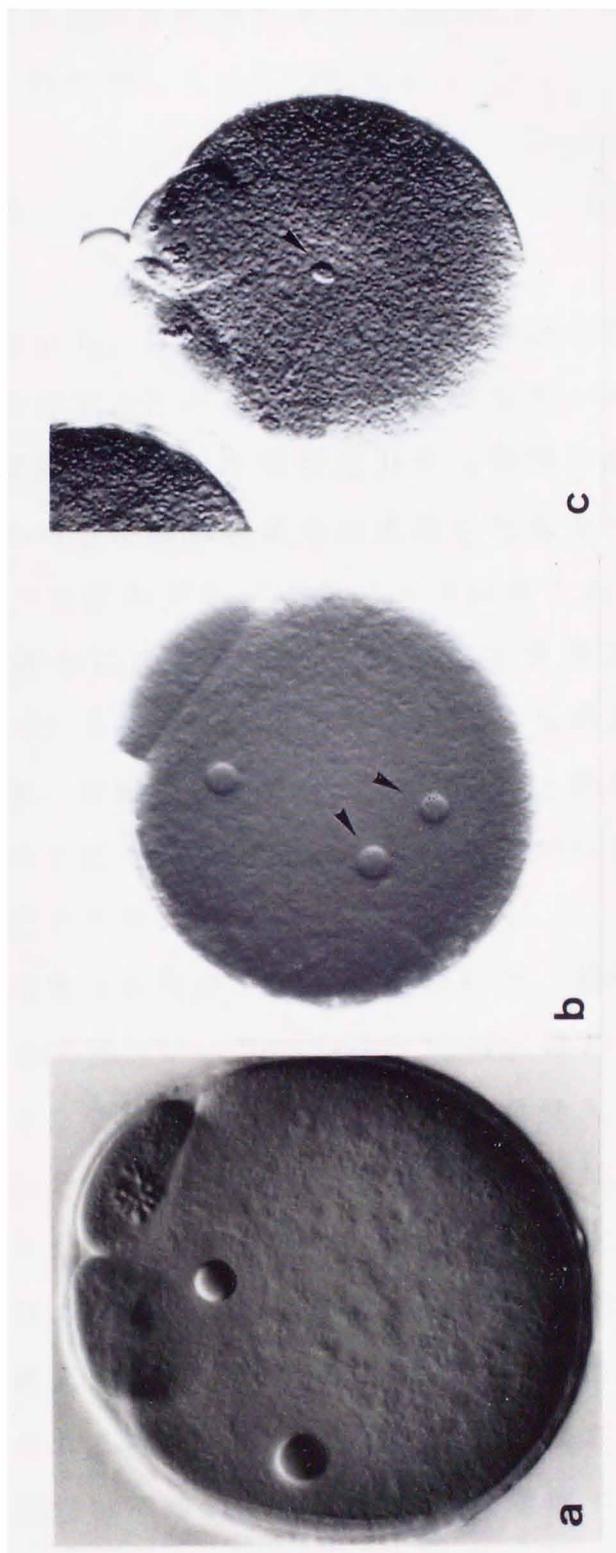


図26 マウス卵母細胞の受精像
 a 正常受精卵，雌雄両性前核と核(▶)を有する。
 b 異常受精卵，2個の雌性前核が形成されず，凝縮した染色体(▶)が観察される。
 c 体外発育・成熟マウス卵母細胞の受精像が観察される。

の卵母細胞で1個の正常な雌性前核が形成されたが、体外発育・成熟卵母細胞では雌性前核の異常が認められた。受精した体外発育・成熟卵母細胞のうち21%は2個の雌性前核を有し(図26, b), また4%は凝縮した染色体や分散した核を有していた(図26, c)。

考察

前節の実験において、体外発育マウス卵母細胞は第Ⅱ減数分裂中期へと成熟する能力を有することが明らかとなったが、本節の結果から、体外での発育および成熟の過程で受精能力をも獲得することが知られる。

化学的に組成の明らかな培養液中で成熟させたマウス卵母細胞では、透明帯が硬化し、受精率が低下することが報告されている^{72, 73)}。FCSを成熟培養液中に添加することによって受精率は向上するとの報告^{74, 75)}もある。本実験では卵母細胞をFCSを添加した培養液中で発育、成熟させ、体外受精に供したが、体外発育・成熟卵母細胞の受精率は排卵卵子に比べて低く、長期間にわたる培養中に透明帯の硬化が起こった可能性は否定できない。

卵母細胞の細胞質の成熟が不完全な場合には、雄性前核の形成不全などの異常受精が生じる⁷⁶⁾。Danielら⁴⁾は、体外発育・成熟ラット卵母細胞を用いて体外受精を行った結果、精子が侵入した卵子のうち正常受精卵子の割合は2回の実験でそれぞれ34.6%と47.1%であり、その他は多精子受精卵子や1個ないし3個の前核を有する卵子であったと報告している。受精時の卵子では透明帯反応と卵黄遮断の二つの機構によって多精子による侵入が拒絶されるが、いずれの反応も卵母細胞表面の表層顆粒から放出される内容物の作用によって誘起されると考えられている^{77, 78)}。表層顆粒は卵母細胞の発育途上に増数することが知られている⁷⁹⁾。本実験の体外発育・成熟マウス卵母細胞では単精子受精率は排卵卵子と同様に高かったが、このことから発育培養中に十分な数の表

層顆粒が形成され、多精拒否機構は完成していたと考えられる。

一方、体外発育・成熟卵母細胞では、雄性前核および雌性前核の形成率は排卵卵子よりも低かった。Thibault⁷⁶⁾は、ウサギの体外成熟卵母細胞を用いて体外受精した結果、侵入精子の頭部の膨化が遅延するだけでなく、培養を継続しても雄性前核の形成率が低かったと報告している。同様の雄性前核の形成不全はブタの体外成熟卵母細胞においても報告されている^{80, 81)}。その原因については、体内成熟卵子の細胞質内には雄性前核の形成を促進する因子 (male pronucleus growth factor, MPGF) が存在するが、体外成熟卵母細胞ではMPGFが不足し、雄性前核形成率が低下すると推測されている⁷⁶⁾。MPGFの本体およびその作用機序は未だ不明であるが、本実験の体外発育・成熟卵母細胞でも、MPGFの合成不足が原因で、雄性前核形成率が低下したと考えられる。

雌性前核の異常としては、第2極体放出の失敗に起因すると思われる2個の雌性前核や、染色体の凝縮などが認められた。O'NeillとKaufman⁸²⁾は、hCG投与後18~26時間で回収したマウス排卵卵子に活性化処理を施したところ、hCG投与からの時間が長くなるほど活性化卵子の第2極体放出率が低下したと報告している。老化(aging)した卵子では第II減数分裂中期における紡錘体や細胞骨格などの退行的変化が観察されており、これが第2極体放出率低下の原因の一つと考えられている⁸³⁾。本実験で認められた体外発育・成熟卵母細胞における雌性前核の異常の一因も、長期培養の結果生じた退行的変化にあると考えられる。

最近、EppigとSchroeder³⁾によって体外発育マウス卵母細胞由来の産子の誕生が報告された。しかし、移植された137個の2~4細胞期胚から得られた産子は7頭で、その発生率は極めて低い。本実験の体外発育・成熟卵母細胞で認められた異常受精が体外発育卵母細胞の発生能力の低さの一因となっているものと考えられる。

第5節 小括

本章では、まず、10日齢のマウス卵巣から得た卵母細胞と顆粒膜細胞の複合体(OGC)をヒポキサンチン培養液中で12日間培養し、発育した卵母細胞について成熟培養を行い、体外発育卵母細胞が体内発育卵母細胞と同様に成熟するか否かを卵核胞の崩壊および第1極体の放出を指標として調べた。ついで、体外発育卵母細胞の発育段階と成熟能力との関係を調べ、体内発育卵母細胞と比較した。さらに、体外発育・成熟卵母細胞の受精能力について体外受精の手法を用いて検討した。

1) 20日齢のマウス卵巣から得た卵母細胞を培養液の小滴中で成熟培養した結果、卵核胞崩壊および第1極体の放出がそれぞれ培養1時間後および9時間後から認められた。また、体外発育卵母細胞においても体内発育卵母細胞と同様の時間経過で卵核胞崩壊および第1極体の放出が認められた。

2) 体外発育卵母細胞を成熟培養した結果、直径60 μ m以上の卵母細胞において卵核胞崩壊が認められた。卵核胞崩壊率および第II減数分裂中期への成熟率は卵母細胞の直径の増大とともに増加した。これらのことは、体内発育卵母細胞においても認められ、卵母細胞は体外においても体内とほぼ同じ発育段階で成熟能力を獲得することが確認された。しかし、体外発育卵母細胞では、ヒポキサンチンにより減数分裂の再開が著しく抑制され、核の異常も体内卵母細胞に比べて高率に認められた。

3) 体外発育卵母細胞を成熟させ、体外受精した結果、第II減数分裂中期へと成熟していた卵母細胞の72%が受精し、そのうち87%で雄性前核が認められた。単精子受精率は87%で、対照の排卵卵子のそれと同等であった。しかし、排卵卵子に比べて2個の雌性前核を有する卵子などの雌性前核の異常が高率に認められた。

第5章 ブタ卵母細胞の体外発育

第1節 緒言

ブタ卵母細胞を体外培養し、その成熟能力や減数分裂の再開に関与する因子について調べた報告はすでにかかなりの数に昇る⁸⁴⁾。しかし、それらのほとんどは卵巣内で発育を完了した直径約120 μ mの卵母細胞を研究対象として取り上げたものであり、発育途上卵母細胞に関する研究は極めて少ない。

発育途上のブタ卵母細胞を用いた報告としては、Motlikら⁸⁵⁾の先駆的な研究がある。彼らは、初期の胞状卵胞内の直径約100 μ mの卵母細胞を体外で48時間培養すると、41%の卵母細胞は減数分裂を再開するが、第I減数分裂中期に達するまでにその成熟を停止すると報告した。また、原始卵胞内のブタ卵母細胞や発育途上卵母細胞を体外で数時間培養し、アミノ酸や核酸前駆物質の取込、タンパク合成などを調べた報告も散見される^{86, 87)}。しかし、発育途上ブタ卵母細胞を体外で発育させたという報告はない。

第3章第3節の実験において、マウスの発育途上卵母細胞と顆粒膜細胞の複合体(OGC)を寒天処理した培養皿内で培養すると、卵母細胞は最終段階まで発育することが明らかとなった。最近、発育途上マウス卵母細胞を体外で長期間培養する方法としてOGCをコラーゲン膜上で培養する方法³⁾や、コラーゲンゲルに包埋して培養する方法⁸⁸⁾が考案されている。いずれの方法においても発育途上マウス卵母細胞は最終段階まで発育するが、卵母細胞と顆粒膜細胞との間でギャップ結合が必須の前提条件とされている。発育途上ブタ卵母細胞においても、培養期間を通じて顆粒膜細胞との結合を維持しうる条件が与えられたならば、体外での発育も可能となるかも知れない。しかし、ブタ卵母細胞は、マウス卵母細胞の3.5~4倍の体積にまで発育し、また卵胞腔形成後も発育しつづける点でマウス卵母細胞とは異なっており、別の条件が要求されることも考えられる。

本章の実験は、ブタ卵母細胞が体外において最終段階まで発育するか否かを確かにする目的で行われた。

第2節 卵胞の採取方法および培養方法

本節では、酵素処理法を用いて発育途上ブタ卵母細胞を含む卵胞腔形成前の卵胞の分離を試みた。得られた卵胞をOGC(第3章第3節)として、あるいはコラーゲンゲルに包埋して培養し、卵母細胞が体外で発育するか否かを調べた。また、培養液中へのFSH添加の影響についても検討した。

材料および方法

1) 卵巣組織染色標本の作製

屠畜場で得た6~7ヵ月齢の交雑種未経産ブタの卵巣を材料として用いた。PBSで洗浄したのち、1/4に切断して3%のパラホルムアルデヒド液中で2日間固定した。ついで、50%、75%、90%および100%のエタノール上昇系列にそれぞれ24時間浸漬して完全に脱水したのち、JB-4に包埋して3 μ mの連続組織切片を作製し、第2章第2節と同様の方法で染色した。

2) 卵胞の採取

神戸大学附属農場で育成した65~89日齢の一代雑種(F₁)雌ブタ(梅山豚×金華豚)から、放血屠殺後に採取した卵巣を材料として用いた。一部の実験では、屠畜場で得た6~7ヵ月齢の交雑種未経産ブタの卵巣を使用した。採取した卵巣をPBSおよび25mM HEPES(ナカライテスク)緩衝MEMでそれぞれ2回洗浄したのち、カミソリで2~3mmに細切し、0.4%の濃度でコラーゲナーゼを含むMEMに浸漬して、炭酸ガス培養装置内(39℃, 5%CO₂-95%空気)に45分間静置した。酵素処理後、卵巣を培養液中で数分間ピペティングして細胞を分散させ、卵胞腔形成前の直径0.2~0.3mmの卵胞を採取した。

3) 卵胞の体外培養

卵胞をPBSおよびMEMで洗浄したのち、培養液の小滴中(10 μ l)に1個ず

つ移し，測微接眼レンズを用いて各卵胞内の卵母細胞の直径を $0.5\mu\text{m}$ 単位で測定した。ついで，卵胞を卵母細胞の直径によって $60.0\sim 69.5\mu\text{m}$ ， $70.0\sim 79.5\mu\text{m}$ および $80.0\sim 89.5\mu\text{m}$ の3区に分け，それぞれ3種の方法で培養した。すなわち，(1)卵胞を無処理の培養皿内で底面に付着させて培養する方法，(2)卵胞を寒天処理培養皿内で培養する方法，および(3)卵胞をコラーゲンゲルに包埋して培養する方法である。培養にはいずれも24穴の培養皿(Falcon)を用いた。(3)の培養法では，卵胞を以下の手順でコラーゲンゲルに包埋した。まず，3%のコラーゲン酸性溶液(セルマトリックス-I，新田ゼラチン)， NaHCO_3 を含まない10倍濃度のTCM199(日水製薬)，および NaHCO_3 ($22\text{mg}/\text{ml}$)とHepes($47.7\text{mg}/\text{ml}$)を含む 0.05N の NaOH 溶液の3種類の溶液を8:1:1の割合で混合し，コラーゲン溶液を調整した。卵胞を少量の培養液とともに培養皿の中央に置き， 0.4ml のコラーゲン溶液を加えて振盪したのち， 39°C の培養装置内に20分間静置してゲル化させ，さらに培養液 2ml を静かに注いだ。培養液としては，5%のFCS， $0.1\text{mg}/\text{ml}$ のピルビン酸ナトリウム， $0.9\text{mg}/\text{ml}$ の乳酸カルシウム， $0.55\text{mg}/\text{ml}$ のグルコース， 2mM のヒポキサンチンおよび抗生物質を添加したTCM199を用いた。また，この培養液に $2\text{mIU}/\text{ml}$ のFSH(ブタ脳下垂体由来，Sigma)を添加したものをを用いた。培養は， 39°C ，5% CO_2 -95%空気の気相下で4日間行った。

4) 卵母細胞の観察

培養終了後，卵胞および卵母細胞の状態を倒立顕微鏡下に観察した。卵母細胞は，ピペッティングによって裸化したのち，培養液の小滴中($10\mu\text{l}$)に回収し，観察した。コラーゲンゲルに包埋した卵胞については，裸化の直前に培養液を0.1%のコラゲナーゼを含むMEMに置換して30分間処理し，コラーゲンを消化したのち，顆粒膜細胞に包まれた状態の卵母細胞を新鮮培養液中に移して2回洗浄した。細胞質の希薄化と萎縮，細胞膜の崩壊および細胞質の漏出などの変化が認められた卵母細胞を退行卵母細胞とした。また，トリパンプルー(0.1%)を含むPBSで卵母細胞を1分間処理し，染色された卵母細胞は

その形態に関わりなく退行卵母細胞と判定した。生存卵母細胞については、その直径を測定した後、酢酸アルコール(1:3)で脱脂固定し、1%アセトオルセインで染色して核の状態を微分干渉顕微鏡下に観察した。

結果

卵巣組織中では、直径60~90 μm の発育途上卵母細胞は多層の顆粒膜細胞に囲まれ(図27)、その周囲には基底膜を隔てて、発達した卵胞膜が観察されたが、卵胞腔は認められなかった。

F₁雌ブタから採取した卵巣および屠畜場で入手した卵巣を酵素処理したところ、種々の発達段階の卵胞が得られた。そのうち卵胞腔形成前の卵胞内には多層の顆粒膜細胞に囲まれた卵母細胞が観察されたが、卵胞膜は認められなかった(図28)。一部の卵母細胞は極度に変形しており、それらは以降の実験には用いなかった。

F₁雌ブタから得られた卵胞腔形成前卵胞内の卵母細胞の直径分布を図29に示す。直径65.0~90.0 μm の卵母細胞の割合が高く、100.0 μm 以上の卵母細胞は認められなかった。得られた卵胞数は卵巣当たり15~20個であった。

卵胞をコラーゲンゲルに包埋せず、無処理の培養皿内で培養した場合、顆粒膜細胞は翌日には培養皿底面に付着し、伸展していた。培養4日後には、卵母細胞は顆粒膜細胞から遊離して裸化するか、もしくは扁平な形状へと変化して退行した(図30)。また、複数の卵胞を寒天処理した培養皿内で培養した場合、卵胞は相互に付着して凝集塊を形成し、卵母細胞はその内部で退行した。一方、卵胞をコラーゲンゲルに包埋して培養した場合、培養4日後においても顆粒膜細胞に包まれた形態的に正常な卵母細胞が認められた(図31)。そのような卵母細胞の割合はF S H添加区で36%(24/124)、無添加区で15%(17/110)であった。退行像を示す卵母細胞はいずれもトリパンブルーによって染色されたが、形態的に正常と認められた卵母細胞は不染であり(図32)、生存卵母細胞と考えられた。

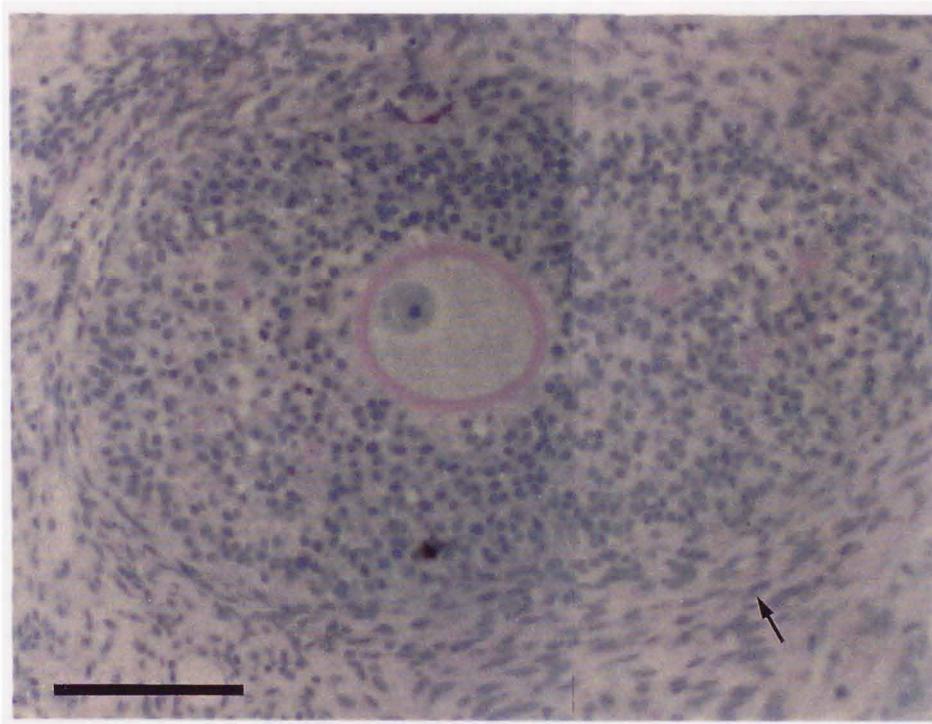


図27 ブタ卵巣内における直径約 $90\mu\text{m}$ の発育途上卵母細胞
卵母細胞は多数の顆粒膜細胞に取り囲まれており、その外周には
発達した卵胞膜(→)が観察される。卵胞腔は未だ形成されていない。
バーは $100\mu\text{m}$ を示す。

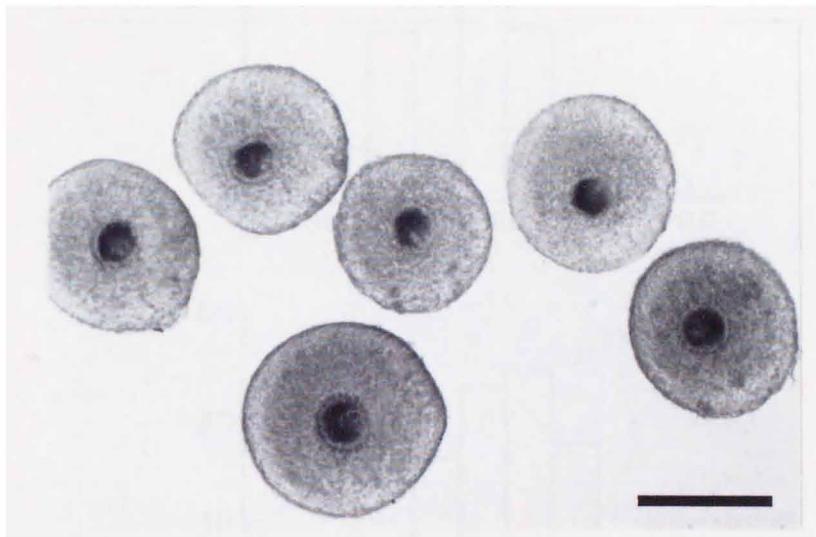


図28 コラゲナーゼ処理によってブタ卵巣から得られた卵胞腔形成前の卵胞
卵胞内に発育途上の卵母細胞が観察される。
バーは200 μ mを示す。

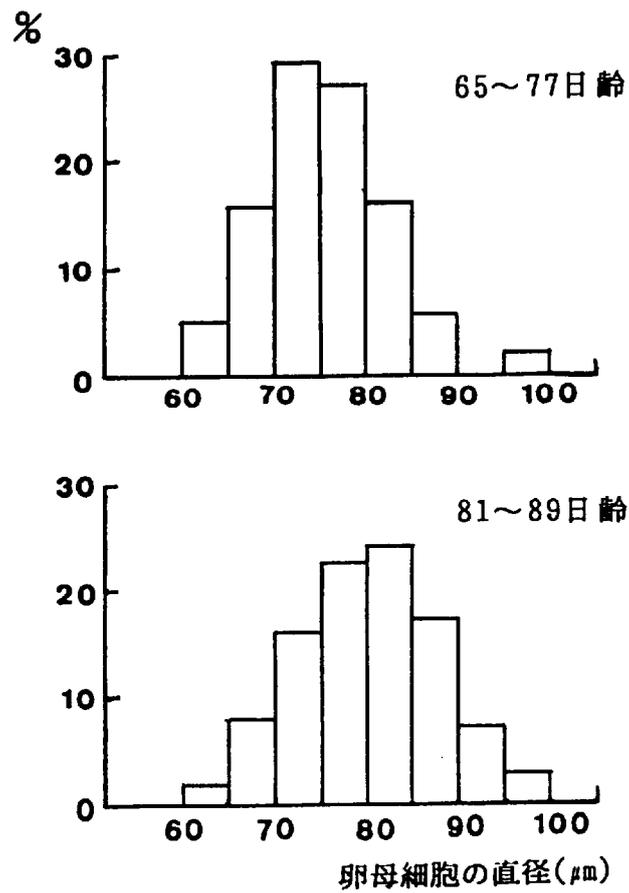


図29 F₁雌ブタ卵巢から酵素処理によって得た卵胞腔形成前の卵胞内の卵母細胞の直径分布

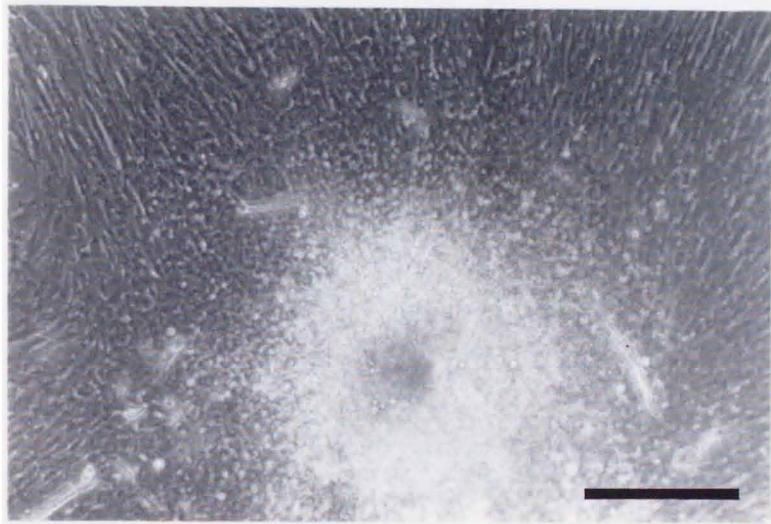


図30 無処理培養皿内で4日間培養した卵胞腔形成前のブタ卵胞
顆粒膜細胞は培養皿底面に付着，伸展しており，内部の卵母細胞は
扁平な形へ変化している。
バーは200 μm を示す。

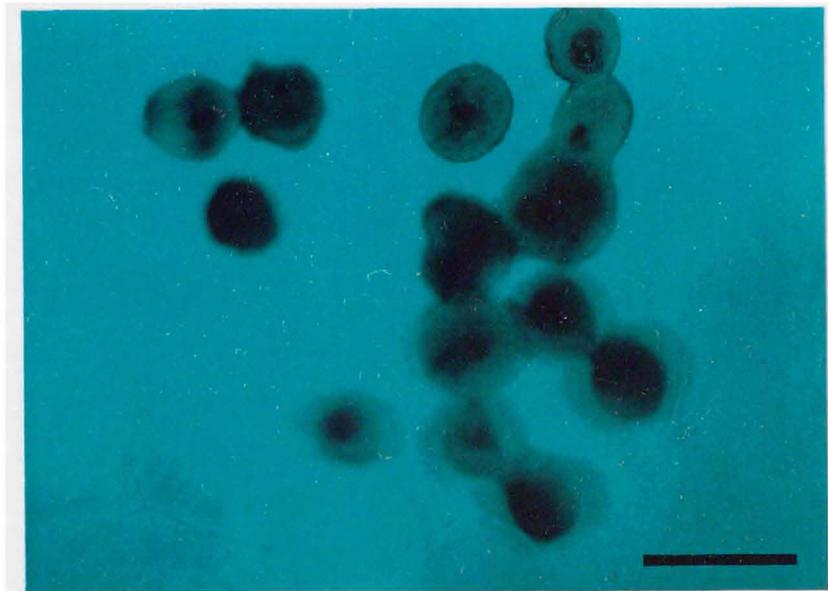


図31 コラーゲンゲル中で2日間培養した卵胞腔形成前のブタ卵胞
卵胞内には形態的に正常な卵母細胞が認められる。
バーは500 μ mを示す。

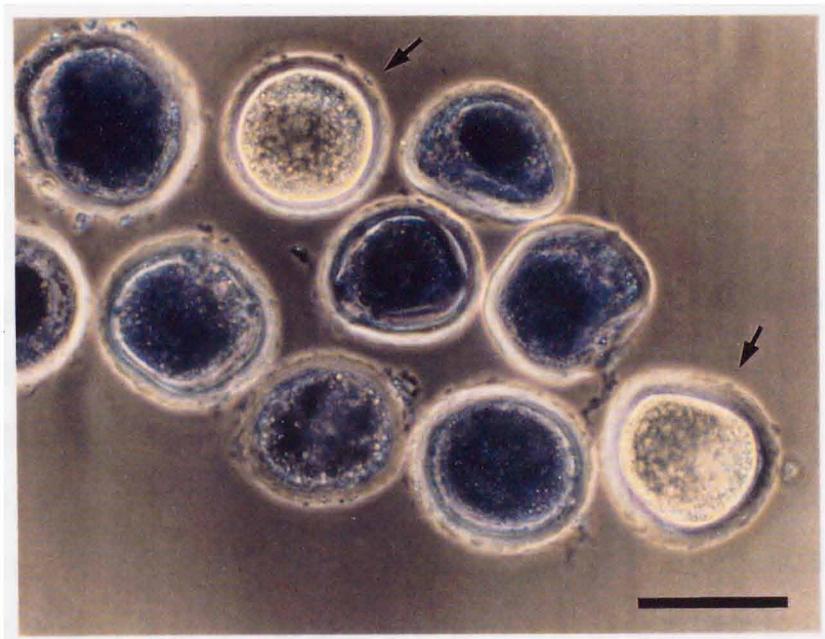


図32 コラーゲンゲル中で4日間培養したブタ卵母細胞
矢印の卵母細胞はトリパンプルーに不染であり，生存
していると考えられる．バーは100 μ mを示す．

卵胞を卵母細胞の直径によって3区に分け、4日間培養した結果を図33に示す。いずれの区においても生存卵母細胞率はF S H添加により上昇した。F S H添加の有無に関わりなく、生存卵母細胞の直径は培養期間中に増大した。直径の増大はF S H添加区においてとくに顕著で、培養開始時の $65.6 \pm 2.6 \mu\text{m}$ 、 $73.9 \pm 3.1 \mu\text{m}$ および $84.2 \pm 1.8 \mu\text{m}$ から終了時にはそれぞれ $77.7 \pm 5.0 \mu\text{m}$ 、 $84.5 \pm 6.3 \mu\text{m}$ および $94.1 \pm 7.4 \mu\text{m}$ へと増加した。生存卵母細胞を固定、染色して観察したところ、いずれの卵母細胞においても卵核胞が観察され、その内部には1個の核小体が認められた(図34)。しかし、減数分裂の再開を示す変化は認められなかった。

考察

ブタ卵母細胞は直径 $120 \mu\text{m}$ まで発育するが⁸⁵⁾、得られた卵胞腔形成前卵胞内の卵母細胞の直径は $60 \sim 100 \mu\text{m}$ であり、 $100 \mu\text{m}$ 以上の卵母細胞は認められなかった。ブタ卵母細胞は卵胞に卵胞腔が形成されたのち直径 $100 \mu\text{m}$ 以上へと発育することが知られており⁸⁵⁾、むしろ当然の結果といえる。また、分離後の卵胞に卵胞膜は認められなかった。卵巣内で同程度に発達した卵胞では卵胞膜が観察されたことから見ると、酵素処理によって卵胞膜細胞は結合組織とともに卵胞の基底膜から剥脱したものと考えられる。

分離した卵胞を無処理培養皿内で培養したところ、培養期間中に卵母細胞の多くは裸化し、いずれも退行した。第3章第3節に記述したように、マウスの卵母細胞は寒天処理した培養皿内で良好に発育したが、ブタ卵胞を同様の方法で培養した場合には、卵母細胞は凝集塊の内部で退行した。卵巣や胎児などの器官培養では、その内部で酸素や栄養素の欠乏が生じ、壊死の起こることが知られている⁸⁹⁾。培養に用いたブタ卵胞内には、マウスのO G Cよりもはるかに多くの顆粒膜細胞が存在し、それらが凝集塊を形成してさらに増殖したため、内部の卵母細胞は生存できなかったと考えられる。

最近、マウスの一次卵胞をコラーゲンゲルに包埋して長期間培養する方法が

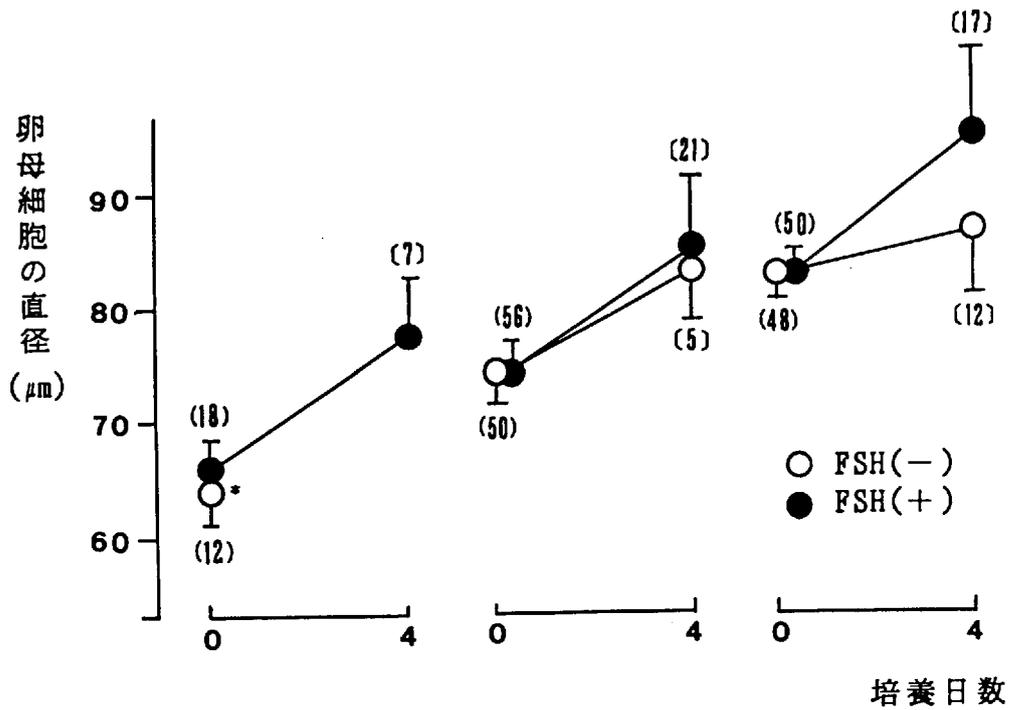


図33 体外培養によるブタ卵母細胞の直径の変化
 ()内の数字は、実験に供した卵胞腔形成前のブタ卵胞数を示す。
 []内の数字は、培養後の生存卵母細胞数を示す。
 * F S H無添加区では、培養終了時までには全ての卵母細胞が退行した。

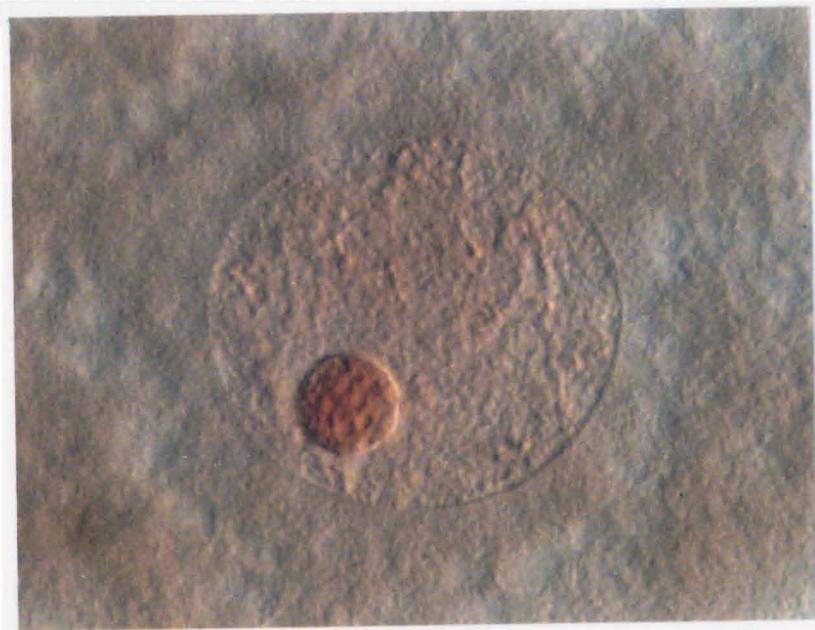


図34 コラーゲンゲル中で4日間培養したブタ卵母細胞の核相卵核胞と，内部には1個の核小体が認められる．

考案された⁸⁸⁾。この培養法では、顆粒膜細胞は卵胞内で増殖して多数の層を作り、卵母細胞は最終段階まで発育すると報告されている²⁵⁾。ブタ卵胞の培養にこの方法を適用したところ、培養4日後においても卵母細胞は顆粒膜細胞に包まれた状態で維持され、その一部は形態的に正常であり、細胞膜はトリパンブルーを排除する機能を保持していた。さらに、正常と判定された卵母細胞では直径の増大が認められた。卵母細胞の発育には顆粒膜細胞との結合が不可欠であることは第3章第3節ですでに述べた。本実験で発育したブタ卵母細胞では、顆粒膜細胞とのギャップ結合が維持され、両者間で物質の交換があったものと考えられる。

マウスの卵母細胞はホルモンを含まない培養液中においても発育する²⁾。しかし、F S Hを含まない培養液中で培養したブタ卵母細胞の多くは退行し、生存卵母細胞の直径もF S H添加区と比べて小さかった。このことは、体外においてブタ卵胞が機能し、卵母細胞が発育するためにはF S Hの存在が重要であることを物語っている。Amsterdamら³³⁾は、ブタ顆粒膜細胞をF S Hの存在下で培養すると、顆粒膜細胞間のギャップ結合が増数すると報告している。本実験の結果から、F S Hは卵胞の顆粒膜細胞間および顆粒膜細胞-卵母細胞間の結合の維持においても重要な役割を演じることが示唆される。

第3節 卵母細胞の体外発育

前節の実験結果から、発育途上ブタ卵母細胞の体外発育には卵胞をコラーゲンゲルに包埋して培養する方法が最適であることが知られた。また、この方法で長期間培養すれば、卵母細胞は最終段階まで発育する可能性もあると考えられた。そこで、本節の実験では、発育途上ブタ卵母細胞を含む卵胞を12日間または16日間培養し、卵母細胞が最終段階にまで発育するか否かを調べるとともに、卵胞の発達について組織学的に検討し、さらに、卵母細胞と卵丘細胞の結合状態を電子顕微鏡下で観察した。

材料および方法

1) 卵胞の分離および培養

屠畜場で得た未経産ブタの卵巣を材料として用いた。卵巣を前節と同様の方法で洗浄および細切したのち、0.1%のコラゲナーゼを含むMEMで1時間処理し、注射針およびピンセットを用いて卵胞を組織片から分離した。直径0.2~0.3mmの卵胞を採取し、培養液で3回洗浄したのち、培養液の小滴(10 μ l)中に1個ずつ移して、直径70.0~89.5 μ mの卵母細胞を含む卵胞を選別し、さらに卵母細胞の直径によって卵胞を70.0~79.5 μ mおよび80.0~89.5 μ mの2区に区分した。

培養液には、50 μ g/mlのピルビン酸ナトリウム、100 μ g/mlのペニシリン、50 μ g/mlのストレプトマイシン、5%のFCS、2mIU/mlのFSHおよび1 μ g/mlのエストラジオール-17 β (Sigma)を含むWaymouth's medium (Waymouth 752/1MB, Sigma)を用いた。卵母細胞を含む卵胞を培養皿(35 \times 10 mm, Falcon)に移し、前節と同様の方法でコラーゲンゲルに包埋したのち、炭酸ガス培養装置内(39 $^{\circ}$ C, 5%CO₂-95%空気)で培養した。直径70.0~79.5 μ mの卵母細胞については16日間、直径80.0~89.5 μ mの卵母細胞については12日間培養し、4日毎に培養液の半量を新鮮なものと交換した。培養終了後、コラーゲンゲル

を0.1%のコラゲナーゼ液で消化して卵胞を回収し，採取した卵母細胞をピペティングによって裸化したのち，倒立顕微鏡下に観察した。卵母細胞の著しい変形，細胞質の萎縮および細胞膜の崩壊が認められた卵母細胞を退行卵母細胞と判定した。正常と判定した卵母細胞については，直径を測定した。

2) 卵胞の組織染色標本の作製

培養16日後に卵胞を回収し，10%のホルマリンに浸漬して固定したのち，エタノール上昇系列に浸漬して組織を完全に脱水した。卵胞をメタクリレート系樹脂K4M(Lowicryl K4M; Chemische Werke Lowi GMBH & Co.)に包埋したのち，ウルトラミクロトームを用いて1 μ mの連続切片を作製した。切片を1%トルイジンブルー液で染色したのち，顕微鏡下に卵母細胞および卵胞を観察した。

3) 卵胞の電子顕微鏡標本の作製

16日間培養した卵胞を10%ホルマリンで固定し，脱水したのち，四酸化オスミウムで後固定してエポキシ樹脂(ルベアック; 812, ナカライテスク)に包埋し，超薄切片を作製した。切片を酢酸ウランおよびクエン酸鉛で電子染色したのち，電子顕微鏡下(1200EX; JEOL)に観察した。また対照として，屠畜場で採取した卵巣内の卵胞についても同様の方法で標本を作製し，観察した。

結果

卵母細胞は，培養期間中を通じて顆粒膜細胞に包まれた状態で維持された。培養日数の経過とともに顆粒膜細胞の退行を示す卵胞がやや増加したが，多くの卵胞は培養終了時まで形態的に正常であった。培養8日目以降，正常な卵胞の多くで卵胞腔が認められた(図35)。培養終了後，これらの卵胞を破碎したところ，内部に1～2層の顆粒膜細胞に包まれた卵母細胞が認められた(図36)。

直径70.0～79.5 μ mおよび80.0～89.5 μ mの卵母細胞を含む卵胞をそれぞれ16日



図35 培養16日後のブタ卵胞
培養開始時には認められなかった卵胞腔が形成されている。
バーは200 μ mを示す。

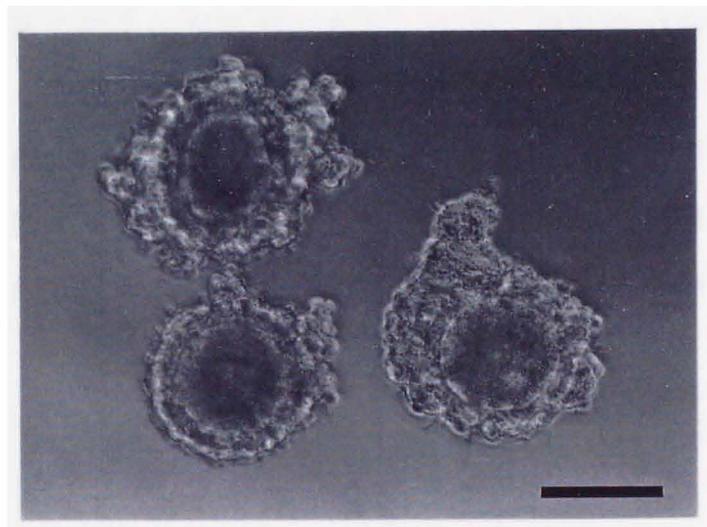


図36 培養16日後のブタ卵胞から取り出した卵母細胞－卵丘細胞複合体
バーは100 μ mを示す。

間および12日間培養した結果を図37に示す。培養終了時に認められた形態的に正常な卵母細胞の割合は、それぞれ43%(26/60)および32%(27/84)であった。平均直径は培養開始時における $74.0 \pm 3.1 \mu\text{m}$ および $83.9 \pm 3.3 \mu\text{m}$ から、それぞれ $95.3 \pm 7.1 \mu\text{m}$ および $100.5 \pm 6.8 \mu\text{m}$ へと増大しており、直径 $115 \mu\text{m}$ 以上の卵母細胞がそれぞれ1個および2個含まれていた。

図38に培養16日後の卵胞の組織染色標本を示す。培養後の卵胞の形態は卵巣内で発達途上にある初期胞状卵胞に類似していたが、基底膜の外側には卵胞膜細胞は認められなかった。卵胞腔の形成とともに卵丘の形成が認められた。また、壁、卵丘ともに顆粒膜細胞の核濃縮はほとんど認められなかった。卵母細胞外周の透明帯は卵巣内の卵母細胞の透明帯よりも薄かったが、卵母細胞内には卵核胞および1個の核小体が観察された。また、卵胞腔の内部はトルイジンブルーによって薄く染色された。

培養16日後の卵母細胞および卵巣内で発育した卵母細胞表層の微細構造を図39に示す。卵丘細胞から卵母細胞へ伸びた突起の先端と卵母細胞の細胞膜との間に結合が認められた。また、培養後の卵母細胞においても核膜が明瞭に観察された(図40)。

考察

前節の実験において、発育途上ブタ卵母細胞の体外発育の可能性が示唆された。本節の実験結果は、前節とほぼ同様の培養条件下でも培養期間を延長すれば、発育途上卵母細胞が最終段階まで発育することを示している。

F S Hの効果は顕著で、それを含む培養液中では培養16日後においても、30~40%の卵母細胞で生存が確認され、平均直径にして約 $20 \mu\text{m}$ の増加が認められた。McNattyら⁹⁰⁾はF S Hを含まない培養液中で培養したヒト顆粒膜細胞では核濃縮が認められたと報告している。F S Hを含まない培養液中でブタ卵母細胞が退行した原因も顆粒膜細胞の退行によると考えられる。

卵巣内では卵母細胞の発育とともに卵胞も発達し、卵胞腔の形成後は顆粒膜

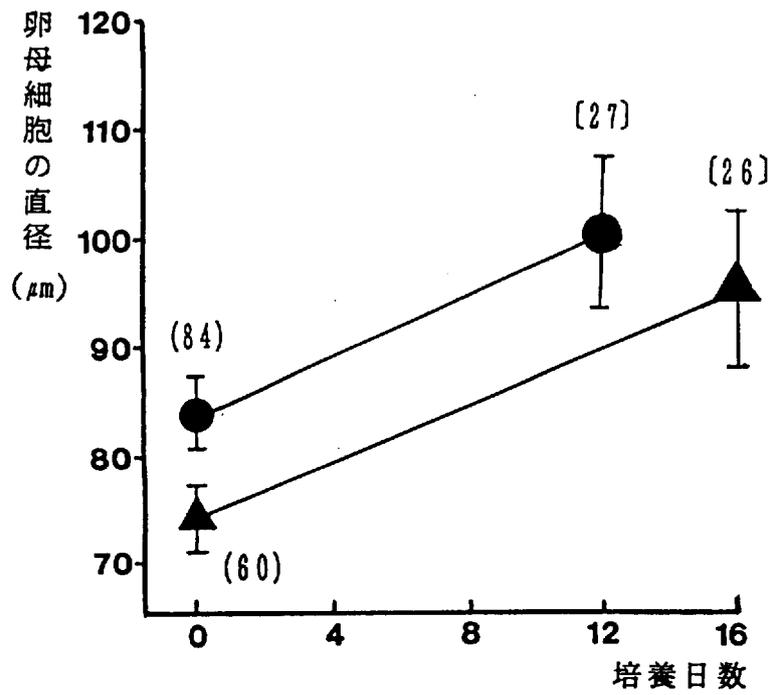


図37 体外培養によるブタ卵母細胞の直径の変化
 ()内の数字は、実験に供した卵胞腔形成前のブタ卵胞数を示す。
 []内の数字は、培養後の生存卵母細胞数を示す。

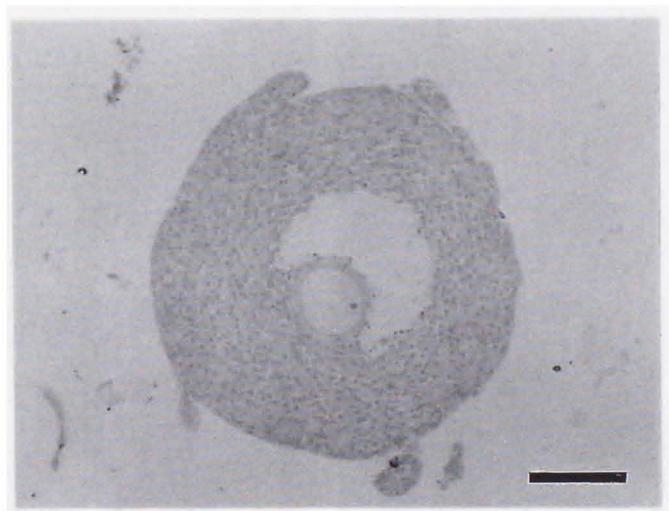


図38 培養16日後のブタ卵胞

顆粒膜細胞の著しい増殖と卵胞腔の形成，それにともなう卵丘の形成が認められる．顆粒膜細胞層の外周には基底膜が認められるが，その外側に卵胞膜は存在しない．
バーは150 μ mを示す．

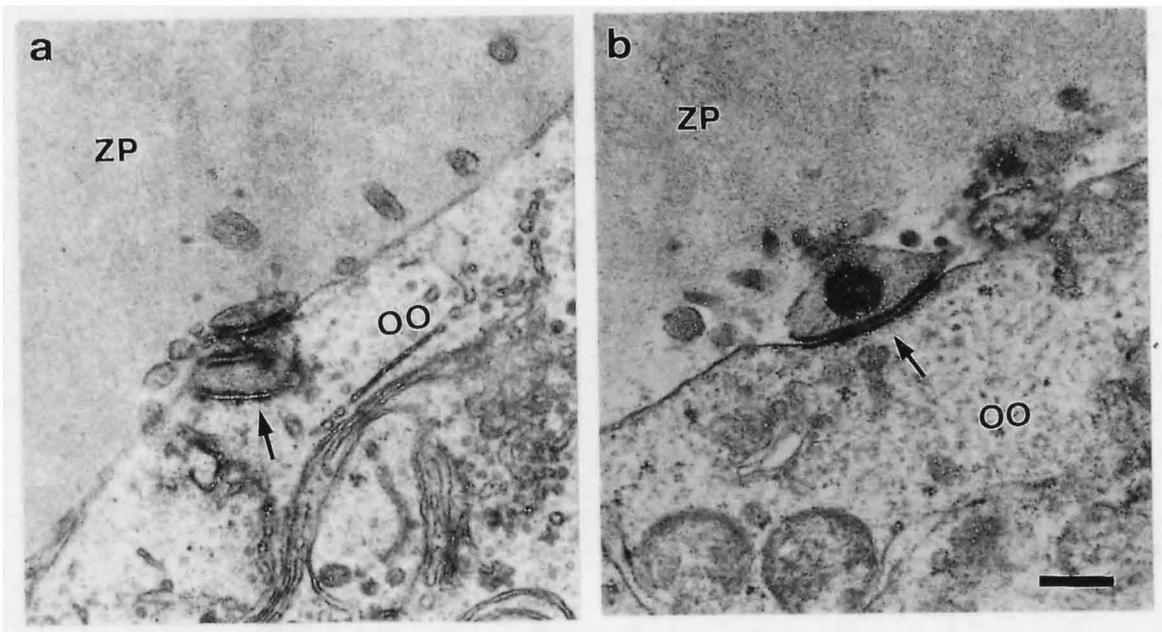


図39 生体内および培養16日後のブタ卵母細胞表層の微細構造
 卵丘細胞から透明帯(ZP)を貫通して卵母細胞へ伸びている突起の
 先端と卵母細胞(OO)の細胞膜との間に結合が認められる(→)。
 a 体内発育卵母細胞。
 b 体外発育卵母細胞。
 バーは400nmを示す。

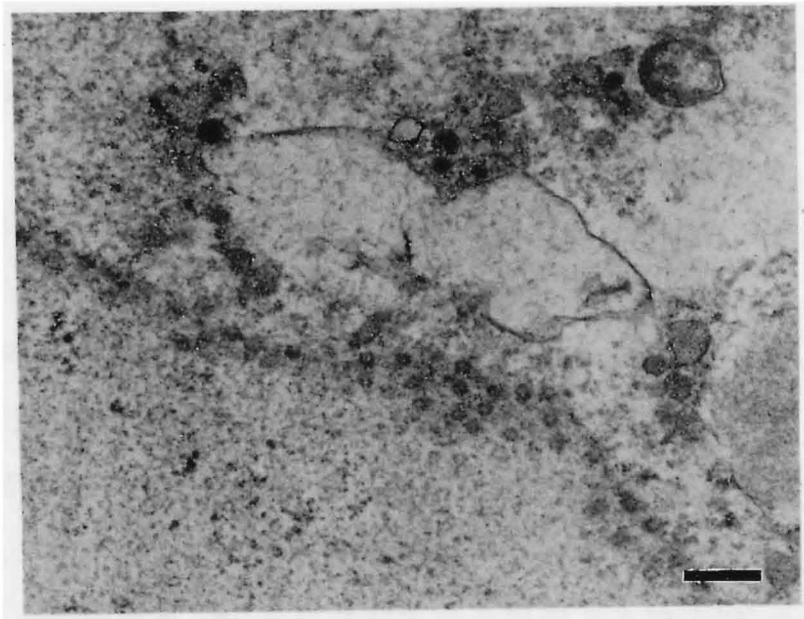


図40 培養16日後のブタ卵母細胞の核膜の微細構造
バーは500nmを示す。

細胞の増数と卵胞液の蓄積によって卵胞の直径は急速に増大する^{9¹)}。卵胞腔形成の機序に関しては不明な点が多いが、その形成には少なくともFSHの存在が必要とされている。ハムスター^{9²)}およびマウス^{9³)}の卵胞腔形成前の卵胞をFSHを含む培養液中で培養すると卵胞腔が形成される。また、ラットの卵胞腔形成前の卵胞をFSHを添加した培養液中で培養皿底面に付着させて培養すると、卵母細胞周囲の顆粒膜細胞の外側に卵胞壁を形成するように顆粒膜細胞が増殖し、その内側に卵胞腔様の構造が形成される^{9⁴)}。FSHはブタ卵胞の発達においても重要であり、それを添加した培養液中でのみ卵胞腔が形成された。エストロジェンが卵胞発達を二次的に促進することも示唆されている^{9⁴, 9⁵)}。生体内では卵胞膜細胞においてアンドロジェンが生産され、芳香化されてエストロジェンが生産される^{9⁶)}。前節の実験結果から、酵素処理で分離した卵胞には卵胞膜細胞が存在しないことが知られており、顆粒膜細胞へのアンドロジェンの供給はないと考えられたので、本実験ではエストロジェンを添加した培養液で卵胞を培養した。この外因性のエストロジェンが卵胞の発達を促進した可能性も十分に考えられる。

卵胞腔内の卵胞液には、血漿由来の成分とともに顆粒膜細胞の分泌物が含まれている^{9¹)}。コンドロイチン硫酸などのグリコサミノグリカンが豊富に含まれ^{9¹)}、ブタでは卵母細胞の減数分裂再開を抑制する因子^{9⁷)}や、顆粒膜細胞の黄体化を抑制する因子も含まれている^{9⁸)}。培養した卵胞の卵胞腔はトルイジンブルーにより薄く染色されたが、生体内で発達した卵胞腔と同様に顆粒膜細胞由来の蛋白質あるいはグリコサミノグリカンが蓄積していたものと考えられる。

卵母細胞の発育にはギャップ結合を介する顆粒膜細胞との結合が不可欠である。培養後の卵母細胞の表層を電子顕微鏡下で観察したところ、透明帯を貫通する卵丘細胞の突起が卵母細胞表面に達し、卵母細胞の細胞膜と結合していることが確認された。このことは、卵母細胞と顆粒膜細胞との結合が培養期間を通して維持されたことを実証するものといえる。

第4節 小括

ブタ卵巢から発育途上卵母細胞を含む卵胞を分離し、4日間培養して、卵母細胞の生存性および発育状況を調べた。ついで、卵胞を12日間または16日間培養し、発育途上卵母細胞が最終段階まで発育するか否かを検討し、さらに培養後の卵胞の発達および卵母細胞と卵丘細胞との結合状態についても検討した。

1) ブタの卵巢をコラゲナーゼで処理したところ、種々の発達段階にある卵胞が得られた。卵胞腔形成前卵胞内には直径60~100 μm の卵母細胞が認められた。卵胞腔形成前の卵胞をコラーゲンゲルに包埋して4日間培養したところ、卵母細胞は培養後も顆粒膜細胞に囲まれており、形態的にも正常であった。生存卵母細胞の割合はF S H添加区で33%、無添加区は15%であり、これらの卵母細胞では直径も増大していた。

2) 直径70.0~89.5 μm の卵母細胞を含む卵胞腔形成前の卵胞をコラーゲンゲルに包埋し、F S Hおよびエストロジェンを含む培養液中で12日間または16日間培養した。培養後、30~40%の卵母細胞で生存が確認され、一部は直径115.0 μm 以上へと発育していた。卵胞には卵胞腔が形成され、卵丘細胞から卵母細胞へ伸びた突起の先端と卵母細胞との間に結合が認められた。

第6章 体外発育ブタ卵母細胞の体外成熟および体外受精

第1節 緒言

体内で発育を完了したブタの卵母細胞を体外に取り出して培養すると自発的に減数分裂が再開され、核は第Ⅱ減数分裂中期へと成熟する⁸⁴⁾。Motlikら⁸⁵⁾は、発育途上の卵母細胞の成熟能力を調べ、直径約100 μ mの卵母細胞は減数分裂を再開するが、第Ⅰ減数分裂中期にいたるまでにその成熟を停止するのに対し、直径約115 μ m以上に発育した卵母細胞は第Ⅱ減数分裂中期まで成熟すると報告している。ブタ卵母細胞では、卵核胞崩壊および第2極体の放出には蛋白質の合成^{99, 100)}やリン酸化⁴⁹⁾が必要なことから、卵母細胞が発育途上で成熟能力を獲得する際には、それらの変化に必要な蛋白質あるいはmRNAの合成や蓄積が起こると考えられている⁴⁹⁾。

一方、体外で第Ⅱ減数分裂中期へと成熟したブタ卵母細胞では、精子が侵入しても雄性前核の形成率が低いことが知られている^{80, 81)}。その原因については未だ不明な点が多く、体外では核が成熟しても細胞質の成熟が伴わないためと考えられている⁷⁶⁾。

前章の実験結果から、発育途上ブタ卵母細胞は体外においても最終段階まで発育することが明らかとなった。しかし、ブタ卵母細胞の体外発育に関する研究報告は未だ皆無であり、体外発育ブタ卵母細胞の成熟能力および受精能力については全く知られていない。本章では、まず体外発育ブタ卵母細胞の直径と成熟能力との関係を調べ、体内発育卵母細胞と比較した。ついで、体外発育・成熟卵母細胞に媒精し、その受精能力について検討した。

第2節 体外発育卵母細胞の成熟能力

本節では、体外発育ブタ卵母細胞の成熟能力を明らかにする目的で、卵母細胞の直径と成熟培養後の核の成熟段階との関係を調べ、体内発育卵母細胞のそれと比較した。

材料および方法

1) 体内発育卵母細胞の採取および成熟培養

屠畜場で得たブタ卵巣内の直径3mm以下の卵胞から、卵丘細胞に包まれた直径70~120 μ mの卵母細胞を採取した。ついで、直径90 μ m以上の卵母細胞については卵胞腔の認められる卵胞を柄付き針で破砕することによって採取し、直径90 μ m未満の卵母細胞については前章第4節と同様の方法で卵胞腔形成前の卵胞からピペティングによって採取した。成熟培養には、修正Krebs-Ringer bicarbonate(mKRB)液¹⁰⁾を用いた。卵母細胞と卵丘細胞の複合体を培養液の小滴(100 μ l)中で3回洗浄した後、10 μ lの小滴中に1個ずつ移して炭酸ガス培養装置内(39℃, 5%CO₂-95%空気)で48時間培養した。成熟培養開始直後に卵母細胞の直径を0.5 μ m単位で測定した。

2) 卵母細胞の発育培養および成熟培養

屠畜場で得たブタ卵巣から、直径70.0~89.5 μ mの卵母細胞を含む卵胞を前章第4節と同様の方法で分離し、発育培養した。培養16日後にピンセットを用いて卵胞を破砕し、卵母細胞と卵丘細胞の複合体を回収した。そのうち形態的に正常な卵母細胞を上述の方法で48時間成熟培養した。

3) 卵母細胞の固定および観察

成熟培養後に卵母細胞を回収し、裸化したのち、前章第2節と同様の方法で固定、染色し、微分干渉顕微鏡下($\times 400$)で卵母細胞の核の成熟段階を判定した。染色体の分散が認められる卵母細胞は、退行卵母細胞と判定した。デー

タの統計的有意性は、 χ^2 検定によって判定した。

結果

体内発育卵母細胞および体外発育卵母細胞の直径と成熟培養後における核の成熟段階との関係について検討した結果を表9に示す。

体内発育卵母細胞では、卵核胞崩壊は直径90.0 μm 以上の卵母細胞で認められ、その割合は直径90.0~99.5 μm 、100.0~109.5 μm および110.0 μm 以上の卵母細胞でそれぞれ6%、53%および77%であった。第II減数分裂中期への成熟は直径100.0~109.5 μm および110.0 μm 以上の卵母細胞において認められ、その割合はそれぞれ4%および41%であった。

一方、体外発育卵母細胞については、合計486個の卵胞腔形成前の卵胞を用いたが、151個(31%)の卵母細胞は発育培養後においても形態的に正常であった。成熟培養開始直後に卵母細胞の直径を測定したところ、直径70.0~89.5 μm の卵母細胞は35個(23%)、90.0~99.5 μm は51個(34%)、100.0~109.5 μm は50個(33%)、110.0 μm 以上は15個(10%)であった。卵核胞崩壊は直径90.0 μm 以上の卵母細胞で認められ、その割合は直径90.0~99.5 μm 、100.0~109.5 μm および110.0 μm 以上の卵母細胞でそれぞれ6%、30%および60%であった。直径90.0~99.5 μm の卵母細胞では、卵核胞崩壊後も染色体は移動期の後期(late diakinesis)に留まっており、紡錘体の形成は認められなかった。直径100.0~109.5 μm の卵母細胞では16%が第I減数分裂中期であったが、第II減数分裂中期への成熟は認められなかった。一方、直径110.0 μm 以上へと発育した卵母細胞では、40%は第II減数分裂中期へと成熟した(図41)。

考察

本実験の結果から、ブタ卵母細胞は体外培養条件下においても、その発育に伴って減数分裂を再開する能力および第II減数分裂中期へと成熟する能力を獲得すると考えられる。Motlikら⁸⁵⁾は、卵胞腔形成前後の卵胞から直径約100 μm

表9 体内および体外で发育したブタ卵母細胞の直径と成熟率との関係

卵母細胞の发育	卵母細胞の直径(μm)	供試卵母細胞数	減数分裂を再開した卵母細胞数(%)					退行卵母細胞数 ^a (%)
			計	移動期後期	第I減数分裂中期	第II減数分裂中期		
体内	70.0-89.5	34	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	90.0-99.5	32	2 (6) ^b	2 (6)	0 (0)	0 (0)	2 (6)	
	100.0-109.5	47	25 (53) ^d	8 (17)	15 (32)	2 (4) ^b	0 (0)	
	110.0-120.0	34	26 (77) ^d	7 (21)	5 (15)	14 (41) ^c	1 (3)	
体外	70.0-89.5	35	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (3)	
	90.0-99.5	51	3 (6) ^b	3 (6)	0 (0)	0 (0)	3 (6)	
	100.0-109.5	50	15 (30) ^c	7 (14)	8 (16)	0 (0)	3 (6)	
	110.0-120.0	15	9 (60) ^{c,d}	1 (7)	2 (13)	6 (40) ^c	1 (7)	

^a染色体が分散していた卵母細胞。

^{b-d}同じ列内の異なる肩文字を持つ数値間の差は有意. $P < 0.05$, χ^2 検定.

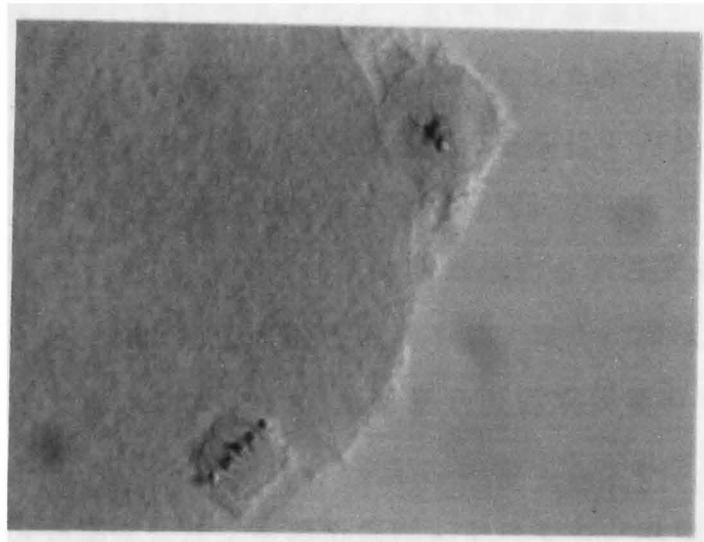


図41 体外発育・成熟ブタ卵母細胞
第1極体および第Ⅱ減数分裂中期の像を示す染色体が
観察される。

のブタ卵母細胞を分離して48時間培養すると、減数分裂の再開が認められると報告している。本実験においても、卵胞腔を形成した卵胞から採取した直径90.0 μm 以上の卵母細胞においてのみ減数分裂の再開が認められた。また、体外発育卵母細胞においても、直径90.0 μm 以上の卵母細胞では減数分裂の再開が認められたが、直径89.5 μm 以下の卵母細胞では認められなかった。これらのことから、ブタ卵母細胞は、体外および体内を問わず、直径90~100 μm へと発育する間に減数分裂を再開する能力を獲得すると考えられる。

マウス卵母細胞の減数分裂の再開には、MPFと呼ばれる細胞質内の因子が関与している^{50, 51)}。減数分裂を再開したマウスの卵母細胞の細胞質をブタの卵核胞期の卵母細胞に顕微注入すると、染色体が凝縮し、卵核胞が崩壊する¹⁰²⁾。また、ヒストンH1キナーゼ活性を指標としたMPFの活性は、ブタ卵母細胞の成熟変化に伴って変動し、減数分裂の中期にその活性が上昇するとの報告¹⁰³⁾もあり、ブタ卵母細胞の減数分裂の再開においてもMPFが重要な役割を果たすと考えられている⁴⁹⁾。ブタ卵母細胞を蛋白質合成阻害剤の存在下に成熟培養すると卵核胞崩壊が阻害されることから、卵核胞崩壊には蛋白質の合成が不可欠と見られている⁹⁹⁾。MPFの構成要素あるいはMPFの活性を誘動する蛋白質がこの段階で合成されると考えられており⁴⁹⁾、本実験の体外培養条件下で発育したブタ卵母細胞においても、成熟培養中に減数分裂の再開を制御する蛋白質が合成されたものと推定される。

Motlikら⁸⁵⁾は、直径約100 μm のブタ卵母細胞は減数分裂を再開するが、第II減数分裂中期までは成熟しないと報告している。本実験においても、体外で発育させた卵母細胞のうち、直径110.0 μm 以上の卵母細胞の40%は第II減数分裂中期へと成熟したが、直径109.5 μm 以下の卵母細胞では成熟はその途上で停止した。このことは、体内で発育した卵母細胞でもほぼ同じであった。減数分裂が再開されたのち、第II減数分裂中期まで成熟するには新たな蛋白質の合成が必要と見られている¹⁰⁰⁾。体外培養条件下において直径110 μm 以上へと発育した卵母細胞で、そのような蛋白質の合成が起こるか否かについては、今後の研究に待たねばならない。

第3節 体外発育・成熟卵母細胞の体外受精

前節までの結果から、ブタ卵母細胞は体外で最終段階まで発育し、その発育とともに第Ⅱ減数分裂中期へと成熟する能力を獲得することが知られた。本節では、体外発育・成熟ブタ卵母細胞を用いて体外受精を行い、受精能力の有無を検討した。

材料および方法

1) 卵母細胞の発育培養および成熟培養

屠畜場で得た卵巣から、直径70.0~89.5 μ mの卵母細胞を含む卵胞を前章第4節と同様の方法で分離し、16日間発育培養した。培養後、ピンセットを用いて卵胞を破碎し、卵母細胞と卵丘細胞の複合体を回収した。そのうち形態的に正常な卵母細胞を本章第2節と同じ方法で成熟培養した。培養48時間後に卵母細胞を10mg/mlのBSA(Sigma)および2mMのカフェイン(Sigma)を添加したBO液¹⁰⁴⁾の小滴(100 μ l)中に回収して3回洗浄したのち、5~10個の卵母細胞を培養液の小滴(90 μ l)中に移し、体外受精実験に供した。

2) 精子の処理および体外受精

精子の処理および媒精を、Nagaiら¹⁰⁵⁾の方法に準じて行った。凍結ブタ精巣上体精子を3mg/mlのBSAを含む37℃のTCM199(8ml)に浮遊させた。精子を700gで3分間遠心分離して洗浄したのち、12%FCSを添加したTCM199(pH7.8)に再浮遊させ、再び700gで3分間遠心分離して精子濃度を2~4 $\times 10^8$ cells/mlに調整し、37℃、5%CO₂-95%空気の炭酸ガス培養装置内で30分間前培養した。ついで、卵母細胞を含む培養液小滴中に最終濃度で2 $\times 10^6$ cells/mlとなるように媒精し、39℃、5%CO₂-95%空気の炭酸ガス培養装置内で培養した。媒精10時間後に、前章第2節と同様な方法で卵母細胞を固定、染色し、精子侵入の有無および卵母細胞の核の状態を微分干涉顕微鏡下に

観察した。

結果

114個の発育途上卵母細胞を用い、発育培養および成熟培養を行った結果、40個の卵母細胞は形態的に正常であった。そのうち、直径90.0 μ m以上の卵母細胞36個を体外受精実験に供したところ、3個(8%)の卵母細胞において精子の侵入が認められた。精子の侵入がないまま第II減数分裂中期に留まっていた卵母細胞は2個であった。他の卵母細胞は卵核胞期あるいは成熟途上であり、これらの卵母細胞においては精子の侵入は認められなかった。

精子侵入を受けた卵母細胞では1個の雌性前核、1個あるいは2個の精子頭部とそれに対応する尾部が観察された(図42)。しかし、雄性前核の形成は認められず、精子頭部の膨化も不完全であった。また、第2極体の放出はいずれの卵母細胞においても認められなかった。

考察

本実験の結果は、体外発育・成熟ブタ卵母細胞が受精可能であることを示唆している。精子侵入の認められた卵母細胞では、雌性前核が形成されており、体外発育・成熟卵母細胞は精子の侵入を受けて賦活化されると考えられる。しかし、いずれの卵母細胞においても、雄性前核は形成されなかった。体外で成熟したブタ卵母細胞では、雄性前核の形成率が低いことが知られており^{80, 81)}、その原因として、雄性前核の形成を促進する因子(MPGF)の不足が考えられている⁷⁶⁾。体外発育・成熟した卵母細胞でもMPGFの合成が不十分であったため、雄性前核が形成されなかったのかもしれない。第4章第4節に記述したように、マウスでは、体外で発育、成熟し、精子の侵入を受けた卵母細胞の87%において雄性前核が形成された。精子のDNAはプロタミンによってまとめられているが、卵子に侵入すると、プロタミンはヒストンに置き換えら

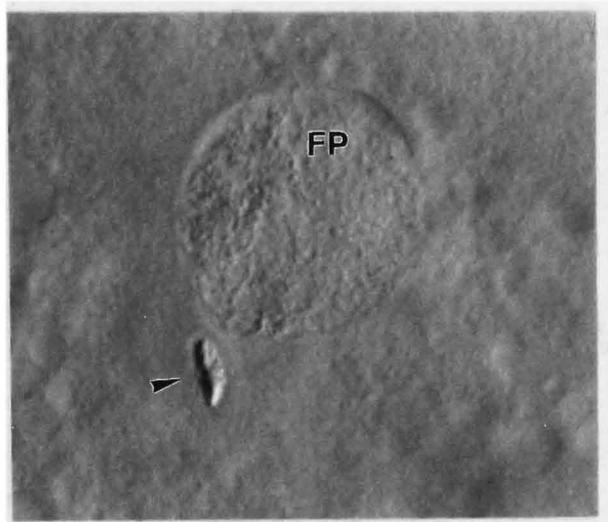


図42 体外発育・成熟ブタ卵母細胞の受精像
雌性前核(FP)と精子頭部(▼)が認められる。

れ、精子頭部は脱凝縮する¹⁰⁶⁾。哺乳類の精子中には、S-S結合数の異なるプロタミン1およびプロタミン2が見出されており、S-S結合の少ないプロタミン2を多く含むヒトやマウスの精子をハムスターの成熟卵母細胞内に顕微注入すると、他の動物種に比べて短時間でその頭部は膨化する¹⁰⁷⁾。体外で発育し成熟したブタ卵母細胞では、細胞質の成熟が不十分であったため、精子のプロタミンの構成の差が顕著に現われ、精子頭部の膨化が起こらなかったことも考えられる。

ブタの体外発育・成熟卵母細胞では、精子の侵入後も第2極体は放出されなかった。第4章第4節に記述したように、マウス体外発育・成熟卵母細胞においても第2極体の放出に失敗したと思われる例が認められた。老化卵子では紡錘体や細胞骨格の退行変化が一因となって第2極体放出率が低下する⁸³⁾。体外で長時間培養したブタ卵母細胞においても、同様の退行変化が生じ、第2極体の放出が正常に行われなかったと考えられる。

第4節 小括

本章の実験では、体外発育ブタ卵母細胞の発育段階と成熟能力との関係を調べ、体内発育卵母細胞のそれと比較した。またついで、体外発育・成熟卵母細胞の受精能力についても検討した。

1) 体外発育卵母細胞を用いて成熟培養を行った結果、直径 $90.0\mu\text{m}$ 以上の卵母細胞において卵核胞の崩壊が認められ、その割合は培養開始時の卵母細胞の直径の増大に伴って増加した。また、直径 $110\mu\text{m}$ 以上へと発育した卵母細胞の40%は第II減数分裂中期へと成熟した。体内発育卵母細胞においても直径と成熟率との間に同様の関係が認められたことから、ブタの卵母細胞は体外においても体内と同じ発育段階で成熟能力を獲得すると結論した。

2) 体外発育ブタ卵母細胞36個を用い、成熟培養後に媒精した結果、3個で精子の侵入が認められた。精子の侵入を受けた卵母細胞では、第2極体の放出は認められず、侵入精子の頭部の膨化も不十分であったが、雌性前核の形成は確認された。

第7章 総括

哺乳類の卵母細胞を体外で発育させるための培養系を確立することは、その形成機構に解明に資するばかりでなく、雌家畜の潜在的繁殖能力の利用拡大という実用的観点からも重要な意義を有すると考えられる。本研究では、家畜の発育途上卵母細胞の体外発育培養系を確立する目的で、まず、マウス発育途上卵母細胞の体外発育に影響する諸要因や、最終段階まで発育した卵母細胞の成熟能力および受精能力について検討した。ついで、マウスで得られた知見をもとに、ブタ発育途上卵母細胞の発育培養を試み、得られた体外発育卵母細胞の成熟能力および受精能力について検討した。

1) マウス卵母細胞の体外発育

マウス卵巣内における卵母細胞の形成および発育について調べた結果、妊娠16日齢までに全ての卵母細胞が減数分裂を開始し、出生直後ではディプロテン期に達していた。卵胞形成は出生直後の卵巣で初めて観察された。出生後日齢の経過とともに卵母細胞の直径は増大し、18日齢の卵巣では発育の最終段階である直径70 μm 以上の卵母細胞が認められた。

出生直後のマウス卵巣を8日間器官培養したところ、一部の卵母細胞の直径は当初の約20 μm から40 μm まで発育した。また、PMSG(10~50IU/ml)は卵母細胞の発育を促進した。

10日齢のマウス卵巣にコラゲナーゼ処理を施し、発育途上卵母細胞と顆粒膜細胞との複合体(OGC)を得た。OGCを無処理あるいは寒天処理した培養皿中で12日間培養した結果、ヒポキサンチン添加の有無に関わりなく、24~40%の卵母細胞は直径60.0 μm 以上へと発育した。体外発育卵母細胞を用いて成熟培養を行った結果、体内発育卵母細胞と同様の時間経過で卵核胞崩壊および第1極体の放出が認められた。また、卵母細胞の直径と卵核胞崩壊率および第II減数分裂中期への成熟率との関係も体内発育卵母細胞とよく一致したことから、マウス卵母細胞は体外においても体内と同様の発育段階で成熟能力を獲得する

と結論した。

体外発育マウス卵母細胞を成熟させ、体外受精した結果、成熟卵母細胞の72%が受精し、そのうち87%で雄性前核が認められた。また、単精子受精率は87%で、排卵卵子のそれと同等の高い値を示した。

2) ブタ卵母細胞の体外発育

ブタ卵巣から発育途上卵母細胞(60.0~90.0 μm)を含む卵胞を分離し、コラーゲンゲルに包埋して4日間培養した。卵母細胞は培養期間を通じて顆粒膜細胞に包まれ、形態的にも正常に維持された。生存卵母細胞では直径の増大が認められ、またその割合はFSH添加により高められた。

直径70.0~89.5 μm の卵母細胞を含む卵胞をコラーゲンゲルに包埋し、FSHを含む培養液中で12日ないし16日間にわたり培養した。その結果、30~40%の卵母細胞は生存性を維持し、一部は直径115.0 μm 以上へと発育した。卵胞中には卵胞腔が形成され、卵丘細胞と卵母細胞との間の結合も確認された。

体外で発育させたブタ卵母細胞について成熟培養を行った結果、直径90.0 μm 以上の卵母細胞において卵核胞崩壊が認められ、その割合は直径の増大とともに増加した。さらに、直径110.0 μm 以上へと発育した卵母細胞では40%が第II減数分裂中期へと成熟した。体内発育卵母細胞においても直径と成熟率との間に同様の関係が認められたことから、ブタの卵母細胞は体外においても体内と同じ発育段階で成熟能力を獲得すると考えられた。

体外で発育、成熟させたブタ卵母細胞に媒精した結果、8%(3/36)の卵母細胞で精子の侵入が認められた。侵入精子の頭部の膨化は不十分であり、第2極体も放出されなかったが、雌性前核形成は認められた。このことから、体外発育卵母細胞の成熟培養系を改善することにより正常受精も可能になると考えられた。

謝辞

本研究の遂行並びに本論文の作成にあたり、暖かい御指導、御助言を賜わった加藤征史郎教授に深甚なる謝意を表するとともに、終始御指導、御教示を頂いた家畜繁殖学教室 三宅正史助教授、宮野 隆助手に深く感謝する。

懇切なる御指導を賜わった荻田 淳 神戸大学名誉教授に心から感謝の意を表する。

また、神戸大学農学部 前川 進教授、内藤親彦教授に対し、深く感謝する。農林水産省、畜産試験場 永井 卓博士、家畜衛生試験場 久保正法博士には研究の遂行上絶大なる御協力を頂いた。ここに記して謝意を表する。

さらに、有意義な助言を頂いた農学部附属農場 楠比呂志助手、実験を行うにあたり、絶大なる御協力を頂いた家畜繁殖学教室の諸先輩、大学院生、専攻生各位に心から謝意を表する。

最後に、私を終始暖かく励ましてくれた私の家族と私の友人すべてに心から感謝する。

引用文献

- 1) Gosden, R.G. & Telfer, E. (1987) Numbers of follicles and oocytes in mammalian ovaries and their allometric relationships. *J.Zool.Lond.*, 211, 169-175.
- 2) Eppig, J.J. (1977) Mouse oocyte development in vitro with various culture systems. *Dev.Biol.*, 60, 371-388.
- 3) 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. *Biol.Reprod.*, 41, 268-276.
- 4) Daniel, S.A.J., Armstrong, D.T. & Gore-Langton, R.E. (1989) Growth and development of rat oocytes in vitro. *Gamete Res.*, 24, 109-121.
- 5) Byskov, A.G. (1982) Primordial germ cells and regulation of meiosis. In: *Reproduction in Mammals* (Austin, C.R. & Short, R.V. eds). Vol.1, Germ cells and fertilization, pp.1-16, Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- 6) Bakken, A.H. & McClanahan, M. (1978) Patterns of RNA synthesis in early meiotic prophase oocytes from fetal mouse ovaries. *Chromosoma*, 67, 21-40.
- 7) Evans, C.W., Robb, D.I., Tuckett, F. & Challoner, S. (1982) Regulation of meiosis in the foetal mouse gonad. *J.Embryol.exp.Morph.*, 68, 59-67.
- 8) Borum, K. (1961) Oogenesis in the mouse. A study of the meiotic prophase. *Exp.Cell Res.*, 24, 495-507.
- 9) Speed, R.M. (1982) Meiosis in the foetal mouse ovary. I. An analysis at the light microscope level using surfase-spreading. *Chromosoma*, 85, 427-437.
- 10) Bachvarova, R., Burns, J.P., Spiegelman, I., Choy, J. & Chaganti, R.S.K. (1982) Morphology and transcriptional activity of mouse oocyte chromosomes. *Chromosoma*, 86, 181-196.
- 11) 宮野 隆, 平尾 雄二, 加藤征史郎, 荻田淳. (1988) マウス卵巣における卵母細胞の発達と透明帯の形成. *家畜繁殖誌*, 34, 61-66.
- 12) Byskov, A.G., Skakkebæk, N.E., Stafanger, G. & Peters, H. (1977) Influence of ovarian surface epithelium and rete ovarii on follicle formation. *J.Anat.*, 123, 77-86.
- 13) Baker, T.G. (1963) A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc.Roy.Soc.Lond.(Biol.)*, 158, 417-433.
- 14) Burgoyne, P.S. & Baker, T.G. (1981) Oocytes depletion in XO mice and their XX sibs from 12 to 200 days post partum. *J.Reprod.Fert.*, 61, 207-212.
- 15) Ohno, S. & Smith, J.B. (1964) Role of fetal follicular cells in meiosis of mammalian oocytes. *Cytogenetics*, 3, 324-333.
- 16) Faddy, M.J., Jones, E.C. & Edwards, R.G. (1976) An analytical model for ovarian follicle dynamics. *J.Exp.Zool.*, 197, 173-186.
- 17) Beaumont, H.M. & Mandl, A.M. (1962) A quantitative and cytological study of oogonia and oocytes in the foetal and neonatal rat. *Proc.Roy.Soc.Lond.(Biol.)*, 155, 557-579.
- 18) Wassarman, P.M. (1988) The mammalian ovum. In: *The Physiology of Reproduction* (Knobil, E., Neill, J. et al., eds). Vol.1, pp.69-102, Raven Press, New York.

- 19) Baker, T.G. (1982) Oogenesis and ovulation. In: *Reproduction in Mammals* (Austin, C.R. & Short, R.V., eds). Vol. 1, Germ cells and Fertilization, pp. 17-45, Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- 20) Dullaart, J., Kent, J. & Ryle, M. (1975) Serum gonadotrophin concentrations in infantile female mice. *J. Reprod. Fert.*, 43, 189-192.
- 21) Rao, M.C., Midgley, A.R., Jr. & Richards, J.S. (1978) Hormonal regulation of ovarian cellular proliferation. *Cell*, 14, 71-78.
- 22) Hirshfield, A.N. (1985) Comparison of granulosa cell proliferation in small follicles of hypophysectomized, prepubertal, and mature rats. *Biol. Reprod.*, 32, 979-987.
- 23) Fainstat, T. (1968) Organ culture of postnatal rat ovaries in chemically defined medium. *Fert. Steril.*, 19, 317-338.
- 24) Buccione, R., Cecconi, S., Tatone, C., Mangia, F. & Colonna, R. (1987) Follicle cell regulation of mammalian oocyte growth. *J. Exp. Zool.* 242, 351-354.
- 25) 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. *J. Reprod. Fert.*, 92, 197-207.
- 26) 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. *Dev. Biol.*, 119, 313-321.
- 27) Honn, K.V., Singley, J.A. & Chavin, W. (1975) Fetal bovine serum: a multivariate standard (38804). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 149, 344-347.
- 28) 宮野 隆, 平尾 雄二, 加藤 征史郎, 荻田 淳 (1988) 器官培養マウス卵巣における卵母細胞の発達, *日本畜産学会報*, 59, 848-853.
- 29) Anderson, E. & Albertini, D.F. (1976) Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *J. Cell Biol.*, 71, 680-686.
- 30) Heller, D.T., Cahill, D.M. & Schultz, R.M. (1981) Biochemical studies of mammalian oogenesis: metabolic cooperativity between granulosa cells and growing mouse oocytes. *Dev. Biol.*, 84, 455-464.
- 31) Brower, P.T. & Schultz, R.M. (1982) Intercellular communication between granulosa cells and mouse oocytes: existence and possible nutritional role during oocyte growth. *Dev. Biol.*, 90, 144-153.
- 32) Hardy, B., Danon, D., Eshkol, A. & Lunenfeld, B. (1974) Ultrastructural changes in the ovaries of infant mice deprived of endogenous gonadotrophins and after substitution with FSH. *J. Reprod. Fert.*, 36, 345-352.
- 33) Amsterdam, A., May, J.V. & Schomberg, D.W. (1988) Synergistic effect of insulin and follicle-stimulating hormone on biochemical and morphological differentiation of porcine granulosa cells in vitro. *Biol. Reprod.*, 39, 379-390.
- 34) Bleil, J.D. & Wassarman, P.M. (1980) Synthesis of zona pellucida proteins by denuded and follicle-enclosed mouse oocytes during culture in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 1029-1033.
- 35) Léveillé, M.C., Roberts, K.D., Chevalier, S., Chapdelaine, A. & Bleau, G. (1987) Formation of the hamster zona pellucida in relation to ovarian

- differentiation and follicular growth. *J.Reprod.Fert.*, 79, 173-183.
- 36) Wassarman, P.M. (1988) Zona pellucida glycoproteins. *Ann.Rev.Biochem.*, 57, 415-442.
 - 37) Arendsen de Wolff-Exalto, E. (1982) Influence of gonadotrophins on early follicle cell development and early oocyte growth in the immature rat. *J.Reprod.Fert.*, 66, 537-542.
 - 38) Smith, S.S. & Ojeda, S.R. (1986) Neonatal release of gonadotrophins is essential for development of ovarian follicle-stimulating hormone receptors. *Biol.Reprod.*, 34, 219-227.
 - 39) 佐藤英明, 宮本庸平 (1988) マウス卵母細胞の体外培養, とくに卵母細胞の減数分裂再開能力について. *Exp.Anim.*, 37, 231-238.
 - 40) Pincus, G. & Enzmann, E.V. (1935) The comparative behaviour of mammalian eggs in vivo and in vitro. I. The activation of ovarian eggs. *J.Exp.Med.*, 62, 665-675.
 - 41) Edwards, R.G. (1965) Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, 208, 349-351.
 - 42) Sorensen, R.A. & Wassarman, P.M. (1976) Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev.Biol.*, 50, 531-536.
 - 43) Bedford, J.M. (1982) Fertilization. In: *Reproduction in Mammals Vol.1. Germ cells and Fertilization.* (Austin, C.R. & Short, R.V., eds) pp.128-163. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
 - 44) Kaufman, M.H. (1982) The chromosome complement of single-pronuclear haploid mouse embryos following activation by ethanol treatment. *J.Embryol.exp. Morph.*, 71, 139-154.
 - 45) Schroeder, A.C. & Eppig, J.J. (1984) The developmental capacity of mouse oocytes that matured spontaneously in vitro is normal. *Dev.Biol.*, 102, 493-497.
 - 46) Eppig, J.J. (1985) Oocyte-somatic cell interactions during oocyte growth and maturation in the mammal. In: *Developmental Biology* (Browder, L.W., ed). Vol. 1, Oogenesis. pp.313-347, Plenum press, New York.
 - 47) Larsen, W.J., Wert, S.E. & Brunner, G.D. (1986) A dramatic loss of cumulus cell gap junctions is correlated with germinal vesicle breakdown in rat oocytes. *Dev.Biol.*, 113, 517-521.
 - 48) Cran, D.G. & Moor, R.M. (1990) Programming the oocyte for fertilization. In: *Fertilization in Mammals* (Bavister, B.D., Cummins, J. & Roldan, E.R.S., eds). pp.35-47, Serono Symposia, Massachusetts, USA.
 - 49) Motlik, J. & Kubelka, M. (1990) Cell-cycle aspects of growth and maturation of mammalian oocytes. *Mol.Reprod.Dev.*, 27, 366-375.
 - 50) Sorensen, R.A., Cyert, M.S. & Pederson, R.A. (1985) Active maturation-promoting factor is present in mature mouse oocytes. *J.Cell Biol.*, 100, 1637-1640.
 - 51) Hashimoto, N. & Kishimoto, T. (1988) Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation-promoting factor during mouse oocyte maturation. *Dev.Biol.*, 126, 242-252.
 - 52) Choi, T., Aoki, F., Mori, M., Yamashita, M., Nagahama, Y. & Kohmoto, K. (1991) Activation of p34^{cdc2} protein kinase activity in meiotic and mitotic cell

- cycles in mouse oocytes and embryos. *Development*, 113, 789-795.
- 53) Kobayashi, H., Golsteyn, R., Poon, R., Stewart, E., Gannon, J., Minshull, J., Smith, R. & Hunt, T. (1991) Cyclins and their partners during *Xenopus* oocyte maturation. In: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Vol. LVI, *The Cell Cycle*. pp.437-447, The Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
 - 54) Wassarman, P.M., Schultz, R.M. & Letourneau, G.L. (1979) Protein synthesis during meiotic maturation of mouse oocytes: synthesis and phosphorylation of a protein localized in the germinal vesicle. *Dev. Biol.*, 69, 94-107.
 - 55) Bornslaeger, E.A., Mattei, P. & Schultz, R.M. (1986) Involvement of cAMP-dependent protein kinase and protein phosphorylation in regulation of mouse oocyte maturation. *Dev. Biol.*, 114, 453-462.
 - 56) Bornslaeger, E.A., Mattei, P.M. & Schultz, R.M. (1988) Protein phosphorylation in meiotically competent and incompetent mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 1, 19-25.
 - 57) Wassarman, P.M., Josefowicz, W.J. & Letourneau, G.E. (1976) Meiotic maturation of mouse oocytes in vitro: inhibition of maturation at specific stages of nuclear progression. *J. Cell Sci.*, 22, 531-545.
 - 58) Canipari, R., Palombi, F., Riminucci, M. & Mangia, F. (1984) Early programming of maturation competence in mouse oogenesis. *Dev. Biol.* 102, 519-524.
 - 59) Eppig, J.J. (1989) The participation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in the regulation of meiotic maturation of oocytes in the laboratory mouse. *J. Reprod. Fert., Suppl.*, 38, 3-8.
 - 60) Schultz, R.M., Montgomery, R.R. & Belanoff, J.R. (1983) Regulation of mouse oocyte meiotic maturation: implication of a decrease in oocyte cAMP and protein dephosphorylation in commitment to resume meiosis. *Dev. Biol.*, 97, 264-273.
 - 61) Cho, W.K., Stern, S. & Biggers, J.D. (1974) Inhibitory effect of dibutyryl cAMP on mouse oocyte maturation in vitro. *J. Exp. Zool.*, 187, 383-386.
 - 62) Eppig, J.J., Freter, R.R., Ward-Bailey, P.F. & Schultz, R.M. (1983) Inhibition of oocyte maturation in the mouse: participation of cAMP, steroid hormones, and a putative maturation-inhibitory factor. *Dev. Biol.*, 100, 39-49.
 - 63) Sato, E. & Koide, S.S. (1984) Forskolin and mouse oocyte maturation in vitro. *J. Exp. Zool.*, 230, 125-129.
 - 64) Racowsky, C. (1984) Effect of forskolin upon the spontaneous maturation and cyclic AMP content of rat oocyte-cumulus complexes. *J. Exp. Zool.*, 72, 107-116.
 - 65) Racowsky, C. (1985) Effect of forskolin on the spontaneous maturation and cyclic AMP content of hamster oocyte-cumulus complexes. *J. Exp. Zool.*, 234, 87-96.
 - 66) Downs, S.M., Daniel, S.A.J., Bornslaeger, E.A., Hoppe, P.C. & Eppig, J.J. (1989) Maintenance of meiotic arrest of in mouse oocytes by purines: modulation of cAMP levels and cAMP phosphodiesterase activity. *Gamete. Res.*, 23, 323-334.
 - 67) Downs, S.M., Coleman, D.L. & Eppig, J.J. (1986) Maintenance of murine oocyte meiotic arrest: uptake and metabolism of hypoxanthine and adenosine by

- cumulus cell-enclosed and denuded oocytes. *Dev.Biol.*, 117, 174-183.
- 68) Masui, Y. & Markert, C.L. (1971) Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J.Exp.Zool.*, 177, 129-146.
 - 69) Sagata, N., Watanabe, N., Vande Woude, G.F. & Ikawa, Y. (1989) The c-mos proto-oncogene product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. *Nature*, 342, 512-518.
 - 70) Paules, R.S., Buccione, R., Moschel, R.C., Vande Woude, G.F. & Eppig, J.J. (1989) Mouse Mos protooncogene product is present and functions during oogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 86, 5395-5399.
 - 71) 豊田 裕, 横山峯介, 星 冬四郎 (1971) マウス卵子の体外受精. I. 精巢上体精子による受精成績. *家畜繁殖誌*, 16, 147-151.
 - 72) Felici, M.D. & Siracusa, G. (1982) "Spontaneous" hardening of the zona pellucida of mouse oocytes during in vitro culture. *Gamete Res.*, 6, 107-113.
 - 73) Felici, M.D. Salustri, A. & Siracusa, G. (1985) "Spontaneous" hardening of the zona pellucida of mouse oocytes during in vitro culture. II. The effect of follicular fluid and glycosaminoglycans. *Gamete Res.*, 12, 227-237.
 - 74) Downs, S.M., Schroeder, A.C. & Eppig, J.J. (1986) Serum maintains the fertilizability of mouse oocytes matured in vitro by preventing hardening of the zona pellucida. *Gamete Res.*, 15, 115-122.
 - 75) Choi, T.S., Mori, M., Kohmoto, K. & Shoda, Y. (1987) Beneficial effect of serum on the fertilizability of mouse oocytes matured in vitro. *J.Reprod.Fert.*, 79, 565-568.
 - 76) Thibault, C. (1977) Are follicular maturation and oocyte maturation independent processes? *J.Reprod.Fert.*, 51, 1-15.
 - 77) Wassarman, P.M. (1987) The biology and chemistry of fertilization. *Science*, 235, 553-560.
 - 78) Cherr, G.N. & Ducibella, T. (1990) Activation of the mammalian egg: cortical granule distribution, exocytosis, and the block to polyspermy. In: *Fertilization in Mammals* (Bvister, B.D., Cummins, J. & Roldan, E.R.S., eds), pp.309-330, Serono Symposia, Massachusetts, USA.
 - 79) Gulyas, B.J. (1980) Cortical granules of mammalian eggs. *Int.Rev.Cytol.*, 63, 357-392.
 - 80) Nagai, T., Niwa, K. & Iritani, A. (1984) Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization in vitro of pig follicular oocytes. *J.Reprod.Fert.*, 70, 271-275.
 - 81) Mattioli, M., Galeuti, G. & Seren, E. (1988) Effects of follicle somatic cells during pig oocytes maturation on egg penetrability and male pronucleus formation. *Gamete Res.*, 20, 177-183.
 - 82) O'Neill, G.T. & Kaufman, M.H. (1986) Influence of postovulatory aging on chromosome segregation during the second meiotic division in mouse oocytes: a parthenogenetic analysis. *J.Exp.Zool.*, 248, 125-131.
 - 83) Webb, M., Howlett, S.K. & Maro, B. (1988) Parthenogenesis and cytoskeletal organization in ageing mouse eggs. *J.Embryol.exp.Morphol.*, 95, 131-145.
 - 84) Moor, R.M., Mattioli, M., Ding, J. & Nagai, T. (1990) Maturation of pig

- oocytes in vivo and in vitro. *J.Reprod.Fert.,Suppl.*, 40, 197-210.
- 85) Motlik, J., Crozet, N. & Fulka, J. (1984) Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J.Reprod.Fert.*, 72, 323-328.
 - 86) Greenwald, G. S. & Moor, R. M. (1989) Isolation and preliminary characterization of pig primordial follicles. *J.Reprod.Fert.*, 87, 561-571.
 - 87) Lazzari, G., Galli, C. & Moor, R. M. (1992) Centrifugal elutriation of porcine oocytes isolated from the ovaries of newborn piglets. *Anal.Biochem.*, 200, 31-35.
 - 88) Torrance, C., Telfer, E. & Gosden, R. G. (1989) Quantitative study of the development of isolated mouse pre-antral follicles in collagen gel culture. *J.Reprod.Fert.*, 87, 367-374.
 - 89) Freshney, R. I. (1987) Three dimensional culture systems. In: *Culture of Animal Cells*. pp.297-307, Alan R. Liss, Inc., New York.
 - 90) McNatty, K. P., Bennie, J. G., Hunter, W. M. & McNeilly, A. S. (1975) The effects of antibodies to human gonadotrophins on the viability and rate of progesterone secretion by human granulosa cells in tissue culture. In: *Physiological Effects of Immunity against Reproductive Hormones* (Edwards, R. G. & Johnson, M. H., eds). pp.41-66, Cambridge Univ. Press, Cambridge.
 - 91) McNatty, K. P. (1978) Follicular fluid. In: *The Vertebrate Ovary*. (Jones, R. E., ed). pp.215-259, Plenum Press, New York.
 - 92) Roy, S. K. & Greenwald, G. S. (1989) Hormonal requirements for the growth and differentiation of hamster preantral follicles in long-term culture. *J. Reprod.Fert.*, 87, 103-114.
 - 93) Nayudu, P. L. & Osborn, S. M. (1992) Factors influencing the rate of preantral and antral growth of mouse ovarian follicles in vitro. *J.Reprod.Fert.*, 95, 349-362.
 - 94) Gore-Langton, R. E. & Daniel, S. A. J. (1990) Follicle-stimulating hormone and estradiol regulate antrum-like reorganization of granulosa cells in rat preantral follicle cultures. *Biol.Reprod.*, 43, 65-72.
 - 95) Goldenberg, R. L., Vaitukatis, J. L. & Ross, G. T. (1972) Estrogen and follicle stimulating hormone interactions on follicle growth in rats. *Endocrinology*, 90, 1492-1498.
 - 96) Gore-Langton, R. E. & Armstrong, D. T. (1988) Follicular steroidogenesis and its control. In: *The Physiology of Reproduction* (Knobil, E. & Neil, J. et al., eds). Vol.1, pp.331-385, Raven Press, New York.
 - 97) Tsafiriri, A. & Channing, C. P. (1975) An inhibitory influence of granulosa cells and follicular fluid upon porcine oocyte meiosis in vitro. *Endocrinology*, 96, 922-927.
 - 98) Channing, C. P. & Tsafiriri, A. (1975) Regulation of ovulatory processes: ovum maturation, follicular rupture and luteinization. In: *Advances in Fertility Regulation through Basic Research* (Sadler, W. A. & Segal, S., eds), Plenum, press, New York.
 - 99) Fulka, J., Jr., Motlik, J. Fulka, J. & Jilek, F. (1986) Effect of cycloheximide on nuclear maturation of pig and mouse oocytes. *J.Reprod. Fert.*, 77, 281-285.

- 100) Motlik, J., Nagai, T. & Kikuchi, K. (1991) Resumption of meiosis in pig oocytes cultured with cumulus and parietal granulosa cells: the effect of protein synthesis inhibition. *J. Exp. Zool.*, 259, 386-391.
- 101) Toyoda, Y. & Chang, M. C. (1974) Fertilization of rat eggs in vitro by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer. *J. Reprod. Fert.*, 36, 9-22.
- 102) Prochazka, R., Motlik, J. & Fulka, J. (1989) Activity of maturation promoting factor in pig oocytes after microinjection and serial transfer of maturing cytoplasm. *Cell Differ. Dev.*, 27, 175-182.
- 103) Naito, K. & Toyoda, Y. (1991) Fluctuation of histone H1 kinase activity during meiotic maturation in porcine oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 93, 467-473.
- 104) Brackett, B. G. & Oliphant, G. (1975) Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.*, 12, 260-274.
- 105) Nagai, T., Takahashi, T., Masuda, H., Shioya, Y., Kuwayama, M., Fukushima, M., Iwasaki, S. & Hanada, A. (1988) In-vitro fertilization of pig oocytes by frozen boar spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 84, 585-591.
- 106) Perreault, S. D. (1990) Regulation of sperm nuclear reactivation during fertilization. In: *Fertilization in Mammals* (Bavister, B. D., Cummins, J. & Roldan, E. R. S., eds). pp. 285-296, Serono Symposia, Massachusetts, USA.
- 107) Perreault, S. D., Barbee, R. R., Elstein, K. H., Zucker, R. M. & Keefer, C. L. (1988) Interspecies differences in the stability of mammalian sperm nuclei assessed in vivo by sperm micro-injection and in vitro by flow cytometry. *Biol. Reprod.* 39, 157-167.