



# 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。



氏名・(本籍)	平尾雄二	(岡山県)
博士の専攻分野の名称	博士(農学)	
学位記番号	博い第11号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成5年3月31日	
学位論文題目	哺乳類卵母細胞の体外発育に関する研究	

審査委員	主査 教授	加藤 征史郎
	教授	前川 進 教授 内藤 親彦

### 論文内容の要旨

幼若哺乳類の卵巣内には、数万ないし数十万個にも上る未発育卵母細胞が含まれているが、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。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、その形成機構の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。

この研究は、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、マウス発育途上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、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究明したものである。

第1章では、哺乳類の卵母細胞の体外発育培養技術の現状とその意義について説明している。

第2章では、体内におけるマウス卵母細胞の発育過程を明らかにする目的で、胎子期から幼若齢に至るマウスの卵母細胞の形成および発育について検討した。その結果、妊娠16日齢までに減数分裂を開始し、出生直後ではディプロテン期に達していることを確認した。また、出生後の日齢の経過とともに卵母細胞の直径は増大し、一部は18日齢までに発育の最終段階である直径70 $\mu$ m以上となることを見出した。

第3章では、発育途上マウス卵母細胞の体外培養について検討している。まず、出生直後のマウス卵巣を8日間器官培養し、卵母細胞の直径は当初の20 $\mu$ mから40 $\mu$ mへと増大すること、PMSG(10~50IU/ml)は卵母細胞の発育および透明帯の形成を促進することを明らかにした。ついで、10

日齢マウス卵巣から得た発育途上卵母細胞を用いて卵母細胞を最終段階まで体外で発育させる培養条件を検討した。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を培養液小滴中で個々に培養した場合、裸化卵母細胞は発育することなく退行するが、無処理あるいは寒天処理の培養皿内では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 $\mu$ m以上へと発育することを見出した。

第4章では、体外発育マウス卵母細胞の成熟能力および受精能力について検討している。体外発育卵母細胞を用いて成熟培養を行い、体内発育卵母細胞とほぼ同様の時間経過で卵核胞崩壊および第1極体の放出が起こることを認めた。また、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た結果、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が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ほぼ同じ発育段階で成熟能力を獲得すると結論した。さらに、体外発育・成熟卵母細胞に媒精した結果、その72%が受精し、そのうち87%で雄性前核が認められたこと、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ことから、正常な受精能力を具備すると考えられた。

第5章では、ブタ卵母細胞の体外発育の可能性について追究している。ブタ卵巣から発育途上卵母細胞を含む細胞を分離し、コラーゲンゲルに包埋して4日間培養した結果、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、その割合はFSH添加により高められることを明らかにした。また、直径70.0~89.5 $\mu$ mの発育途上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日間培養した結果、30~40%の卵母細胞は生存性を維持し、一部は直径115 $\mu$ m以上へと発育すること、卵胞内に卵胞腔が形成されること、卵丘細胞と卵母細胞との結合が維持されることなどを認め、ブタ卵母細胞は体外でも最終段階まで発育可能であると結論した。

第6章では、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検討している。体外発育ブタ卵母細胞について成熟培養を行った結果、直径90 $\mu$ m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に伴って増加し、直径110 $\mu$ m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。また、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ることを示し、ブタ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説明した。さらに、体外で発育、成熟させたブタ卵母細胞に媒精し、精子侵入が可能であることを見出した。侵入精子の頭部の膨化は不十分で、第2極体も放出されなかったが、雌性前核形成が認められたことから、成熟培養法の改善により正常受精が可能になると考えられた。

第7章では、以上の結果を総括した。

## 論文審査の結果の要旨

出生後間もない哺乳類の卵巣内には、莫大な数の未発育卵母細胞が含まれている。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し、あるいは雌個体の死とともに消滅するから、卵母

細胞の利用効率は極めて低い。このような未発育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卵子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。この研究は、発育途上卵母細胞の発育培養系の確立を目的として、まず、マウスで発育培養法や、培養により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、ついで、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究明したものである。

まず、体内におけるマウス卵母細胞の発育過程を明らかにする目的で、胎子期および幼若齢マウスの卵母細胞の形状および発育について検討し、その結果、卵母細胞は妊娠16日齢までに減数分裂を開始し、出生直後にはディプロトン期に達すること、日齢の経過とともに直径が増大し、一部は18日齢までに発育を完了することを明らかにしている。ついで出生直後のマウス卵巣を8日間器官培養し、卵母細胞の直径は当初の20 $\mu$ mから40 $\mu$ mへと増大することや、PMSGは卵母細胞の発育および透明帯の形成を促進することなどを認めている。また、10日齢マウス卵巣から得た発育途上卵母細胞と顆粒膜細胞との複合体(OGC)を培養液小滴中で個々に培養すると、卵母細胞は発育することなく退行するが、多数のOGCを無処理あるいは寒天処理の培養皿内に移して培養すれば最終段階まで発育することなどを確認している。体外発育卵母細胞の成熟能力については、体内発育卵母細胞とほぼ同様の時間経過で卵核胞崩壊および第1極体の放出が起こることや、体外発育卵母細胞の発育段階と成熟能力との関係が体内でのそれとよく一致することを認め、マウス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としている。さらに、体外発育・成熟卵母細胞で体外受精を試みた結果、対照の排卵卵子と同等の高い正常受精率を得たことから、それらは正常な受精能力を具備すると結論している。

つぎに、ブタ卵母細胞の体外発育の可能性について検討し、卵巣から分離した発育途上卵母細胞をコラーゲンゲルに包埋して、FSHを含む培養液中で12日~16日間培養すると、その一部は直径115 $\mu$ m以上へと発育すること、卵胞内に卵胞腔が形成されること、卵丘細胞と卵母細胞との結合も維持されることなどを示し、体外でも最終段階まで発育可能であると結論している。また、体外発育卵母細胞の成熟能力および受精能力については、直径90 $\mu$ m以上の体外発育卵母細胞で卵核胞崩壊が認められ、その割合は直径の増大に伴って増加すること、直径110 $\mu$ m以上の卵母細胞では40%が第II減数分裂中期へと成熟することを明らかにするとともに、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説明している。さらに、体外発育・成熟卵母細胞に媒精した結果、侵入精子の頭部の膨化は不十分であったが、雌性前核の形成が認められたことから、成熟培養法の改善により正常受精が可能になると推定している。

以上の如く、本研究は、家畜繁殖学分野における新しい課題に取り組み、卵子形成機構に関する基礎的知見を加えたものであるが、同時に未発育卵母細胞の有効利用の可能性を示唆するなど、実用的な意義も深い。よって、学位申請者平尾雄二は、博士(農学)の学位を得る資格があると認める。