

牛初期胞状期卵胞の発育培養方法の違いが体外受精後の発生率に及ぼす影響について

福見 善之, 笠井 裕明, 立川 進

要 約

優良資源を有効活用することを目的に、従来廃棄されていた牛卵巢から発育途上の初期胞状期卵胞を採取し、2種類の発育培養法（コラーゲン・ゲル包埋法：試験区1・開放型PVP法：試験区2）の違いが卵子の成熟率及び体外受精後の発生率に及ぼす影響について比較検討した。

発育途上卵胞の採取は、アスピレーション終了後の卵巢から直径0.5～1.0mmの初期胞状期卵胞を取り出し、25Gの注射針により卵胞から卵母細胞・顆粒膜細胞複合体を機械的に取り出した。試験区1では採取された卵母細胞・顆粒膜細胞複合体をコラーゲン・ゲルに包埋し、4mMヒポキサンチンを添加したTCM199の培養液で38.5℃、5%CO₂、95%airの気相条件で14日間培養した。試験区2では試験区1と同様に採取した卵母細胞・顆粒膜細胞複合体をコラーゲンコートをした培養インサート上で5%FCS、4mMヒポキサンチンを含むTCM199に4%PVPを添加した培養液で試験区1と同様の気相条件・培養期間で培養した。

そして、2種類の成熟培養液（IVMD101：機能性ペプチド研、20%FCS - TCM199）で22～24時間成熟培養し、核相の観察（成熟率）及び体外受精後の発生率について比較検討した。

結果、成熟率においては、試験区1・2共に供試卵子の約半数近くが第Ⅱ減数分裂中期まで成熟し、試験区1のコラーゲン・ゲル - IVMDの培養区が成熟率46%（23/50）と最も高かった。また、体外受精後の発生率においては、試験区2（開放型PVP - IVMD）において8.0%（4/50）と他の区に比べて高い発生率であった。

1 目 的

現在、牛卵巢から採取した発育途上の卵母細胞を体外で2週間培養して発育・成熟させた後、体外で受精し初期胚まで発生させ、別の雌牛の子宮内に移植することにより子牛を生産させることに成功している^{1), 2)}。

しかし、現在、牛の改良は大量に入手が容易な精子で進められており、入手困難な卵子は殆ど利用されていないのが現状である。

そこで、卵巢中に存在する大量の卵母細胞の有効活用による良質体外受精卵の大量供給を目的に、従来廃棄されていた牛卵巢から発育途上の初期胞状期卵胞を採取し、体外発育培養（コラーゲン・ゲル包埋法、東北農業研究センターにより開発された開放型培養法⁴⁾）を行い、その培養方法の違いが体外受精後の発生率に及ぼす影響について比較検討した。

2 材料及び方法

(1) 初期胞状期卵胞の採取

食肉センターで得られた牛卵巢を抗生物質を添加した生理食塩水で2回洗浄し、HEPESを添加したTCM199液に卵巢を移し、薄く切り出した卵巢皮質から直径0.5～1.0mmの卵胞をメスを用いて採取した。

そして、取り出した卵胞から2本の精密ピンセットを用いて卵胞を破らないように慎重に付着した余分な組織を剥離し、不規則な外形あるいは内部に退行の兆候を示す卵胞を除いた後、25Gの針により採取した卵胞から卵母細胞・顆粒膜細胞複合体を採取し、次の方法により発育培養に供試した。

(2) 発育培養方法

1) コラーゲン・ゲル包埋法

得られた卵母細胞・顆粒膜細胞複合体をHEPES

添加 TCM199 液で数回洗浄した後、35mm ディッシュを用い、0.3% コラーゲン酸性溶液 (Cellmatrix-Type1:Gelatine, Ltd, Osaka JAPAN)、10 倍濃度の TCM199 液、22mg/ml 炭酸水素ナトリウムと 47.7mg/ml HEPES を含む 0.05N 水酸化ナトリウム溶液を 8:1:1 の割合で混合して調整したコラーゲン・ゲル溶液内に 10 ~ 15 個包埋後、38.5°C のインキュベーター中で 15 分間加温し、コラーゲンをゲル化した。次に、4mM ヒポキサンチン、ピルビン酸を含む TCM199 をこのディッシュに 4ml 注ぎ、38.5°C、5% CO₂、95% air の気相条件下で 14 日間発育培養した。

2) 開放型培養法

採取した卵丘細胞・顆粒膜細胞複合体は 1) の方法と同様に HEPES 添加 TCM199 液で数回洗浄した後、コラーゲンコートをした培養インサート上 (Bio cell culuture inserts # 3544:Falcon) で 38.5°C、5% CO₂、95% air の気相条件下で 14 日間発育培養した。培養液には東北農業研究センターにより開発された 5% 牛胎子血清、4mM ヒポキサンチンを含む TCM199 に、4% PVP (平均分子量 36 万:SIGMA) を添加したものを使用した。

1)、2) の方法により培養 14 日後に顆粒膜細胞に包まれた状態の卵母細胞を回収し、2 種類の成熟培養液 (IVMD:機能性ペプチド研、20%FCS - 199) で体外成熟・受精を行い、胚盤胞期胚への発生率について比較検討した。

(3) 卵母細胞の固定・染色観察

卵母細胞の固定及び染色は、卵母細胞をスライドガラス上にホルマウントし、酢酸:エタノール (1:3) 中で 48 時間以上かけて脱脂、固定した。その後、1% アセトオルインで染色して染色体及び核小体の形態を微分干渉顕微鏡 (× 400) で観察した。染色体の状態から卵母細胞を FC 期 (Filamentous Chromatin 期)、SC 期 (Stringy Chromatin 期)、GV 期 (卵核胞期)、ED-LD 期 (移動期)、M I 期 (第 I 減数分裂中期)、M II 期 (第 II 減数分裂中期) に分類した。また、染色体

の凝縮が進んでいないが核膜が崩壊している卵母細胞、細胞質の希薄化や縮小が認められる卵母細胞を退行卵母細胞と判定した。

3 結 果

コラーゲン・ゲル及び開放型 PVP により 14 日間発育培養した卵母細胞・顆粒膜細胞複合体を 2 種類の成熟培養液 (IVMD, 20% FCS - 199) で成熟培養し、体外受精を行った成績を表 1 に示した。結果、試験区 2 の開放型 PVP - IVMD 区において 8.0% (4/50) と他の区に比べて高い発生率であった。

表 1 発育培養方法別における体外受精成績

試 験 区	試験区 1		試験区 2	
発育培養法	コラーゲン・ゲル		開放型 PVP	
供試卵母細胞数	64	52	58	60
培養期間	14	14	14	14
成熟培養法	IVMD	199	IVMD	199
供試卵子数	52	46	50	48
分割卵数	10	12	20	16
分割率 (%)	20	26.1	40	33.3
発生卵数	1	1	4	2
発生率 (%)	2	2.2	8	4

次に、2 種類の発育培養法により発育した卵母細胞を更に 2 種類の成熟培養液により成熟培養を行い、核相を観察した成績を表 2 に示した。

結果、各区共に若干の卵核胞期の核相が観察されたものの、試験区 1・2 において供試卵母細胞の約半数近くが第 II 減数分裂中期まで成熟し、試験区 1 のコラーゲン・ゲル - IVMD の培養区が成熟率 46% (23/50) と最も高かった。

表 2 発育・成熟培養法別における核相成績

試 験 区	試験区 1		試験区 2	
発育培養法	コラーゲン・ゲル		開放型 PVP	
供試卵母細胞数	50	50	50	50
培養期間	14	14	14	14
成熟培養法	IVMD	199	IVMD	199

試 験 区	試験区 1		試験区 2	
卵核胞期 (%)				
FC 期	0	1(2)	0	1(2)
SC 期	0	0	0	0
GV 期	2(4)	1(2)	8(16)	5(10)
卵核胞崩壊後 (%)				
ED 期	0	0	0	0
LD 期	1(2)	0	4(8)	7(14)
M I 期	24(48)	25(50)	15(30)	18(36)
M II 期	23(46)	22(44)	18(36)	15(30)
異常卵母細胞数 (%)				
	0	0	3(6)	2(4)

4 考 察

これまでに、発育途上の卵母細胞を2週間にわたり発育・成熟培養し、成熟した卵子を作り、子牛の出生に至った例は、平成10年4月徳島県肉畜試験場（現在：徳島県立農林水産総合技術センター畜産研究所肉畜分場）と神戸大学との研究グループによる1頭が報告されているのみである^{1) 2)}。

しかし、昨年東北農業研究センターと機能性ペプチド研究所の共同研究チームは牛発育途上の卵母細胞の新しい培養システムを開発し、このシステムにより培養した卵母細胞を用いて体外受精を行い、作出された体外受精卵を別の雌牛に移植することにより子牛の生産に成功している⁴⁾。

そこで、前回（徳島畜研報 No. 2）の成績によりコラーゲン・ゲル内で発育した卵母細胞の成熟培養方法の違いが成熟率に及ぼす影響³⁾の結果を踏まえた上で、今回、新しく開発された開放型培養方法における成熟率及び発生率についてコラーゲン・ゲル包埋法と比較検討した結果、成熟率については前回の成績と変化は認められなかった。

しかし、体外受精後の発生率においては、低率

であるが試験区2の開放型 PVP - IVMD 区において他区に比べて高い発生率を示し、コラーゲン・ゲル包埋法で培養した卵母細胞と比較しても若干の卵母細胞の退行・裸化・不規則な凝集は認められたものの、完全な複合体としての高い回収率であった。

また、この方法は培養期間中の卵母細胞を取り巻く顆粒膜細胞の増殖の観察が容易に行え、培養環境の制御に優れていることが解った。

以上のことから、体外受精後の発生率について課題は残すものの、開放型 PVP による発育培養システムは牛初期胞状期卵胞の成長に有効であることが解った。

今後は、卵巣内に多数存在する卵母細胞の有効利用するために、効率的な採取方法、卵母細胞に有効な凍結保存技術について検討を行い、優れた遺伝形質を持つ成熟卵子の大量供給について取り組む予定である。

文 献

- 1) 山本 憲, 小山信幸, 堀北直樹, 音井 重 (1998) 牛の体外受精 (第19報) 徳島県肉畜試験場研究報告 26, 1~4.
- 2) 山本憲, 音井 重, 小山信幸, 立川 進 (1997) 牛の体外受精 (第17報) 徳島県肉畜試験場研究報告 25, 3~5
- 3) 福見善之, 笠井裕明, 片山正敏 (2002) 成熟培養方法の違いが牛体外発育培養後の初期胞状期卵胞由来卵子の成熟に及ぼす影響徳畜研報 2, 1~5
- 4) 平尾雄二, 伊藤丈洋, 志水 学, 伊賀浩輔, 星宏良, 竹之内直樹 (2003) 開放型培養システムによるウシ成長途上卵母細胞の体外成長 Journal Mammalian Ova Research Vo 1, 20 No2, April