

2013 年度

修士論文

ウシ体外成熟培養におけるプロジェステロン
添加が胚発生に及ぼす影響

*Effect of progesterone supplementation of
maturation medium on the development of
IVM-IVF-IVC bovine embryos*

21231011 庄司圭佑

指導教員 家畜繁殖学 教授 堂地 修
動物生殖学 教授 今井 敬

酪農学園大学大学院酪農学研究科

目 次

第 I 章 緒 論	1
第 II 章 ウシ IVM におけるプロジェステロン添加が卵子成熟 および胚発生に及ぼす影響	
第 1 節 緒 言	5
第 2 節 材料および方法	9
第 3 節 結 果	16
第 4 節 考 察	21
第 5 節 要 約	27

第Ⅲ章 総括	・・・・・・・・・・・・・・・・	29
謝辞	・・・・・・・・・・・・・・・・	32
引用文献	・・・・・・・・・・・・・・・・	33
英文要約	・・・・・・・・・・・・・・・・	40

第 I 章 緒 論

哺乳類の卵母細胞は卵巣内では第一減数分裂前期の複糸期で分裂を停止しており、体外培養により第一減数分裂中期へと成熟を再開する[32]。また、直径 2~6mm の卵胞から採取したウシ卵母細胞はすべて卵核胞期（以下 Germinal Vesicle ; GV）にあることが知られている[32]。ウシ体外受精における体外成熟培養（以下 IVM）は、未成熟卵子が受精可能な成熟卵子へと変化するために必要不可欠な培養である。

成熟卵子とは、卵母細胞が第一極体を放出することにより一次卵母細胞から二次卵母細胞へと発育したものを指し、卵母細胞の細胞質の成熟と卵丘細胞の膨化を伴う必要がある。

ウシ IVM では卵胞刺激ホルモン（以下 Follicle Stimulating Hormone ; FSH）を培養液に添加する 경우가多く、FSH が核成熟を促進させ、卵丘細胞からのヒアルロン酸分泌を刺激し、卵丘細胞の膨化促進および卵丘細胞の増殖やステロイド産生を促進している[2]。またヒトでは、FSH 以外にも LH や hCG といったホルモンを添加するケースが多いが、近年ではヒト IVM への hCG 添加は効果のないことが示されている[7]。

ヒトやブタの IVM では、卵丘細胞卵子複合体（以下 Cumulus-oocyte complexes ; COCs)の LH レセプターを FSH で誘導後に LH を添加し卵子成熟を促進させる [1、13]。このように、FSH や LH の組み合わせ、添加するタイミングおよび添加期間の検討が進んでいる [2]。それでもなお、多くの哺乳動物の卵子は、体外成熟、体外受精および体外発生（以下 IVM-IVF-IVC)を行うと種によって段階が異なるが、ある決まった段階で発生が停止する現象が起きるため [6、30]、当研究室でも IVC 後の胚盤胞発生率は 20～30% と低く、培養方法については更に検討が必要である。胚盤胞発生率の向上には卵母細胞の成熟が大きく関与しており、卵母細胞の成熟には卵丘細胞の有無が重要である。卵丘細胞は卵母細胞とギャップ結合を介し、栄養供給などの細胞間の連絡を保っていることから双方は密接な関係がある [24]。胚発生率を改善する一つの手段として、卵母細胞の培養法を改善する必要があると考えられる。

近年、ブタ卵子の体外受精では成熟培養液へのプロジェステロン（黄体ホルモン、以下 Progesterone ; P₄) を含む数種類のホルモン添加が成熟率および胚盤胞発生率の改善に有効であると報告されている [13]。宮田 [17、18] はウシ卵子の

成熟培養液に P_4 を添加すると受精後の胚発生が向上したと報告している。ウシ発情期にける血中 P_4 濃度は顆粒層細胞由来 P_4 の濃度上昇に伴い、LH（黄体形成ホルモン、以下 Luteinizing Hormone ; LH）サージ開始から 4~5 時間後に著しく上昇し、6~10 時間後に最高値となる [9]。そして LH サージ開始 24~30 時間後に排卵が起きる。さらに、卵丘細胞にはプロゲステロン膜レセプターが発現していること [20]、および川島 [13] や宮田 [17、18] の研究報告から、 P_4 は哺乳類の排卵周期における卵子成熟に大きく関わっていることが推察される。これらのことから、ウシおよびブタの IVM における P_4 添加は卵子成熟および受精後の胚発生の向上に効果があると考えられる。しかし、ブタ体外受精では生体内における P_4 が分泌する時期を検討した上で添加しているのに対し、ウシ体外受精 [17、18] では、分泌時期とは無関係に P_4 を添加しているため、内分泌学的に最適ではない可能性が考えられる。これらのことから、ウシ IVM でも P_4 の添加時期を検討した上で添加することにより、従来 of 培養方法よりも高い胚発生率を得られる可能性がある。

本研究ではウシ IVM の改善による体外受精胚の発生率の向上を目的とし、COCs を用いて、IVM における P_4 の適切な添加濃

度について検討するため、培養液内に各種濃度のP₄を添加し、IVM後の卵子成熟率、体外受精後の胚発生率および作出した胚を用いて細胞数を調査した。

第Ⅱ章 ウシ体外成熟培養におけるプロジェステロン添加が

卵子成熟および胚発生に及ぼす影響

第1節 緒言

IVMの至適培養条件を設定することは体外受精技術の課題の一つである[34]。ヒトに限らず、大型家畜においても体外成熟した卵子の受精後の発生能は体内成熟卵と比較して低いのが現状である[34]。その原因として、直径1cm以上に発育するヒトや大型家畜の卵胞は器官培養が困難なため、体外培養系においてCOCsを回収して培養しても、莢膜や顆粒膜細胞の分泌機能が欠けていることが挙げられる。また、体外培養に用いる卵子は、卵胞発育・成熟が誘導される以前の発育途上の卵胞腔から回収しているため、卵子自身や卵丘細胞の成熟準備が完了していないことも考えられる。排卵期には、卵胞内の内分泌環境の変化やそれに伴う卵丘細胞の機能的変化が生じることから、これらを体外で誘導する必要があるとされている[35]。排卵前未成熟卵子は卵胞内で成熟、発育することから未成熟卵子にとって生理的な体液は卵胞液だと考えられる。これまでの研究から卵胞液には、減数分裂活性化ステ

ロール[16]、ミッドカイン[11]およびレプチン[4]といった細胞質の成熟促進活性を示す物質が含まれていることが報告されている。これらのことから、IVM用の培養液も卵胞液組成に近づけることでその成績が向上する可能性があると考えられる[2]。

近年、ウシ生体内をモデルとしたIVMへの物質添加の様々な試みが行われており、その一つにホルモン添加が挙げられる。添加するホルモンの組み合わせ、添加時期および添加期間の検討が行われている[2]。ヒトやブタ卵子のIVMの際、COCsのLHレセプターをFSHで誘導後、LHを添加する段階的な培養法が試みられ、胚盤胞発生率向上が認められている[1、13]。また、筆者[27]の実験では、IVM開始5時間目に $1\mu\text{g/ml}$ の P_4 を添加した培地に卵子を移し換え体外受精後の胚発生を調べたところ、10時間目に添加した区に比べ胚盤胞発生率が有意に低かった。この理由はCOCsが P_4 に曝される時間が長かったために P_4 が減数分裂を開始させる成熟促進因子（以下 MPF； Maturation Promoting Factor）の活性化を起こすcell division cycle25ホスファターゼ（以下 Cdc25ホスファターゼ）の酵素活性[20]を失活させるという報告から説明できる。ネズミなどの小動物のCOCsの培養においては P_4 の添加が卵子

の成熟を促進させるが、ウシなどの大動物の場合は阻害作用を示す[23]。したがって、 P_4 濃度には至適範囲があり、濃度が高くて低くても卵子の成熟能は低下すると考えられ、添加濃度の設定はホルモンを添加する上で重要であると考えられる。ウシ生体内では、LHサーージ開始24～30時間後に排卵する。血中 P_4 濃度はLHサーージ開始から4～5時間後に著しく上昇し、6～10時間後に最高値となる[9]。発情期の P_4 平均値はおよそ0.79ng/mlであり、LHサーージ開始6～10時間後はおよそ1.1ng/mlと平均値に比べ高い値である。卵子成熟を誘起するLHサーージの開始に伴う P_4 濃度上昇は、 P_4 が卵子成熟と密接な関係にあることが示唆されている。性ステロイドホルモンである P_4 は顆粒層細胞において、コレステロールから共通的な中間体ステロイドであるプレグネノロンを経て生合成される[8]（図1-1）。したがって、コレステロールからプレグネノロンになり、プレグネノロンは P_4 あるいは17- α ヒドロキシプレグネノロンに代謝される。 P_4 はC17水酸化酵素によって17 α -ヒドロキシプロジェステロンとなり、次にC17-20リアーゼによりアンドロステンジオンに、その後17 β -水酸基脱水素酵素（以下 17 β HSD）によってテストステロンとなる。テストステロンにチトクロームP-450アロマトラーゼ（以下

P-450arom) が働きエストラジオール 17β となる。アンドロステンジオンにP-450aromが作用するとエストロン(以下 エストロジェン; E_2)となる。 E_2 は排卵を引き起こすLHサージの起因となると共に、顆粒層細胞のFSHおよびLHの受容体をつくり、顆粒層細胞の分裂を刺激し卵胞の発育を促す[29]。すなわち、 P_4 は各ステロイドホルモンの前駆物質であり、これらのステロイドホルモンは卵胞成熟、排卵を誘起するFSHおよびLHの受容体形成に関与する E_2 を生成する。このことから、 P_4 は卵子成熟において重要な間接的役割を担っている。

体外培養においても、 P_4 はFSH受容体形成に携わっていると考えられる[35]。例えば、IVM培養液への P_4 添加により減数分裂停止を解除することが、幼若ラットを用いた実験から実証されている[19]。このことから、体内および体外培養における P_4 は卵子成熟に間接的および直接的に作用しているといえる。

本実験では、体内の血中 P_4 濃度が上昇し、最高値に達する発情開始10時間目を照らし合わせ、IVM由来卵子をIVM開始後10時間目に P_4 添加培地に移し換え、IVM培地への P_4 添加が卵子成熟、受精後の胚発生および胚の品質に及ぼす影響について検討した。

第 2 節 材料および方法

1. 卵子の回収

食肉処理場由来で採取したウシ卵巣をパウチパックに入れ実験室に持ち帰った。卵管間膜および脂肪を除去し、滅菌生理食塩水で数回洗浄した後、卵巣表面の余分な水分および血液を滅菌紙で除去した。COCs の採取には、18G の注射針を装着した 5 ml シリンジを用い、3 % 子ウシ血清（以下 CS ; Gibco、16170-078）を添加した修正ダルベッコリン酸緩衝液（以下 D-PBS ; Gibco、21300-025）を少量吸引しシリンジ内を洗浄した後、直径 2～6mm の卵胞から COCs を吸引採卵した。採取後の COCs は D-PBS で数回洗浄した。供試卵子には卵丘細胞が 1 層以上付着し、細胞質が均一な未成熟卵子（Grade 1、2 卵子）を用いた。

採取した直後の COCs は、D-PBS で 3 回洗浄したのち、卵胞刺激ホルモン（以下 FSH ; アントリン R10、川崎三鷹）0.02AU/ml および 5% CS を添加したヘペス緩衝 TCM-199（以下 TCM-199 ; Gibco、12340-030）で 2 回洗浄した。

2. 体外成熟培養

IVMには前述した体外成熟培地および同様の培地に P_4 (Sigma、P7556) を1および $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加したものをを用いた。 P_4 添加濃度別に $1\mu\text{g}$ および $5\mu\text{g}$ 区また P_4 無添加を対照区として計3区を設けた。対照区はプラスチックシャーレ (Falcon、1007) に $100\mu\text{l}$ のTCM-199のドロップを作製し、流動パラフィン (ナカライテスク、26114-75) で覆ったものにCOCsを20個ずつ導入し 38.5°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 、 95% 空気の気相条件下で20時間培養した。また、1および $5\mu\text{g}$ 区はIVM開始後最初の10時間は P_4 無添加のTCM-199で培養し、10時間目にドロップから取り出し、 P_4 を1および $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加したTCM-199で2回洗浄した後、4wellマルチディッシュ (Nunc、179820) に同液を1wellあたり $700\mu\text{l}$ 滴下したものに20個ずつ導入し、同様の気相条件下で20時間目まで培養を行なった。

3. アセトオルセイン染色法による卵子の核相検査

IVM開始20時間後に一部のCOCsは、ホルマウント標本を作製し核相検査を行なった。COCsは、D-PBSが 2ml 入ったガラス遠沈管に移し、ボルテックスミキサーで5分30秒間攪拌し卵丘細胞を完全に除去した後、カルノア液 (酢酸とエタノールを

1 : 3の割合で混合したもの) を用いて48時間以上固定した。固定後、99.5%エタノールで置換後、1%酢酸オルセイン溶液(45%濃度に調整した酢酸溶液にオルセイン0.02g/mlを混合したもの) で15~30分間染色した。染色後、アセトグリセロール(酢酸、グリセリンおよび超純水を1 : 1 : 3の割合で混合したもの) で置換し、生物顕微鏡下で核相を観察した。卵子の核相の判断基準は、核の赤道面に染色体が配列しているものを第一減数分裂中期卵子(以下 Metaphase I ; MI)、細胞質の両極へ染色体が移動を開始しているものを第一減数分裂後期卵子(以下 Anaphase I ; AI)、細胞質の両極へ染色体移動が完了しているものを第一減数分裂終期卵子(以下 Telophase I ; TI) および細胞質の赤道面に半減した染色体が配列し、第一極体の核相が確認できるものを第二減数分裂中期卵子(以下 Metaphase II ; MII) とした。

4. 体外受精

1) 精子のパーコール洗浄

体外受精にはホルスタイン種雄牛1頭の凍結精液を用いた。凍結精液は37℃の温湯に30秒間浸漬して融解した。融解後の精子はTakahashiら[28]の方法に準じ、パーコール(GE

Healthcare Bio-Science AB、17-0891-01) による密度勾配法により洗浄分離した。パーコール密度勾配法は、まず 90%パーコール溶液を調製し、ついで 90%パーコール溶液に Brackett and Oliphant[3]液 (以下 B0 液) を加えて 45%パーコール溶液を調製した。精子のパーコール洗浄には 15ml のプラスチック遠沈管 (Corning、43079) を用いた。はじめに 45%パーコール溶液 2ml を入れ、次いで遠沈管の底部に 90%パーコール溶液 2ml を入れ、45%パーコール溶液の下に 90%パーコール溶液となるように重層し、その上に融解後の精液を 470 μ l 重層した。遠心分離は 2000rpm で 20 分間行ない、上清をアスピレータで吸引し除去したのち、精子懸濁液より精子沈渣を得た。

2) 精子の受精能獲得誘起

体外受精に使用した精子の受精能獲得誘起は B0 液を用いた方法で行った。すなわち、B0 液に 10mM ヒポタウリン (Sigma、H1384) および 4U/ml ノボヘパリン (持田製薬、A138) を添加した受精能獲得誘起液 6ml をパーコール洗浄後の精子に加え、ただちに 1800rpm で 5 分間の遠心分離を行ない、上清をアスピレータで吸引除去後、受精能獲得精子を得た。

3) 精子濃度調整

受精能獲得誘起後の精子は精子数をトーマ血球計算盤（2計算室タイプ、エルマ）により計測後、最終濃度が 5×10^6 /mlになるように、まず10mMヒポタウリンを添加した受精能獲得誘起液で 10×10^6 /mlに調製し、B0液に20mg/ml ウシ血清アルブミン（以下 BSA ; Sigma、A4378）を添加した精子希釈液で2倍希釈し、精子浮遊液とした。

4) 媒 精

精子浮遊液を用いて60mmシャーレに100 μ lのドロップを製作し、流動パラフィンで覆ったものを体外受精培地とした。IVM後の卵子はB0液にBSA 10mg/mlを添加した卵子洗浄液で3回洗浄したのち、ドロップ1個あたり20個ずつ導入し、IVMと同様の気相条件下で18時間媒精を行なった。

5. 体外発生培養

体外発生培養は、5%CSを添加したCR1aa[22]（以下 CR1aa）を用いた。媒精が終了したCOCsはD-PBSを2ml入れたガラス遠沈管に移し、ボルテックスミキサーで2分30秒間攪拌し精子を完全に除去した後、CR1aaで3回洗浄し、60mmシャーレに同じ

CR1aaで100 μ lのドロップを作製し、各試験区それぞれドロップ1個あたり20個ずつ導入し、38.5 $^{\circ}$ C、5%CO₂、5%O₂、90%N₂の気相条件下でIVFを0日として、9日目まで培養した。

IVF後3日目に倒立顕微鏡下で卵子を観察し、2細胞期、3および4細胞期、5細胞期以上に発育した胚の割合を調査した。卵割率は、培養した全卵子数に対する卵割胚数の割合とした。また、7~9日目に胚盤胞発生率を調査した。胚盤胞発生率は、培養した全卵子数に対する発生胚盤胞数の割合とした。

6. 蛍光二重染色法による胚盤胞の細胞数測定

細胞数の測定には7日目に胚盤胞以上に発育した胚を用い、蛍光二重染色は阪谷らの方法[24]を用いた。胚は、リン酸緩衝液（以下 PBS (-); Gibco、14190）+5mg/ml BSA（Sigma、A7030）で軽く洗浄した後、0.1mg/ml Propidium iodide（Sigma、P4170）に0.2% Triton X-100およびPBS(-)を一次染色液とし、1分間、細胞質が少し収縮するまで染色液に浸漬した。次いで、99.5%エタノールとPBS(-)に25 μ g/ml bisBenzimide（Hoechst 33342; SIGMA、B2261）を溶解したものを9:1の割合で混合し、これを二次染色液とし3分間浸漬した。浸漬後、グリセリン（Wako、075-00616）で余分な染色液を除去し、同時に退色防

止を行って少量のグリセリンと共にスライドガラスに移し、カバーガラスで封入した。その後、蛍光顕微鏡下で観察し蛍光フィルター（波長460nm；青、波長560nm；赤）を使用して撮影した（図1-1）。撮影した画像は画像処理ソフトImage J（アメリカ国立衛生研究所）を用いて胚盤胞の内細胞塊数（青色に染色された部分）、栄養膜細胞数（赤色に染色された部分）をそれぞれ測定し、両細胞数の合計を総細胞数とした。

7. 統計分析

卵子成熟率、卵割率および胚盤胞発生率の統計処理はカイニ乗検定またはFisherの直接確率法を用いて行なった。

胚盤胞の細胞数の統計処理はt-検定を用いて行なった。

第3節 結果

ウシIVM培養液に P_4 を無添加、1および $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加したときのIVM20時間後の卵子成熟率を表1-1に示した。卵子成熟率は、 $1\mu\text{g}$ 区が対照区および $5\mu\text{g}$ 区に比べ有意に高く($P < 0.05$)、 $5\mu\text{g}$ 区は対照区と差がなかった。

IVF後3日目の卵割率および7~9日目の胚盤胞発生率を表1-2に示した。卵割率は対照区に比べ $1\mu\text{g}$ 区が有意に高く($P < 0.01$)、 $5\mu\text{g}$ 区は対照区と差がなかった。胚盤胞発生率は、 $1\mu\text{g}$ 区および $5\mu\text{g}$ 区が対照区に比べ有意に高かった($P < 0.01$ および $P < 0.05$)。

IVF後7日目の胚盤胞の細胞数を表1-3に示した。いずれの区間にも差はなかった。

表 1-1. ウシ体外成熟培養におけるプロジェステロン添加が卵子成熟に及ぼす影響

試験区	供試卵子数	成熟ステージ(個)				成熟卵子数(%)
		MI	AI	TI	MII	
対照区	31	4	4	0	23	23 (76.7) ^b
1 μ g 区	32	1	0	1	30	30 (93.8) ^a
5 μ g 区	28	2	3	1	22	22 (78.6) ^{ab}

^{a,b}; 異符号間に有意差あり (P<0.05)

表 1-2. ウシ体外成熟培養におけるプロジェステロン添加が胚発生に及ぼす影響

試験区	供試卵子数	3日目の卵割胚数(%)	胚盤胞数(%)
対照区	277	207 (74.7) ^b	97 (35.0) ^a
1 μ g 区	264	226 (85.6) ^a	126 (47.7) ^b
5 μ g 区	274	212 (77.4) ^c	119 (43.4) ^c

^{a, b}

; 異符号間に有意差あり (P<0.01)

^{a, c}; 異符号間に有意差あり (P<0.05)

表 1-3. ウシ体外成熟培養におけるプロジェステロン添加が胚盤胞の細胞数に及ぼす影響

試験区	供試胚数	内細胞塊数	栄養膜細胞数	総細胞数	総細胞数/内細胞塊数
対照区	24	39.5±13.8*	69.0±15.7	108.5±23.1	2.9±0.8
1µg 区	28	36.9±8.7	66.2±12.9	103.0±13.8	2.9±0.7
5µg 区	24	36.2±8.9	74.4±22.4	110.6±28.2	3.1±0.6

*; 平均値±標準偏差

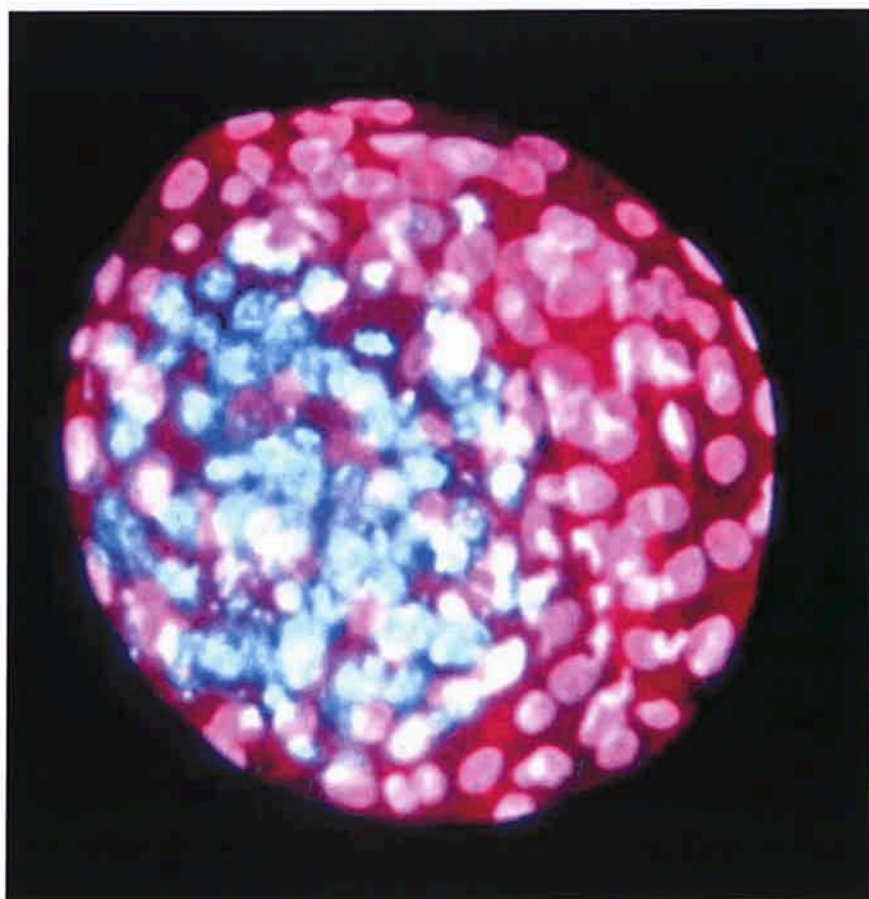


図1-1. 蛍光二重染色法により染色した7日目の胚盤塊 (青色：内細胞塊 赤色：栄養膜細胞)

第 4 節 考 察

本実験結果から $1\mu\text{g}$ 区の卵子成熟率 ($P < 0.05$)、卵割率および胚盤胞発生率 ($P < 0.01$) は対照区に比べ有意に高かった。宮田 [17] は、本研究と同様の P_4 を用い IVM 開始 0 時間目から P_4 を $1\mu\text{g}$ 添加した培地で培養し、体外受精後の胚発生を調べたところ胚盤胞発生率が高かったと報告している。川島ら [13] はブタ体外成熟において、FSH を 0~10 時間目、および LH を 20~40 時間目に添加した区に比べ、FSH、 E_2 を 0~10 時間目、FSH、 E_2 および P_4 を 10~20 時間目、LH、 P_4 および上皮成長因子 (以下 Epidermal Growth Factor ; EGF) を 20~40 時間目に添加した区の方が IVF 後の胚盤胞発生率が有意に高かったと報告している。本研究とは用いた動物および添加物質などの条件は異なるが、対象の動物におけるホルモンや成長因子の体内分泌環境をモデルにして添加物を添加しているといった点では共通した培養方法といえる。川島ら [13] および本研究の結果から、卵子を培養する際、 P_4 添加がウシ生体内環境と適合して卵子成熟の促進と受精後の胚発生に影響していることが示唆された。

卵子成熟期の卵丘細胞では、コレステロール合成による P_4 産生が行われている [26]。生体内の P_4 産生機序として、卵丘細胞においてグルコースが解糖系により変換されたピルビン酸から、ペントースリン酸系によるグルタミン酸シンターゼ (以下 NADPH) を補因子としてコレステロールが生産される [26]。生産されたコレステロールは、卵丘細胞における P_4 合成に用いられる [25、34]。Yamashita ら [33] はブタ卵子におけるコレステロール合成に関与する酵素をコードする遺伝子発現を検出した結果、卵丘細胞では、FSH と LH 依存的にいずれの遺伝子発現も有意に上昇すると報告している。さらに、マウスにおけるマイクロアレイ解析においても、コレステロール合成に関わる *Hmgcr*、*CYP51* および *DHCR14* といった遺伝子発現が卵丘細胞で排卵期に上昇することが報告されている [10]。Yamashita ら [33] はこれらの発現酵素の役割を追求する目的で、数種類の酵素抑制剤を用いた実験を行った結果、ブタ卵子の P_4 合成量の有意な低下と減数分裂再開の遅延が認められ、また、この遺伝子発現の抑制は培地中への P_4 添加により解除されることから、新規に合成されたコレステロールは P_4 へと変換され、卵丘細胞をオートクライン的に刺激することが卵子の成熟に必要であると報告している。さらに、

卵子は成熟過程において、第一減数分裂前期で卵丘細胞から細胞質に分泌される減数分裂再開抑制因子である環状アデノシンリン酸（以下 cAMP）により、分裂を一時停止して M I 期へと進み、cAMP の分泌が始まると卵丘細胞の膨化が起こる [5]。卵丘細胞が膨化しギャップ結合が消失すると、卵母細胞内の cAMP が行き渡らなくなり、減数分裂が再開される。その後卵子の核の成熟が促進され、M II 期へと成熟する。すなわち、本研究の結果から IVM 開始 10 時間目に P_4 を添加することにより、顆粒層細胞における FSH の受容体を発現させ、FSH による卵子成熟を促すことになるのではないかと考えられた。

本研究の結果から、品質の良い未成熟卵子は IVM 開始から 10 時間目までは FSH 添加培養液で培養して、卵子を M I 期まで成熟させ、その後、 P_4 を添加した培養液に移し 20 時間目まで培養し、卵丘細胞を膨化させる。IVM 開始後 5~10 時間目で cAMP の分泌を途絶させることで減数分裂を再開させ、M II 期まで成熟したと考えられた。したがって、本研究の結果から、 P_4 添加区は生体内におけるホルモン分泌に近い環境を体外でも再現したことにより卵子成熟が促進し、受精する確率が高くなり胚発生へと反映したと推察された。

IVM 培地への P_4 添加による胚盤胞の内細胞塊数、栄養膜細

胞数および総細胞数に差はなかった。正常な着床、受胎には、胚盤胞に占める内細胞塊の割合、(総細胞数/内細胞塊数比)が重要であり[24]、この値から胚の品質をある程度判断することが可能とされている。一般にウシ体外受精胚における総細胞数/内細胞塊数比は7日目の拡張胚盤胞で2.5~4、また総細胞数は報告により差はあるものの120前後とされている[14、31]。しかし、体外受精胚や核移植胚などの体外培養胚では総細胞数および総細胞数/内細胞塊数比が大きく異なることが多く、これらの値に近ければ体外培養胚においても体内受精胚に近い品質と判定しうる根拠となっている[24]。本研究の総細胞数/内細胞塊数比は対照区、1 μ g区および5 μ g区のそれぞれで2.9、2.9および3.1で、全ての区において上記の範囲内であることから、本研究の胚の品質は概ね良好であったと推察された。また、各区の総細胞数は対照区、1 μ g区および5 μ g区のそれぞれで108.5、103.0および110.6であり大きな差がないことが示され、IVMにおけるP₄添加は胚の品質に悪影響を及ぼさないことが示唆された。

以上より、ウシIVMでは培養開始10時間目にP₄を1 μ g添加すると卵子成熟率、卵割率および胚盤発生胞率において高い値を得られることが明らかとなった。また、P₄添加および

無添加の IVM を行い、体外受精後に得られた胚の細胞数に差はなかった。

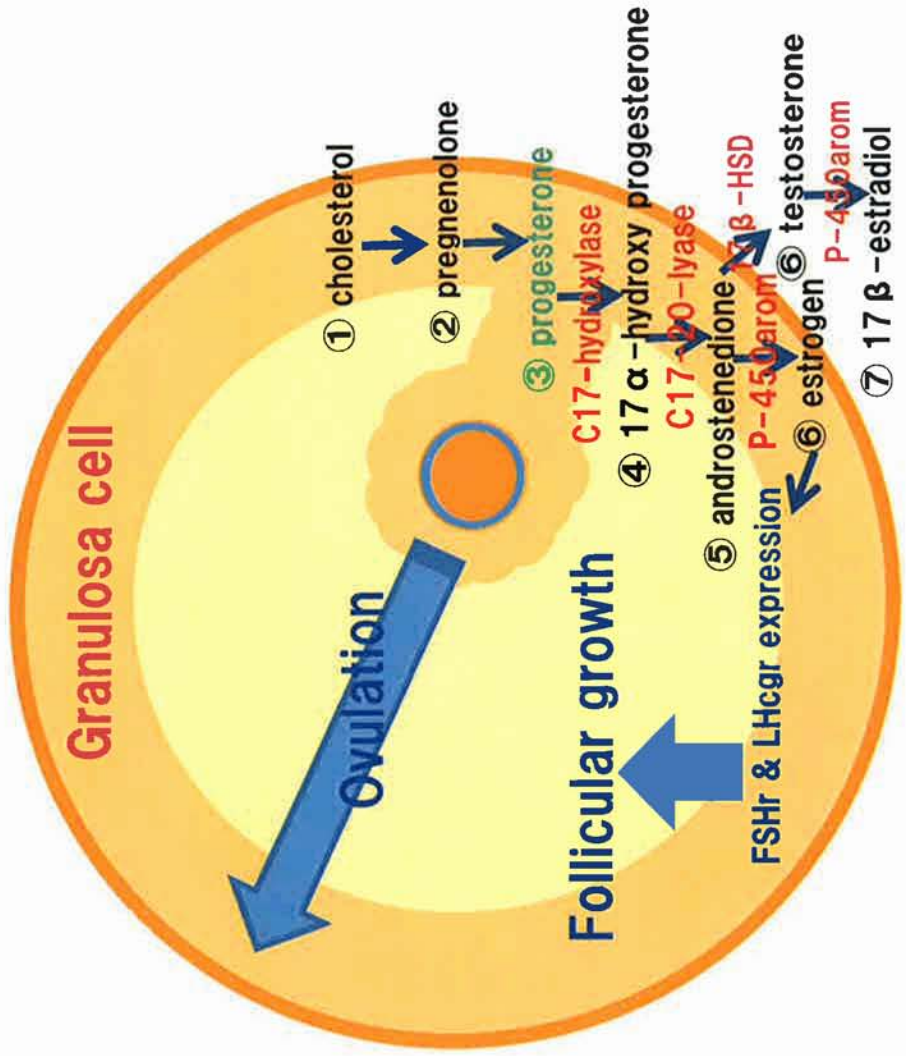


図 1-2. プロジェステロンと卵子成熟のメカニズム

第 5 節 要 約

本研究では、ウシIVM時の培養条件の改善による体外受精胚の発生率向上を目的とし、IVM培地への P_4 添加が卵子成熟、胚発生および胚の品質に及ぼす影響について検討した。

実験には食肉処理場由来卵巢から採取したCOCを用い、IVMはTCM-199を基本液とし、IVM開始10時間目に P_4 を1および $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加した。 P_4 添加濃度別に $1\mu\text{g}$ および $5\mu\text{g}$ 区また P_4 無添加を対照区として計3区を設け、20時間IVMを行った。その後、18時間媒精を行って作出した体外受精卵を発生培養液にCR1aaを用いて培養した。なお、培養液量は受精卵1個あたり $5\mu\text{l}$ とした。受精卵の培養は9日間（媒精日を0日目）行い、3日目に卵割率、および9日目における胚盤胞発生率、7日目に胚盤胞以上に発育した胚を用いて細胞数を測定した。

卵子成熟率は $1\mu\text{g}$ 区が対照区に比べ有意に高かく ($P < 0.05$)、卵割率は対照区に比べ $1\mu\text{g}$ 区 ($P < 0.01$) および $5\mu\text{g}$ 区 ($P < 0.05$) が有意に高かった。胚盤胞発生率は $1\mu\text{g}$ 区 ($P < 0.01$) および $5\mu\text{g}$ 区 ($P < 0.05$) が対照区に比べ有意に高かった。 P_4 添加の有無における細胞数の差は認められなかった。

以上の結果より、ウシIVMにおいてIVM開始後10時間目にP₄を1μg添加すると卵子成熟率、卵割率および胚盤胞発生率において高い値を得られることが明らかとなった。

第Ⅲ章 総括

ウシ生体内では、LHサージ開始24～30時間後に排卵する。血中プロジェステロン (P_4) 濃度はLHサージ開始から4～5時間後に著しく上昇し、6～10時間後に最高値となる。発情期の P_4 平均値はおよそ0.79ng/mlで、LHサージ開始6～10時間後はおよそ1.1ng/mlと平均値に比べ高い値である。卵子成熟を誘起するLHサージの開始に伴う P_4 濃度上昇は、 P_4 が卵子成熟と密接な関係にあることを示している。本研究では、発情卵胞内の P_4 濃度を模倣し、IVMを行っている卵子をIVM開始後10時間目に P_4 を添加した培地に移し換え、それが卵子成熟、体外受精後の胚発生および胚の品質に及ぼす影響について検討した。

ウシ体外成熟培養におけるプロジェステロン添加が

卵子成熟および胚発生に及ぼす影響

本研究では、体外成熟培養液に0.02AU/ml卵胞刺激ホルモン (FSH) および5%子ウシ血清 (CS) を添加したTCM-199を用い、これに P_4 を0、1および5 μ g/ml添加した培地でCOCsを培養し、

計3区で試験を行った。IVM後20時間目における卵子成熟率を調べ、媒精日を0日として2、3日目に卵割率および9日目における胚盤胞発生率を調べた。また7日目に胚盤胞期以上に発育した胚を用い、胚盤胞の細胞数を測定した。ウシIVM培養液に P_4 を無添加、1および $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加したときのIVM20時間後の卵子成熟率を表1-1に示した。卵子成熟率は、 $1\mu\text{g}$ 区が対照区に比べ有意に高く($P < 0.05$)、 $5\mu\text{g}$ 区は対照区と差がなかった。IVF後3日目の卵割率および9日目における胚盤胞発生率を表1-2に示した。卵割率は対照区に比べ $1\mu\text{g}$ 区が有意に高く($P < 0.01$)、 $5\mu\text{g}$ 区は対照区と差がなかった。胚盤胞発生率は、 $1\mu\text{g}$ 区および $5\mu\text{g}$ 区が対照区に比べ有意に高かった($P < 0.01$ および $P < 0.05$)。IVF後7日目の胚盤胞の細胞数を表1-3に示した。いずれの区間にも差は認められなかった。以上の結果より、ウシIVM培地へ10時間目に P_4 を $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加すると、胚の品質には影響を及ぼさないものの、卵子成熟率、卵割率および胚盤胞発生率の向上に効果あることが示された。

本研究の結果から、体外成熟培養液に P_4 を添加して培養した場合、 P_4 無添加の培養よりも有意に高い卵子成熟率および胚発生率を得られたことから、有効な培養方法であることが示された。これらのことから、 P_4 を添加したIVMは今後の体外

受精技術においてウシに限らず、他種の家畜でも有効的に活用できる培養方法となる可能性が考えられた。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ウシ卵巣の提供にご協力いただきました北海道畜産公社道央事業所早来工場、北海道早来食肉衛生検査所、ならびに凍結精液の提供にご協力いただきましたジェネティクス北海道の方々に心より感謝申し上げます。また、終始ご指導賜りました酪農学園大学大学院家畜繁殖学 堂地 修教授、動物生殖工学 今井 敬教授、家畜遺伝学 上田純治教授ならびにご協力いただきました家畜繁殖学ゼミ生各位に心より感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Anderiesz C, Ferraretti A, Magli C. 2000. Effect of recombinant human gonadotrophins on human, bovine and murine oocyte meiosis, fertilization and embryonic development in vitro. *Hum. Reprod.* 15:1140-1148.
- 2) 荒木康久, 八尾竜馬. 2011. ヒト卵子体外成熟の培養理論と実際. 森 崇英編. 卵子学: 463-471. 京都大学学術出版会. 京都.
- 3) Brackett B G, Oliphant G. 1975. Capacitation of Rabbit Spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.* 12:260-274.
- 4) Craig J, Zhu H, Dyce PW. 2004. Leptin enhances oocyte nuclear and cytoplasmic maturation via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology* 145:5355-5363.
- 5) Dekel N, Lawrence TS, Gilula NB, Beers WH. 1981. Modulation of cell to cell communication in the cumulus-oocyte complex and the regulation of oocyte maturation by LH. *Dev. Biol.* 86:356-362.
- 6) Eyestone W H and First N L. 1986. A study of the 8-

to 16-cell developmental block in bovine embryos cultured in vitro. Theriogenology 25 : 152

- 7) Ge HS, Huang XF, Zhang W. 2008. Exposure to human chorionic gonadotropin during in vitro maturation does not improve the maturation rate and developmental potential of immature oocytes from patients with polycystic ovary syndrome. Fertil. Steril. 89:98-103.
- 8) 浜名克己, 中尾敏彦, 津曲茂久. 2007. 獣医繁殖学第3版. 2:30-31. 文永堂出版. 東京.
- 9) 浜名克己, 中尾敏彦, 津曲茂久. 2007. 獣医繁殖学第3版. 3:73-74. 文永堂出版. 東京.
- 10) Hernandez G I, Gonzalez R I, Shimada M. 2006. Gene expression profiles of cumulus cells oocyte complexes during ovulation reveal that cumulus cells exhibit a diverse array of neuronal and immunelike functional activities : Are these cells multipotential? Mol. Endocrinol. 20:1300-1321.
- 11) Ikeda S, Ichihara-Tanaka K, Azuma T. 2000. Effects

- of midkine during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent developmental competence, Biol. Reprod. 63:1067-1074.
- 12) Ikeda S, Kitagawa M, Imai H. 2005. The roles of vitamin A for cytoplasmic maturation of bovine oocytes. J. Reprod. Dev. 51:23-35.
- 13) Kawashima I, Okazaki T, Noma N, Nishibori M, Yamashita Y, Shimada M. 2008. Sequential exposure of porcine cumulus cells to FSH and/or LH is critical for appropriate expression of steroidogenic and ovulation related genes that impact oocyte maturation in vivo and in vitro. Reproduction. 136:9-21.
- 14) Koo DB, Kang YK, Choi YH, Park JS, Kim HN, Oh KB, Son DS, Park H, Lee KK, Han YM. 2002. Aberrant allocation of inner cell mass and trophectoderm cells in bovine nuclear transfer blastocysts. Biol. Reprod. 67:487-492.
- 15) 眞鍋 昇. 2010. 哺乳類の生殖. 佐藤英明編. 動物生殖学. 67-78. 朝倉書店. 東京.

- 16) Marin CL, Grondahl C, Murray A.
2004. Meiosis-activating sterol promotes the
metaphase I to metaphase II transition and
preimplantation developmental competence of mouse
oocytes maturing in vitro, Biol. Reprod.
70:1458-1464.
- 17) 宮田佳苗. 2008. 成熟培養液へのプロジェステロン
添加がウシ卵子の成熟ならびに体外受精後の胚発生に
及ぼす影響. 酪農学園大学大酪農学部酪農学科卒業論
文. 228-232.
- 18) 宮田佳苗. 2010. ウシ体外受精における成熟培養液
へのプロジェステロン添加が胚発生に及ぼす影響. 酪
農学園大学大学院酪農学研究科酪農学専攻修士論文.
12-13.
- 19) Mori T, Nishimoto N, Kohda H. 1983.
Meiosis-inhibiting effects in vivo of antiserum to
progesterone of follicular ova in immature rats
treated with gonadotropins. Endocrinol: Jpn.
30:593-599.
- 20) 岡田益吉, 長濱嘉孝, 中辻憲夫. 1998. 生殖細胞の発

- 生と性分化. 530-540. 共立出版. 東京.
- 21) Qiu HB, Lu SS, Ji KL, Song XM, Lu YQ, Zhang M, Lu KH. 2008. Membrane progesterin receptor beta (mPR- β): A protein related to cumulus expansion that is involved in in vitro maturation of pig cumulus-oocyte complexes. *Steroids*. 73:1416-1423.
- 22) Rosenkrans CF, Jr., First NL. 1994. Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes in vitro. *J. Anim. Sci.* 72:434-437.
- 23) Sato C, Shimada M, Mori T. 2007. Assessment of human oocyte quality by cumulus cell morphology and circulating hormone profile. *Reprod. BioMed. Online*. 14:49-56.
- 24) 阪谷美樹, 山中賢一, 高橋昌志. 2010. 蛍光試薬を用いた胚盤胞の簡便な染色法. *日本胚移植学雑誌*. 32: 13-17.
- 25) Shimada M, Terada T. 2002. FSH and LH induce progesterone production and progesterone receptor synthesis in cumulus cells : a requirement for

- meiotic resumption in porcine oocytes. *Biol. Reprod.* 8:612-618.
- 26) 島田昌之, 山下泰尚. 2011. 卵子と初期胚の代謝機構. 森 崇英編. 卵子学. 818-827. 京都大学学術出版会. 京都.
- 27) 庄司圭佑. 2011. ウシ体外成熟培養におけるプロジェステロン添加が胚発生に及ぼす影響. 酪農学園大学酪農学部酪農学科卒業論文. 18-26.
- 28) Takahasi Y, Hisinuma M, Matsui M, Tanaka H, Kanagawa H. 1996. Development of in vitro matured/fertilized bovine embryos in a chemically defined medium: Influence of oxygen concentration in the gas atmosphere. *J. Vet. Med. Sci.* 58:897 - 902.
- 29) 友金 弘. 2010. 生殖のホルモン. 佐藤英明編. 動物生殖学. 30-34. 朝倉書店. 東京.
- 30) 戸津川清, 佐藤菜穂子. 1997. ブタ卵管上皮細胞由来の胚発生促進因子. 山形大学紀要 (農学) 13:39-44.
- 31) Van Soest A, Boerjan ML, Bols PEJ, Vanroose G, Lein A, Coryn M, de Kruif A. 1997. Timing of compaction and inner cell allocation in bovine embryos

- produced in vivo after superovulation. *Biol. Reprod.* 57:1041-1049.
- 32) 山室匡史. 2010. ブタ卵母細胞の減数分裂過程におけるCyclin B蓄積量の制御機構. 東京大学大学院農学生命科学研究科応用動物科学専攻博士論文. 4.
- 33) Yamashita Y, Nishibori M, Terada T. 2005. Gonadotropin-induced delta 14-reductase and delta 7-reductase gene expression in cumulus cells during meiotic resumption of porcine oocytes. *Endocrinology.* 146:186-194.
- 34) Yamashita Y, Shimada M, Okazaki T. 2003. Production of progesterone from de novo-synthesized cholesterol in cumulus cells and its physiological role during meiotic resumption of porcine oocytes. *Biol. Reprod.* 68:1193-1198.
- 35) 吉田仁秋, 島田昌之, 森 崇英. 2011. ヒト体外成熟の実施理論. 森 崇英編. 卵子学. 443-449. 京都大学学術出版会. 京都.

Summary

*Effect of progesterone supplementation of maturation
medium on the development of IVM-IVF-IVC
bovine embryos*

The objective of this study was to investigate whether progesterone (P_4) supplementation to *in vitro*-maturation (IVM) medium could affect the competence of bovine oocyte to develop into blastocysts *in vitro*. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were collected by aspiration of ovarian follicles (2 to 6 mm in diameter) obtained from a local abattoir. The COCs were matured for 20 h in TCM-199 supplemented with 5% calf serum (CS) and 0.02 AU mL⁻¹ FSH, at 38.5°C in an atmosphere of 5% CO₂ in air. P_4 was added to the IVM medium at 10 h after the start of the culture (1 µg mL⁻¹ of P_4 : 1 µg group; 5 µg mL⁻¹ of P_4 : 5 µg group; without P_4 : control group). The matured COCs were inseminated with 5×10^6 sperms mL⁻¹. After 18 h of gamete co-culture, the presumptive zygotes were cultured in CR1aa containing 5% CS at 38.5°C in an atmosphere of 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂ for 9 days (fertilization, day 0). The rates of MII, cleavage and blastocyst formation were analyzed by the chi-square test. Each set of cell numbers

(mean \pm SE) was analyzed by the unpaired *t*-test. The MII rate in the control group was significantly lower ($P < 0.05$) than that in the 1 μ g group. The cleavage rate in the 1 μ g group was significantly higher ($P < 0.05$) than those in the control group and 5 μ g group. Further, the blastocyst formation rate in the 1 μ g group and 5 μ g group were significantly higher ($P < 0.05$) than that in the control group. However, there was no significant difference in cell numbers among the groups. In conclusion, timely P₄ supplementation in IVM medium give rise to high developing rates in bovine embryo cultured in vitro.