

平成 22 年 2 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：193580332

研究課題名（和文） 卵胞液を用いたブタ未成熟卵子の簡便な体外成熟培養方法の確立

研究課題名（英文） Effects of oxygen tension and follicle cells on maturation and fertilization of porcine oocytes during in vitro culture in follicular fluid

研究代表者 永井 卓 (NAGAI TAKASHI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・研究管理監

研究者番号：20391378

研究成果の概要（和文）：ブタ卵子卵丘細胞複合体（COCs）を静置培養した場合、卵胞細胞を添加すると卵子の成熟率が有意に低下し、逆に回転培養では卵胞細胞を添加しないと成熟率が有意に低下した。酸素分圧は未成熟卵子の成熟率に影響がなく、卵胞液に卵胞細胞を添加してCOCsを回転培養すると、卵胞細胞を添加しないで静置培養した場合よりも有意に高い正常受精率、性前核形成率及び2細胞期胚および胚盤胞期胚への発生率が得られた。

研究成果の概要（英文）：The objective was to investigate the effects of oxygen tension (5 or 20% O₂) and follicle cells (FC) during in vitro maturation of porcine oocytes in only porcine follicular fluid, using static (S group) and non-static (rotating) (R group) culture systems, on their nuclear maturation and subsequent in vitro fertilization and development. Both -FC/S and +FC/R culture systems supported meiotic competence, irrespective of oxygen tension. However, the +FC/R culture system may be superior to the -FC/S culture system for promoting in vitro fertilization and development of in vitro matured porcine oocytes.

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 応用動物科学

キーワード：ブタ 体外成熟 体外受精 卵胞液

1. 研究開始当初の背景

食肉処理場で容易に得られるブタの卵巣から回収した未成熟卵子を体外で成熟させるには合成培地を用いなければならない。しかし、その作成には時間とコストがかかる。そこで、卵巣から未成熟卵子を回収する時に同時に回収される卵胞液を培養液として用いることを考えた。ところが、これまでに卵胞液中で成熟培養したブタ体外成熟卵子が体外受精後に高率に雄性前核を形成することが明らかにされているが、(1) 未成熟卵子の発生能に有効であると言われている卵胞細胞の影響については調べられていない。また、(2) 静置および回転培養、ならびに(3) 成熟培養時の酸素分圧が体外受精後の成熟卵子の発生能に及ぼす影響についても調べられていない。

2. 研究の目的

卵胞液が単独の培養液として用いることができるかどうかを明らかにするために、卵胞液への(1) 卵胞刺激ホルモン (FSH) および(2) 卵胞細胞の添加、ならびに(3) 成熟培養時の酸素分圧 (5%、20%) が、(4) 静置および回転培養による未成熟卵子の体外成熟および体外受精後の発生能に及ぼす影響について調べることを研究目的とした。

3. 研究の方法

まず、(1) 食肉処理場で採取したブタ卵巣の卵胞 (直径 2~5mm) から注射筒を用いて卵胞内内容物を回収する。ついで、(2) メッシュ (直径 212 μ m) を通過させて、未成熟卵子および卵胞細胞と卵胞液を分離し、さらに、(3) メッシュを通過した卵胞液を遠心分離した上澄み液に FSH (0, 0.02, 0.05, 0.12, 0.24 および 0.6 IU/ml) と抗生物質 (ゲ

ンタマイシン) を添加後にフィルター (直径 0.22 μ m) を通し、成培養用の卵胞液 (成熟培養用卵胞液) として用いた。成熟培養用卵胞液に、(1) 卵胞細胞 (5.2 x 10⁶ cells/mL) を添加あるいは無添加し、(2) 5% あるいは 20% の酸素分圧下で、(3) 未成熟卵子を静置あるいは回転培養した。すなわち、成熟培養用卵胞液への卵胞細胞の添加および培養時の酸素分圧が豚未成熟卵子の成熟に及ぼす影響について調べた。まず、実験 1 では、第二成熟分裂中期への成熟率 (MII 率) について調べ、ついで、実験 2 では、実験 1 において、高い MII 率が得られた培養方法 (卵胞細胞を添加しないで静置培養と卵胞細胞を添加した回転培養) でブタ未成熟卵子を成熟させ、得られたブタ体外成熟卵子の体外受精およびその後の胚発生に及ぼす影響について調べた。

※予備試験として、FSH (0.02, 0.05, 0.12, 0.24 および 0.6 IU/ml) 添加が成熟率に及ぼす影響について調べた。

4. 研究成果

表 1 に示すように、成熟培養用卵胞液に FSH を 0.12 IU/ml 添加して、未成熟卵子を培養すると、FSH 無添加の対照区と比較して有意に高い MII 率が得られた。従って、以降の実験では、成熟培養用卵胞液に FSH を 0.12 IU/ml 添加した。

実験 1 : 卵胞細胞の添加、酸素分圧および培養方法 (静置および回転培養) が、ブタ未成熟卵子の MII 率に及ぼす影響を表 2 に示した。未成熟卵子を静置培養した場合、卵胞細胞を添加すると M-II への成熟率が有意に低

下し(無添加:76.5-78.3%、添加:17.5-35.7%)、逆に、回転培養では、卵胞細胞を添加しないとM-IIへの成熟率が有意に低下した(添加:65.9-67.7%、無添加:11.4-32.7)。酸素分圧は未成熟卵子の成熟率に影響がなかった。

表1 成熟培養に最適なFSH濃度

FS濃度 (IU/ml)	培養卵数	成熟卵数 (%:MII率)
0	82	37(45.1) ^a
0.02	76	39(51.3) ^{ac}
0.05	73	52(71.2) ^{bc}
0.12	78	61(78.2) ^b
0.24	80	54(67.5) ^{bc}
0.6	75	49(65.3) ^{bc}

3回の実験から得られた成績。

^{A, b, c} 異符号間の数値に有意差があり (P<0.05 : χ^2)

表2 : 卵胞細胞の添加、酸素分圧および培養法(静置および回転培養)がブタ未成熟卵子のMII率に及ぼす影響

酸素分圧	FC*	培養** 方法	培養 卵数	成熟卵数 (%:MII率)
5	-	S	115	90 (78.3) ^a
	+	S	103	18 (17.5) ^{b, d}
20	-	S	81	62 (76.5) ^a
	+	S	84	30 (35.7) ^c
5	-	R	104	34 (32.7) ^c
	+	R	93	63 (67.7) ^a
20	-	R	105	12 (11.4) ^d
	+	R	82	54 (65.9) ^a

*FC: 卵胞細胞添加(+)、無添加(-)

**S: 静置培養、R: 回転培養

^{A, b, c, d} 異符号間の数値に有意差があり (P<0.05 : χ^2)

実験2: ブタ未成熟卵子を、卵胞細胞を添加しない静置培養(S-)および、卵胞細胞を添加した回転培養(R+)を用いて成熟させて得られた体外成熟卵子の体外受精、および、その後の胚発生能について、それぞれ、表3および4に示した。

表3: 培養方法がブタ体外成熟卵子の体外受精に及ぼす影響

培養* 方法	供試 卵数	正常受精 卵数 (%)	雄性前核 形成率 (%)
S-	272	39 (27.3) ^a	76 (53.0) ^a
R+	260	71 (43.5) ^b	109 (66.6) ^b

**S-: 卵胞細胞を添加しない静置培養、R+: 卵胞細胞を添加した回転培養

^{A, b} 異符号間の数値に有意差があり (P<0.05 : χ^2)

表3に示すように、卵胞液に卵胞細胞を添加して未成熟卵子を回転培養すると、卵胞細胞を添加しないで静置培養した場合よりも、有意に高い正常受精率(単精子進入で雌雄両前核形成)および雄性前核形成率が得られた。

表4: 培養方法がブタ体外成熟卵子の体外受精後の発生能に及ぼす影響

培養* 方法	供試 卵数	発生率** (%)	
		2細胞期胚	胚盤胞期胚
S-	285	148 (51.5) ^a	11 (3.6) ^a
R+	272	185 (66.4) ^b	24 (8.9) ^b

*S-: 卵胞細胞を添加しない静置培養、R+: 卵胞細胞を添加した回転培養

**体外受精後48時間および7日目に、それぞれ、2細胞期胚および胚盤胞期胚への発生を調べた。

^{A, b} 異符号間の数値に有意差があり (P<0.05 : χ^2)

表4に示すように、卵胞液に卵胞細胞を添加して未成熟卵子を回転培養すると、卵胞細胞を添加しないで静置培養した場合よりも、有意に高い2細胞期胚および胚盤胞期胚への発生率が得られた。

以上の結果から、卵胞液は単独でブタ未成熟卵子の体外成熟培養液として用いることが出来る事が明らかになった。すなわち、ブタ未成熟卵子は、合成培地を用いることなく、ブタ卵子を回収する時に同時に回収される卵胞液中で成熟することが明らかになった。また、卵胞細胞を添加した回転培養が受精後の胚発生に効果的であることも明らかになった。これらの成果は、特に、合成培地を作成出来ない状況下で、ブタ未成熟卵子の体外成熟培養液として卵胞液を用いる事が出来ることを示している。遺伝資源として希少品種ブタを体外受精・クローン技術などによって維持・保存しようとする場合、現地において合成培地が手に入らない状況が考えられるので、本研究で開発された簡便な成熟培養方法は、非常に有効なブタ未成熟卵子の体外成熟培養方法となる。ただし、そのためには、今後、この手法で成熟させた卵子を体外受精に、雌豚に移植して産仔を得る必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Agung B, Piao Y, Fuchimoto D, Senbon S, Onishi A, Otoi T, Nagai T. Effects of oxygen tension and follicle cells on maturation and fertilization of porcine oocytes during in vitro culture in follicular fluid. Theriogenology 査読あり

[Epub ahead of print] (2010年1月7日)

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20060577?itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum&ordinalpos=1

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井 卓 (NAGAI TAKASHI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・研究管理監

研究者番号：20391378