

機関番号：10101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780286

研究課題名 (和文) 牛卵胞の体外培養系を用いた卵胞選抜機構の解明と野生動物種への応用

研究課題名 (英文) Elucidation of follicle selection system using bovine follicle culture and application for follicle and oocyte culture of wildlife

研究代表者

永野 昌志 (NAGANO MASASHI)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授

研究者番号：70312402

研究成果の概要 (和文)：牛卵巣および猫卵巣から発育途上にある卵子を採取して体外培養を行い、卵胞・卵子が発育あるいは退行していく機構の解明を目指した。その結果、卵胞・卵子の発育に必要な卵胞刺激ホルモンは高濃度すぎると逆に卵胞発育を抑制することが示され、卵胞から分泌されるエストラジオールは卵胞発育に不可欠であることが分かった。一方、近年卵胞の発育過程で重要な役割を果たしていると報告されている FGF7 は、培養初期の卵子発育と顆粒層細胞の増殖に関連している可能性はあるが、培養後期の卵胞・卵子には明らかな効果が認められないことが分かった。

研究成果の概要 (英文)：For clarification of mechanisms of follicular development and degeneration, growing oocytes were collected from bovine and feline ovaries and cultured in vitro. It was suggested that high concentration of follicular stimulating hormone inhibited the oocyte growth in vitro, and estradiol was essential for oocyte and follicular development. Fibroblast growth factor 7 stimulated oocyte growth and granulosa cell proliferation in early culture stage, but it did not have previous effects on growing oocytes in late culture stage.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、臨床獣医学

キーワード：臨床繁殖・産科

1. 研究開始当初の背景

近年、乳牛において人工授精の受胎率は低下の一途を辿っており、効率的な酪農経営を行う上で大きな問題となっている。受胎率の

低下は乳牛の高泌乳化による分娩後の牛体のエネルギーバランスの不均衡化等が原因であると考えられており、牛の状態が卵子の品質に影響を与えている可能性も考えられる。特に牛では卵子発育に40日以上必要で

あると考えられており、分娩前後の牛体のエネルギーバランスの不均衡は、卵胞が発育し卵子が発育能を獲得していく過程に大きな影響を与えていると考えられる。卵胞および卵子の発育過程を明らかにし、卵子が発育能を獲得するために必要な因子が解明されれば、卵子の体外発育培養系が確立されるのみならず、体内発育モデルとして用いることが可能となる。もし卵胞（卵子）が選抜され発育していく過程や機序が明らかになれば、卵胞発育に必要な因子を過剰排卵処理時に添加することによって、安定的な良質胚の採取が可能になる。

また、体外受精に関連した生殖補助技術は野生動物種の保護増殖に有効な手段と考えられている。猫科野生動物では若齢時に多くの動物が斃死することが知られているが、これらの動物から採取できる生殖細胞（卵子・精子）の利用についてはほとんど研究されていない。体外で発育させた卵子を用いた体外受精技術の開発は、希少野生動物の増殖にも役立つと考えられる。

2. 研究の目的

産業動物および希少野生動物から採取される卵子の発育能を解析する。また、より発育能の高い卵子を得るための方法開発を行うとともに、そのままでは体外受精に使用することのできない発育途上にある卵子を体外で発育させることによって体外受精可能な卵子を効率良く得る方法を開発する。

3. 研究の方法

(1) 牛卵巣皮質から直径 1 mm 以下の初期胞状卵胞を単離・破碎して卵丘卵子顆粒層複合体 (COGC) を採取し、96 穴プレートを用いて最大 16 日間発育培養 (IVG) を行う。培養した COGC については、培養後の生存率、培養過程での成長（卵子直径）、顆粒層細胞の増加、発育卵子の核成熟能および体外受精後の発育能について検討を行う。発育培養へのホルモンや成長因子の添加の有無および添加濃度についても検討する。

(2) 春期発情前の様々な日齢の若齢猫の卵胞発育について組織学的に検討するとともに、それら卵胞から採取される卵子の発育能について検討を行う。卵胞の発育状態と卵子の発育状態（卵子直径）の関連を調べるとともに、得られた卵子の発育能（核成熟能）について検討を行う。より発育能の高い卵子を選別するために、卵子の周囲を覆う卵丘細胞の正常性と卵子発育能の関係について検討する。

4. 研究成果

(1) 牛 COGC の発育培養に用いる IVG 培地には、0、1、10、100 および 2000 ng/ml の FSH を添加した（それぞれ FSH 0、FSH 1、FSH 10、FSH 100 および FSH 2000 群）。14 日間培養後の生存 COGC は体外成熟 (IVM) 培養 (22 h) 行い、核成熟能の検討を行った。IVG 後の生存 COGC 率は、FSH 0 および FSH 2000 群に比べて FSH 1、FSH 10 および FSH 100 群で高い傾向にあった (図 1)。

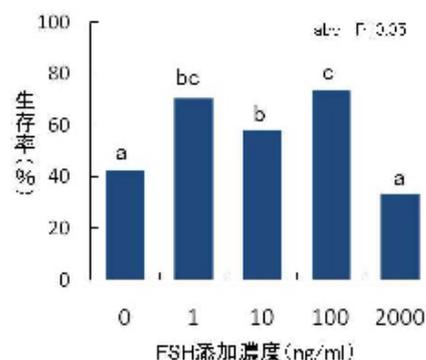
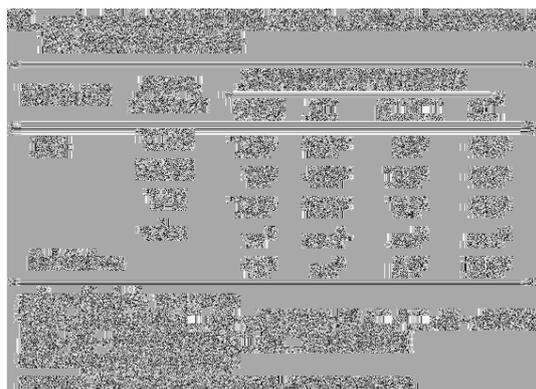


図1. IVG培地へのFSH添加がCOGCの生存率に与える影響

卵子直径は、培養期間中に全ての実験群で増加したが、IVG14 日後の卵子直径は FSH 2000 群が他の群と比べて小さかった。IVM 後の MII 率は、全ての実験群において差が認められなかった。次に IVG 培地にエストラジオール (E2) 無添加、0.1 あるいは 1 μg/ml 添加と FSH を無添加または 0.1 μg/ml 添加により 6 群 (エストロゲン/FSH: 0/0、0/0.1、0.1/0、0.1/0.1、1/0 および 1/0.1) を設定した。培地に E2 および FSH を添加しなかった 0/0 群では全ての卵子が IVG 前の卵子直径に関わらず培養 14 日目までに死滅した。同様に、FSH のみを添加した 0/0.1 群においても全ての卵子が培養 14 日目までに死滅した。E2 添加した 4 群において、1/0.1 群の生存 COGC 率は他の 3 群に比べて高かった。E2 添加した 4 群で卵子直径が IVG により増加した。IVG 後の卵子直径は低 E2 濃度の 2 群で高濃度の 2 群に比べて小さかった。E2 添加した 4 群において、生存 COGC 内の卵子の MII 率に差は認められなかった (表 1)。



本研究から、IVG 培地に 1 および 100 ng/ml の FSH を添加することにより牛の初期胞状卵胞由来の卵子（直径 100 μm 未満）の体外生存率を改善できることが示された。また、高濃度（1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）の E2 添加により卵子直径が増加することが示された。しかし、得られた体外発育卵子の核成熟能は改善されなかった。

次に、COGC を線維芽細胞成長因子 7 (FGF7) 添加あるいは無添加で 16 日間培養を行い、卵子の発育と顆粒層細胞の増殖を調べた。その結果、FGF7 添加区では無添加区に比べて卵子直径が増大し、顆粒層細胞数が増加する傾向がみられた（図 2）。しかし、FGF7 添加の

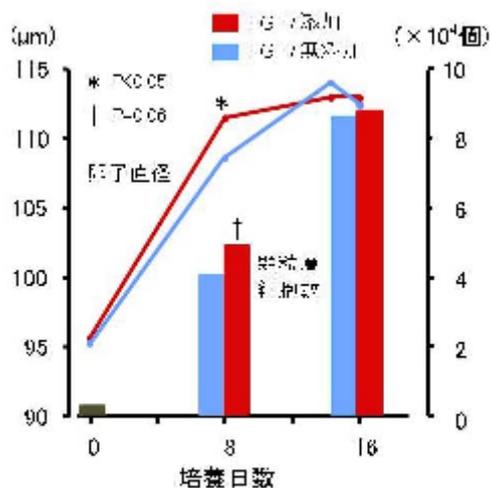


図2. FGF7添加がOCGの顆粒層細胞数と卵子直径に与える影響

有無にかかわらず培養 14 日目以降に COGC の生存率は大きく低下した。次に、FGF7 添加あるいは無添加で 14 日間培養した卵子を 3-isobutyl-1-methylxanthine 添加培地を用いて 20 時間前培養した後、成熟培養を行った。その結果、FGF7 添加の有無にかかわらず、前培養の後に成熟培養を行った卵母細胞は体内発育卵母細胞と同等の高い核成熟率を示した。これらの卵母細胞の体外受精後の発生能を調べた結果、FGF7 添加の有無にかかわらず、前培養を行わなかった卵子に比べて体外受精後の卵割率および胚盤胞への発生率が高くなることが示された。初期胞状卵胞由来牛卵子の培養に関する報告は国内外ともにほとんどなく、年に数例ある程度で、研究はほとんど進んでいない。また、体外で発育させた卵子の核成熟能は 20~50%程度であり、体内発育卵子の 100%近くが核成熟するのに比べて著しく低いのが現状である。本研究では、発育培養に添加するホルモン量を精査することにより、培養 COGC の生存率を向上させることに成功し、さらに体外発育卵子の成熟培養法を新たに開発することに

よって核成熟率を体内発育卵子と同等にまで向上させることに成功した。

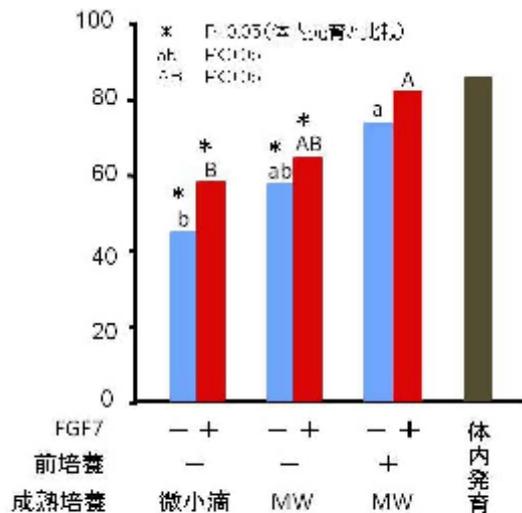
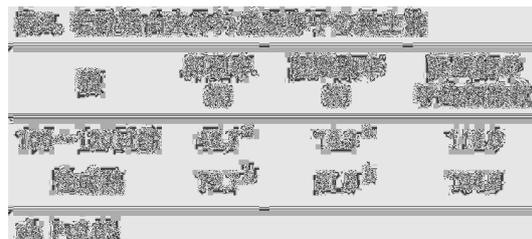


図3. 微小滴あるいはマイクロウェルを用いて成熟培養した体外発育卵子の核成熟率

(2) 生後 20 日以前から約 120 日齢までの子猫卵巣を用いて卵胞・卵子の発育動態と採取される卵子の発生能について検討を行った結果、生後 20~40 日程度で全ての検査個体において胞状卵胞が確認された。しかし、この時期の胞状卵胞は平均直径 300 μm 以下と小さく、体外受精を行うための卵子を採取することが困難であった。生後 100 日程度の子猫の状卵胞の平均直径は約 400 μm となり体外受精に使用可能な卵子を採取することが出来た。これらの卵子の核成熟率は性成熟猫と比べて低いものの、受精後正常に卵割した卵子については受精後の胚盤胞への発生能は性成熟猫由来卵子と同等であった（表 2）。



また、卵子の直径増加に伴って卵子発生能が向上することを明らかにするとともに、卵子周囲を覆う卵丘細胞の膜機能を評価することによって発生能の高い卵子を簡便に選別する方法を開発した。若齢動物由来の卵子の発生能についてはほとんど報告がなく、その有効利用法は示されていなかったが、本研究の結果はこれらの有効活用について重要な知見を提供した。

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 6 件）

① Uchikura, K., Nagano, M. and Hishinuma, M.: Prediction of maturational competence of feline oocytes using supravital staining of cumulus cells by propidium iodide. *Zygote*, in press (2011). 査読有

② Uchikura, K., Nagano, M. and Hishinuma, M.: The effect of ovarian status and follicular diameter on maturational ability of domestic cat oocytes. *The Journal of Veterinary Medical Science*, in press (2011). 査読有

③ 永野昌志, 内倉健造: 野生猫科動物への人工繁殖技術の応用. 北海道獣医師会雑誌, 55: 121-127, 2011. 査読無

④ Uchikura, K., Nagano, M. and Hishinuma, M.: Evaluation of follicular development and oocyte quality in prepubertal cats. *Reproduction in Domestic Animals*, 45: e405-e411, 2010. 査読有

〔学会発表〕（計 1 件）

① 永野昌志: 猫卵子の体外成熟培養に関する研究, 第 149 回日本獣医学会学術集会, 2010 年 3 月 26 日、日本獣医生命科学大学（東京）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.vetmed.hokudai.ac.jp/organization/theriogenol/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永野 昌志 (NAGANO MASASHI)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授
研究者番号: 70312402

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし