

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月13日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21380175

研究課題名（和文）原始卵胞卵子の超低温保存と個体再生システムの開発

研究課題名（英文）Cryopreservation and improvement of developmental ability of porcine primordial oocytes

## 研究代表者

金子 浩之（Kaneko Hiroyuki）

独立行政法人 農業生物資源研究所 発生分化研究ユニット 上級研究員

研究者番号：60343993

研究成果の概要（和文）：原始卵胞卵は個体を再生する重要な資源となり得るが、保存し胚・胎子にまで発生させることは困難である。本研究では、新生子期のブタ卵巣を用いて、異種間移植、体外培養および顕微操作を組み合わせることによって、原始卵胞卵からの胚発生率を格段に向上させることに成功した。さらに、超低温保存においては、原始卵胞卵が受精能を保持し得るガラス化冷却条件を明らかにした。これらの手法は、稀少動物等の原始卵胞卵から個体を再生する上で必須である。

研究成果の概要（英文）：Primordial follicles act as stores for ovarian follicles and are a potential resource of oocytes for medical, agricultural and zoological purposes. In the present study, we have demonstrated that fusion of cytoplasts prepared from competent porcine oocytes enhances the developmental ability of oocytes derived from porcine primordial follicles grafted into nude mice. We also have explored a vitrification protocol that allows porcine ovary tissue to maintain its ability to produce antral follicles after xenografting. Oocytes retrieved from porcine xenografts were proven to have the abilities of *in-vitro* maturation and fertilization. These methods are necessary for utilization of primordial oocytes in large mammals.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2011年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2012年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

## 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：原始卵胞卵、異種間移植、体外培養系、顕微操作、ガラス化冷却、超低温保存

## 1. 研究開始当初の背景

原始卵胞は個体のライフサイクルのいかなる時期の卵巣にも多数存在している。そこに含まれる卵（原始卵胞卵）は、雌側の遺伝情報を伝える器として重要な遺伝資源である。しかしながら、極めて未発育であるため発生

能を持たない。これまで、未発育卵に発生能を付与する目的で、卵胞を体外で培養することで卵を発育させる培養法と、卵巣を免疫不全動物に移植しその体内で卵の発育を進行させる異種間移植が試みられてきた。中、大型哺乳動物の原始卵胞卵は、生体内において

発生能を獲得するまで 60 日以上要することから、培養系で原始卵胞卵の発育を完結させた報告はない。一方、異種間移植に関しては、Gosden ら[1]がヒツジの卵巣を免疫不全マウスに移植することによって、未発育な卵胞を胞状卵胞へと発育させ得ることを示した。それ以降、異種間移植が未発育な卵を人為的に発育させる有力な手法と期待され、ヒト、家畜および野生動物の卵巣が免疫不全動物に移植された。しかしながら、幼若マウスの卵巣を遺伝的な距離が近いヌードラットへ移植した例において、移植卵巣由来の産仔が得られたのみで[2]、他の哺乳動物種の移植例では、卵の発生能に関する知見は非常に少なかった。

これまで、私たちはブタをモデル動物として、異種間移植を利用して原始卵胞卵に発生能を付与することを試みてきた。卵胞のほとんどが原始卵胞で占められる新生仔ブタ卵巣を免疫不全マウスに移植し、さらにマウスに持続的に卵胞刺激ホルモン(FSH)を投与することで、移植卵巣内の卵胞発育をブタ体内のものに近似させた。その結果、原始卵胞卵を多数発育させ、体外培養系で受精能を獲得させることに初めて成功した[3, 4]。さらにそれらの受精卵は少数(1%)ではあるが初期胚(胚盤胞)へと発生した。次いで、マウスから回収したブタ発育卵の胚発生能を向上させるため融合卵の作製を試みた。マウスから回収したブタ卵に、ブタ体内で発育した卵(屠場卵巣から採取し個体発生能を有する)の細胞質小片を融合させた(融合卵の作製、図1)。

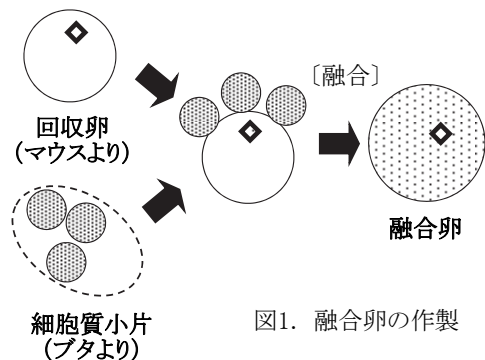


図1. 融合卵の作製

その結果、単為発生ではあるが、融合卵の胚発生率は20%、胚の平均細胞数は40個に到達し、通常の体外生産胚に劣らない発生能が達成できる可能性が示された。この結果は、マウス体内で発育させ回収したブタ卵は受精はするものの、細胞質の成熟が完全ではないため、細胞質小片の融合によって、細胞質成熟が改善されたものと解釈できる。

一方、原始卵胞卵を活用するためには、卵巣組織の超低温保存法の開発も必要不可欠である。近年、急速冷却によって細胞内の液体が氷晶を形成せず細胞をガラスのように

固化させる冷却法(ガラス化冷却)が注目されている。私たちのグループではブタ受精卵をガラス化し超低温下で保存し、加温後、産仔へと発生させることに成功しており[5]、ガラス化冷却は原始卵胞卵の超低温保存にとって有望であると予想された。

## 2. 研究の目的

本研究においては、(1)細胞質融合の改良等を用いてマウスから回収したブタ発育卵の受精後の発生能を改善すること、および(2)卵の発生能が維持されうるブタ卵巣組織の超低温保存法の開発、を試みた。

### (1) ブタ回収卵の発生能の向上

遠心操作によって作製した細胞質小片は、ミトコンドリア等の細胞内小器官を多く含んだ褐色小片、およびほとんど含まない透明小片に大別される(図2)。両者の違いはミトコンドリア等の細胞小器官の含量によるものである(Linh et al. 未発表データ)。近年、エネルギー産生のある場であるミトコンドリアの量あるいは活性が受精後の卵の発生能と関連があることがブタ等において報告され

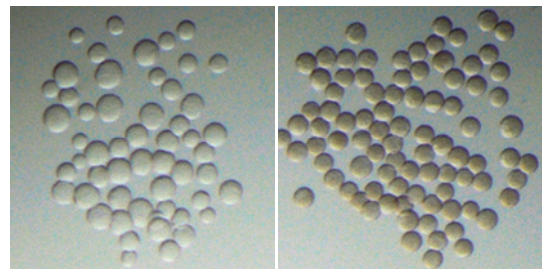


図2. 透明(左)および褐色細胞質小片(右) ている[6, 7]。

そこで本研究においては、まず、①融合させる細胞質小片の数によって回収卵の発生能が変化するかを検討した。次いで、②褐色細胞質小片あるいは透明小片を融合させた場合、回収卵の発生能に差異が現れるかを観察した。さらに、③脂肪酸をミトコンドリア内部に運びミトコンドリアの活性を高めるL-カルニチンが回収卵の発生能に及ぼす影響についても検討を加えた。

### (2) 原始卵胞卵の超低温保存法の開発

ブタ受精卵の超低温保存においては、発生能の保持にガラス化冷却は有効であるが[5]、原始卵胞を含む卵巣組織に関しては、知見がほとんどない。本研究では、ブタ受精卵のガラス化に用いた手法が、卵巣の冷却に有効であるか、および超低温保存後の原始卵胞卵の発生能は保持されるか、を検討した。

## 3. 研究の方法と胚発生能

### (1) ブタ回収卵の発生能の向上

①細胞質小片の融合数が回収卵の胚発生能に及ぼす影響

原始卵胞から構成される生後 20 日齢のブタ卵巣皮質を細切し、卵巣を摘出したヌードマウスの腎皮膜下に移植した。膈開口後 60 日前後のマウスに、浸透圧ポンプを用いて持続的に FSH を投与することで、移植卵巣内の卵胞の発育を促進させた[4]。移植卵巣から卵を採取し、直径 115  $\mu\text{m}$  以上に発育した発育卵を選び、体外培養系で MII 期にまで成熟させた。一方、通常のブタ卵を屠場卵巣より採取し MII 期にまで成熟させた後、Fahrudin ら[8]の方法に基づきパーコールの濃度勾配溶液内で遠心し小片化した。核板を含まない細胞質小片を選び、小片を色調によって分別せずランダムに、1 または 3 個ずつ、MII 期の回収卵に電気融合させた。融合卵を体外受精した後、体外発生系において初期胚への発生率および胚の質（細胞数）を解析した。また比較のために、回収卵に細胞質小片を融合させずに体外受精を行い、その後の発生を観察した。

②細胞質小片の性質が回収卵の胚発生能に及ぼす影響

①の実験と同様にマウスより回収したブタ原始卵胞由来の発育卵を体外培養系で MII 期にまで成熟させた。一方、通常のブタ卵を MII 期にまで成熟させた後、パーコールの濃度勾配溶液内で遠心し小片化した。核板を含まない細胞質小片を選び、さらに小片を褐色細胞質小片と透明細胞質小片に分けた。それぞれの細胞質小片を実験①の結果に基づき、3 個ずつ MII 期の回収卵に電気融合させた(図 3)。

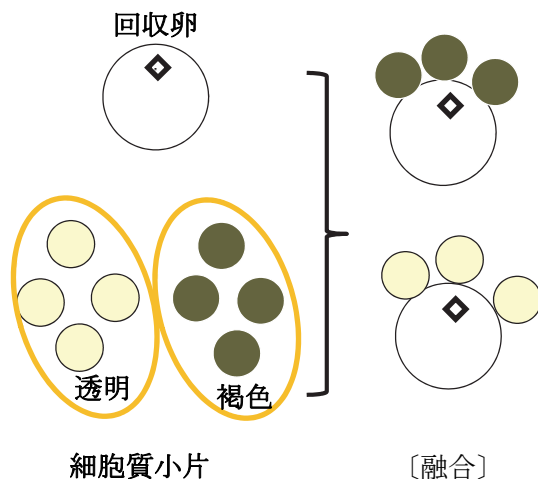


図 3. 細胞質小片の分別と融合

③L-カルニチンの添加が回収卵の発生能に及ぼす影響

ヌードマウスに移植したブタ卵巣から発育卵を（直径 115  $\mu\text{m}$  以上）を採取した。体外成熟培地に 0 または 10 mg/ml の L-カルニチ

ンを添加し 46 時間培養した（成熟培養）。成熟培養後、各用量区の卵の核相（減数分裂の再開の有無）を解析した。次いで、核相が MII 期に移行した卵（成熟卵）を選び体外受精を行い、培養後 7 日目に初期胚への発生率および胚の質（細胞数）を解析した。

(2)原始卵胞卵の超低温保存法の開発

ガラス化液は組織に浸透して耐低温性を与える反面、室温では浸漬時間に応じて細胞毒性を有する。卵巣は種々の組織で構成され均一でないために、原始卵胞卵に対して浸透時間が十分で、かつ細胞毒性が少ない最適な浸漬時間を明らかにする必要がある。そこで原始卵胞から構成される生後 20 日齢のブタ卵巣を 1 から 2mm 角に細切し、エチレングリコール、ポリビニルピロリドンおよびトレハロースを含んだガラス化液に 45 秒、7 分および 15 分間浸漬させた。卵巣組織片を液体窒素上に浮かべたアルミホイルの上で超急速に冷却した。固化（ガラス化）した卵巣小片を液体窒素内に超低温保存した。液体窒素内で 30 日以上保存した後、原始卵胞の生存性を明らかにするために、保存した卵巣小片を処理区毎に 20-25 匹のヌードマウスの腎皮膜下に 25 個ずつ移植し、我々の既報[4]に従いマウスに卵胞刺激ホルモンを投与することによって移植卵巣内の卵胞発育を促進した。移植卵巣内の卵胞の発育状況は組織学および内分泌学的に解析した。移植卵巣より卵を採取し形態（卵丘細胞の付着の有無等）を観察した後、体外培養系を用いて、MII 期に移行する能力（成熟能）および受精能の有無を検討した。

4. 研究成果

(1) 融合卵の作製条件の検討

①細胞質小片の融合数が回収卵の胚発生能に及ぼす影響

36 匹のヌードマウスから 889 個の直径 115  $\mu\text{m}$  以上のフルサイズに達した卵が回収され、体外成熟後 333 個が MII 期に移行した（成熟率 37.4%）。このうち 210 個の原始卵胞由来の成熟卵を用いて融合卵の作製を試みた。51 個の成熟卵に細胞質小片を 1 個融合させ（1 個区）、159 個の成熟卵には細胞質小片を 3 個融合させた（3 個区）。また、73 個の成熟卵には細胞質小片を融合させなかった（0 個区）。1 個区では 51 個のうち 43 個が融合に成功し（融合率 84%）、3 個区では 159 個のうち 76 個が融合に成功した（融合率 48%）。体外受精後 7 日間の体外培養の結果、3 個区では 6 個が胚盤胞（図 4）へと発生した（胚発生率 8% (6/76)）。これらの胚盤胞の細胞数は 10 から 126 であった（平均細胞数； $56 \pm 20$ （標準誤差））。しかしながら 0 個区および 1 個区では胚発生は認められなかった。以上の結果か

ら、ヌードマウス体内で発育させたブタ卵に胚発生能を付与するためには、屠場卵巣由来の成熟卵の細胞質小片の融合は1個では不十分であり、3個融合することが必要であることが示された。

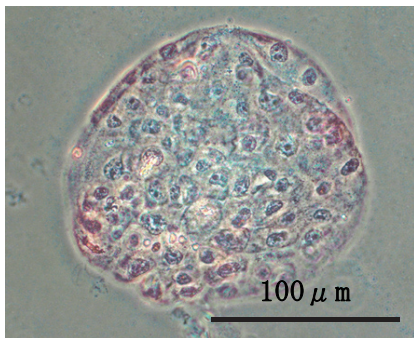


図4. 融合卵からの胚発生 (細胞数100)  
(細胞質小片3個融合)

### ②細胞質小片の性質が回収卵の胚発生能に及ぼす影響

21匹のヌードマウスから520個の直径115 $\mu$ m以上のフルサイズに達したブタ卵が回収され、体外成熟後155個がMII期に移行した(成熟率30%)。屠場ブタ卵から遠心操作によって調整した細胞質小片を褐色細胞質小片と透明細胞質小片に分け、それぞれ3個ずつ、融合させた。褐色細胞質小片と透明細胞質小片のそれぞれの融合率(融合卵の作製率)は、74%(59/80)および54%(13/24)であった。体外受精・培養の結果、褐色細胞質小片からなる融合卵は59個のうち3個が胚盤胞へ発生し(胚発生率5%)、透明細胞質小片からなる融合卵は13個のうち5個が胚盤胞へ発生した(胚発生率38.5%)。胚盤胞の細胞数は20~50個であった。マウス由来のブタ卵の胚発生率が1%であった我々の既報[4]に比べれば胚発生率は増加した。しかしながら、当初の予想とは異なり、細胞小器官が少ない透明細胞質小片を融合した場合において、褐色細胞質小片の融合時より高い胚発生率を示す傾向があり、発生率の改善にはミトコンドリア量の変化ばかりではなく、ミトコンドリアの機能変化あるいはATP等の細胞質成分の関与も窺われた。

### ③L-カルニチンの添加が回収卵の発生能に及ぼす影響

21匹のヌードマウスから583個の直径115 $\mu$ m以上のフルサイズに達したブタ卵を回収し、半数を10mg/mlのL-カルニチンを添加した成熟培地(添加群)で、半数をL-カルニチンを添加しない成熟培地(無添加群)で46時間培養した。培養後の卵の成熟率はカルニチン添加群では40.8 $\pm$ 9.6%(4反復の平均値 $\pm$ 標準誤差)、無添加群では42.8 $\pm$ 9.9%であり、両群間に有意差は観察されなかった。つ

いで、これらの成熟卵に体外受精を行い培養7日後の初期胚の発生率を観察した結果、両群とも初期胚の発生は観察されなかった。カルニチン添加によっても胚発生は観察されなかった本実験の結果から、これまで明らかにした細胞質小片の融合による発生率の改善には、ミトコンドリアではなく、サイトゾルに含まれる可溶性のメッセンジャーRNAおよびタンパク質等の関与が示唆された。

### (2)原始卵胞卵の超低温保存法の開発

卵巣組織の移植後、移植組織内の胞状卵胞の発育を示すマウスの膣開口率は45秒区では43.5%(10/23匹)、7分区では42.9%(9/21匹)、および15分区では33.3%(7/21匹)であった(図5)。45秒区では8匹のマウスから卵丘細胞に覆われた直径115 $\mu$ m以上のフルサイズに達した卵が59個(マウスあたり6.6 $\pm$ 1.4個(平均値 $\pm$ 標準誤差))、7分区では7匹のマウスからフルサイズ卵が38個回収された(マウスあたり4.8 $\pm$ 1.9個)(図5)。一方、15分区では1匹のマウスから変性卵が1個のみ回収された。体外培養後、45秒区では33.9%(20/59個)の卵が成熟し、そのうち84.2%(16/19個)が受精した。一方、7分区では50%(19/38個)の卵が成熟し、そのうち78.9%(15/19個)が受精した。15分区の変性卵の体外培養は実施しなかった。

卵胞の発育状況のマーカーとして、膣が開いたマウスの末梢血中インヒビン濃度を測定すると、45秒区では10.5 $\pm$ 1.4ng/mlおよび7分区では9.2 $\pm$ 1.4ng/mlであったが、15分区では1.5 $\pm$ 0.3ng/mlと明らかな低値を示した。以上の結果から、卵巣組織をガラス化液に45秒から7分間浸漬し冷却した場合には、原始卵胞はヌードマウスに移植することで胞状卵胞へと発育し、さらにそこに含まれる卵が成熟能および受精能を有することが明らかとなった。一方、15分間ガラス化液に浸漬した場合には、卵胞の発育が著しく阻害され、ガラス化液の毒性の影響が窺われた。

大型哺乳動物の原始卵胞卵をヌードマウスに移植し適切なホルモン処理を加えることによって卵を人為的に発育させることは可能であるが、卵の胚発生率は1%に過ぎなかった[4]。本研究において、マウスから回収したブタ卵に、ブタ体内で発育した卵の細胞質小片を融合させる融合卵の作製によって、回収卵の胚発生率を格段に向上させることに成功した(8%)。得られた胚の平均細胞数は56個であり、胚の移植によって産子への発生に必要とされる細胞数(40個、[9])に到達している。このように、大型哺乳動物の原始卵胞卵からでも、異種間移植、体外培養および顕微操作を組み合わせれば、質の高

い胚を作製し得ることが初めて明らかとなった。また、卵巣のガラス化冷却条件を検討し、超低温保存後においても原始卵胞卵が受精能を保持できることを、大型の哺乳動物では初めて実証した。これらの成果は、原始卵胞卵を活用する上で必須のステップである。今回の研究では原始卵胞卵由来の初期胚を成雌ブタへ移植するまでには至らなかったが、超低温保存した卵巣から得た融合卵を成雌ブタへ移植することによって産仔生産が可能となれば、原始卵胞卵をターゲットする生殖細胞の保存・個体再生という新規システムの実現が期待できる。

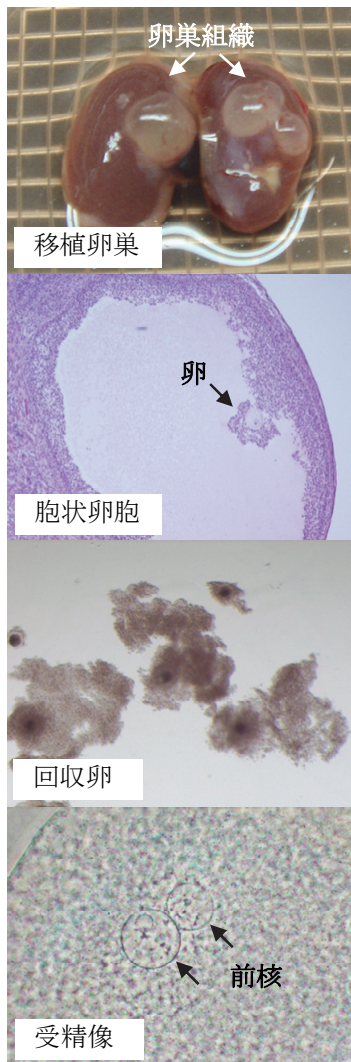


図 5. 超低温保存後に移植した卵巣および卵胞の発育像、および回収卵とその受精像（45秒区）。

#### 参考文献

1. Gosden et al. J Reprod Fertil 1994; 101: 619-623.
2. Snow et al. Science 2002; 297:2227.
3. Kaneko et al. Biol Reprod 2003; 69: 1488-1493.

4. Kaneko et al. Reprod 2006; 131:279-288.
5. Somfai et al. Biol Reprod 2009; 80: 42-49.
6. El Shourbagy et al. Reprod 2006; 131: 233-245.
7. Sun et al. Reprod 2001; 122:155-163.
8. Fahrudin et al. Cloning Stem Cells 2007; 9:216-218.
9. Kragh et al. Theriogenology 2005; 64:1536-45.

#### 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7件)

- ① Kaneko H, Kikuchi K, Nakai M, Tanihara F, Noguchi J, Noguchi M, Ito J, Kashiwazaki N. Normal reproductive development of offspring derived by intracytoplasmic injection of porcine sperm grown in hoist mice. Theriogenology 2012;78:898-906. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.04.004. 査読有り。
- ② Kikuchi K, Nakai M, Kashiwazaki N, Kaneko H. Xenografting of gonadal tissues into mice as a possible method for conservation and utilization of porcine genetic resources. Anim Sci J 2011;82:495-503. doi: 10.1111/j.1740-0929.2011.00919.x. 査読有り。
- ③ Viet Linh N, Kikuchi K, Nakai M, Noguchi J, Kaneko H, Dang-Nguyen TQ, Maedomari N, Nguyen BX, Nagai T, Manabe N. Improvement of porcine oocytes with low developmental ability after fusion of cytoplasmic fragments prepared by serial centrifugation. J Reprod Dev 2011;57:620-626. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/57/5/57\\_11-053H/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/57/5/57_11-053H/_article). 査読有り。
- ④ Nakai M, Kashiwazaki N, Ito J, Maedomari N, Ozawa M, Shino M, Noguchi J, Kaneko H, Kikuchi K. Factors affecting fertilization and embryonic development during intracytoplasmic sperm injection in pigs. J Reprod Dev 2011;57:183-187. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/57/2/57\\_10-200E/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/57/2/57_10-200E/_article). 査読有り。
- ⑤ Nakai M, Kaneko H, Somfai T, Maedomari N, Ozawa M, Noguchi J, Ito J, Kashiwazaki N, Kikuchi K. Production of viable piglets for the first time using sperm derived from ectopic testicular

xenografts. *Reprod* 2010;139:331-335.  
doi: 10.1530/REP-09-0509. 査読有り。

- ⑥金子浩之、中井美智子、菊地和弘、ヌードマウス体内におけるブタ原始卵胞の発育と卵の発生能、*J Reprod Enginer* 2010;13:1-6. [http://sre.ac.affrc.go.jp/Contents/Vol\\_13/13\\_Kaneko.pdf](http://sre.ac.affrc.go.jp/Contents/Vol_13/13_Kaneko.pdf). 査読有り。
- ⑦金子浩之、家畜の未成熟生殖細胞利用の現状と展望、*畜産技術* 2010;657:15-17.  
[http://jlta.lin.gr.jp/publish/chikusan/chiku\\_back/h22.html#page\\_top](http://jlta.lin.gr.jp/publish/chikusan/chiku_back/h22.html#page_top). 査読有り。
- ⑧Nakai M, Kaneko H, Somfai T, Maedomari N, Ozawa M, Noguchi J, Kashiwazaki N, Kikuchi K. Generation of porcine diploid blastocysts after injection of spermatozoa grown in nude mice. *Theriogenology*. 2009;72:2-9. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.10.020. 査読有り。

[学会発表] (計3件)

- ①金子浩之、マウス体内におけるブタ卵胞の発育と卵の発生能、日本生殖工学会、2010年3月、明治大学。
- ②菊地和弘、金子浩之、柏崎直巳他3名、異種移植によるブタ雄性生殖細胞の保存・利用、第41回精子研究会、2009年12月、東京大学。
- ③Kikuchi K, Kaneko H, Nakai M, Noguchi J, Kashiwazaki N. An approach for conservation of pig resources by xenografting of gonadal tissue to mice. The 4th Congress of Asian Pig Veterinary Society. 2009年10月、エポカルつくば。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

金子 浩之 (Kaneko Hiroyuki)  
独立行政法人・農業生物資源研究所・動物科学研究領域・動物発生分化研究ユニット・上級研究員  
研究者番号：60343993

### (2) 研究分担者

菊地 和弘 (Kikuchi Kazuhiro)  
独立行政法人・農業生物資源研究所・動物科学研究領域・動物発生分化研究ユニット・上級研究員  
研究者番号：20360456

### (3) 研究分担者

柏崎 直巳 (Kashiwazaki Naomi)  
麻布大学・獣医学部・教授  
研究者番号：90298232