

哺乳類の胚操作と畜産への応用と将来(132)

誌名	畜産の研究 = Animal-husbandry
ISSN	00093874
著者名	菅原,七郎
発行元	養賢堂
巻/号	67巻2号
掲載ページ	p. 259-262
発行年月	2013年2月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



哺乳類の胚操作と畜産への応用と将来 (132)

X X X VIII ネコ科の ARTs と胚操作

菅原 七郎 *

D. ネコ卵子の *in vitro* 発生

ネコの胚操作をしていくには、他動物におけるのと同様、操作する卵子をいかに効率よく得ることができかが基本課題の1つであり、*in vivo* と *in vitro* でいかに効率よく卵子を得るかが重要である。

In vivo の成熟卵子の採取については多排卵子の項で述べた如くであるが、*in vitro* の生産 (IVMFC) を行うためには、不妊摘出卵巣を利用することが多く、卵胞内卵子の状況 (卵胞の大きさと卵子成長)、つまり卵子形成や成熟卵子の形態的特性などを理解しておくことが肝要である。

a) ネコ卵子と成熟可能卵子

イ) 卵胞の大きさと卵子の成長との関係 :

卵胞の発育状況と卵子の成長度合について不妊手術で摘出した卵巣を用いて新鮮生状態で計測した報告²⁹⁾がある。

採取卵巣からまず 1.0mm 以上の卵胞を周囲の結合組織を除去して DMEM 液に取り出し、直径を測定して、卵胞から卵子を取り出し、卵胞細胞を除去後卵子の直径を測定して卵胞の大きさと卵子の成長の関係を調べている。

0.05mm 大の一次~二次細胞内卵子は $29.7 \pm 3.4 \mu\text{m}$ で透明帯 (ZP) が $0.1 \pm 0.05 \mu\text{m}$ である。0.15~0.20mm の二次後期卵胞では卵母細胞は $97.5 \pm 1.64 \mu\text{m}$ に成長し、ZP も $4.9 \pm 1.13 \mu\text{m}$ になる。0.20~0.30mm 卵胞では卵子は $120.7 \pm 0.78 \mu\text{m}$ 、ZP は $28.5 \pm 0.38 \mu\text{m}$ と成長するが、卵胞が 1.00~4.00mm に大きくなっても卵母細胞は 120.7 ± 0.69 、ZP は $28.5 \pm 0.38 \mu\text{m}$ であり、卵胞が成長しても卵子の成長はほとんどない。

この卵胞と卵母細胞の成長過程、とくに排卵時の大きさに達する時期の卵胞と卵子の成長との関係は他の動物種と基本的に全く同様であるが、卵母細胞はそれぞれ種特有の大きさである。

ロ) ネコ卵子の大きさ :

これまでネコ卵子の大きさは $120 \sim 130 \mu\text{m}$ とされていたが 2mm 以上の卵胞内卵母細胞の大きさは透明帯を除いて $128.3 \pm 0.79 \mu\text{m}$ であり、ウシ卵子と比べ、より少し大きいことが示されている。

卵細胞質はイヌ、ブタのそれと比べ脂質は少なく黒色顆粒は均一に分布しているため、光学顕微鏡では卵細胞質は暗黒色をしている。

透明帯は他の動物種と比べ厚い。その形成過程は原始卵胞では $0 \mu\text{m}$ で一次卵胞期になると $4.4 \mu\text{m}$ になり、二次卵胞では $8.9 \mu\text{m}$ に成長し、三次卵胞期で $14.2 \mu\text{m}$ に達し、胞状卵胞初期には排卵時とほぼ同じ $27.6 \pm 1.27 \mu\text{m}$ になる。

ハ) 卵子の成長度合と *in vitro* 成長能 :

in vitro で成熟 (M-II) を完了し得る卵胞内卵子は基本的に排卵時の大きさまで成長したものであることが明らかにされている。

これまでの卵胞発育と卵子の成長との研究から、どの動物種でも三次卵胞後期 (卵胞の大きさは動物種で異なる) であれば、卵母細胞はほぼ排卵時の大きさに達していることがよく知られている事実である。

ネコでの詳細な研究はほとんどないが、4℃の保存卵巣から採取した卵母細胞の IVM での結果、卵母細胞の直径の大きさと M-II 期への達成率には密接な関係があり、直径が大きい方が核成熟 (M-II) を完了する割合が高い³⁰⁾。

b) ネコ卵子の初期発生

ネコ卵子の初期発生は 1924 年、Hill & Tribe によって報告されたのが最初である。その後、初期発生については 1988 年 IVF による初期発生が観察された³¹⁾。その後 *in vivo* 発生については 1994 年に報告³²⁾されており、初期発生速度は *in vivo* と *in vitro* で 16 細胞期までほぼ同様に経過して、桑実胚、胚盤胞形成期から *in vitro* では少し細胞周期が遅れるとされている (図 38-2)。

*Ecos 研究所 (Shichiro Sugawara)

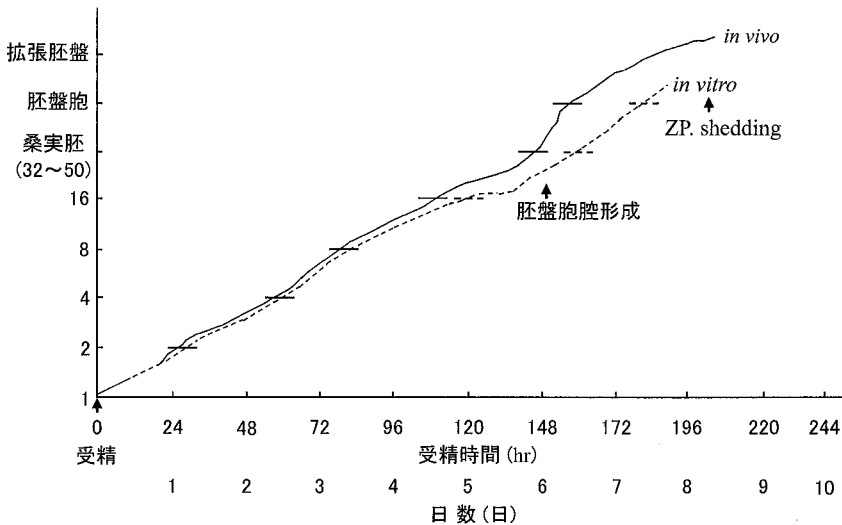


図 38-2 ネコ卵子の初期発生(原著)

ネコでの前核期は初回分裂時間帯(20~30 時間)から推測して他動物種と比べてほぼ同じといえるが4細胞期への分裂は64時間であることから、約10~16時間遅い細胞周期である。8~16細胞期への発生は他動物種とほぼ同じである。

コンパクションは148時間くらい(桑実胚32~50細胞)で起こり、胚盤胞腔の形成も見られる。この時期の桑実胚—胚盤胞は<60細胞数くらいとされている。

受精卵子は桑実期/胚盤胞期(6日)に子宮に到達して、11日目に透明帯から脱出する。子宮内膜への接着(着床開始)は13~14日目に起こる。

C) IVMFC

ネコ卵子のIVM(体外成熟法)、IVF(体外受精)、IVC(体外培養法)は1978年、最初のET報告²⁶⁾以来、徐々に進展してきて、ガラス化保存卵母細胞のIVMFCによる胎子も得られるようになった。

IVMFCはネコ胚の操作を容易にするものであり、ICSI、SCNT法はネコ科の絶滅危惧種などの保全や保護技術としても利用することができる点で、IVMFC法の確立は極めて重要である。

i) IVM

1989年、MEM培地を用い行われたネコ卵胞卵子のIVMに関する報告²¹⁾が最初である。

この報告では52時間の培養卵子の発生開始率が最も良く、36%であったが、胚盤胞までの発生は得られていない。

その後、同じ培地で16、24、32、40、48時間培養では32時間の卵子が発生率69.4%で最も良く、胚盤胞への発生も極少であるが得られている。

なお、ネコ卵胞内卵子は*in vitro*ではGTHやステロイドホルモンが無くても自然に核の成熟分裂を完了することが確認されている³⁴⁾。

現在もIVMFCの改善工夫が行われており、これからの進展が期待される。

イ) IVM用卵子の形態的条件:

摘出卵巣からの卵母細胞のIVMは他種動物におけるのと同様、採取卵母細胞の品質が特に重要であることは論を待たない。

IVMに用いる卵母細胞は最少0.5mmから成熟卵胞までから採取した。卵母細胞は排卵時の大きさに達したものであり、卵母細胞質は黒色顆粒が均一に分布しており、さらに卵胞細胞が2層以上緊密に接着したものであることが、最も望ましい。

卵母細胞の品質は性周期の時期によって異なり、卵胞期より休止期の卵巣から採取した卵母細胞が最も良かったとの報告³⁵⁾がある。

この報告では卵子の品質を卵細胞質の色調の均一性と卵胞細胞の付着状況から4段階(I:均質黒色顆粒が均一に分布する卵細胞質で、2層以上の卵胞細胞(CC)が密に接着しているもの—Aランク、II:卵細胞質はIと同じでCCが2層よりやや少ないもの—Bランク、III:卵細胞質がやや黒色顆粒が少なく、不規則でCCがまばらに付着—Cランク、

IV：細胞質の色調が薄い部位で分かれ、不規則な形態のもの、退行卵—D ランク)に区分して、IVM し、IVF or NT 後、IVC を行い正常な胚盤胞への発生率をみている。

I の卵子数は休止期で卵巣当たり 19.0 個に対し、卵胞期では 11.4 個であった。また、卵胞期と黄体期では I 卵子の採取率はそれぞれ 14.9 と 20.2% であり、両者間で有意に黄体期で高い採取率であった。

IVF 後の胚盤胞への発生率は品質の低い順に減少するが、I の卵子は性周期のどの時期から採取されたものでも IVM, IVF, IVC でのそれらの発生割合は、全く差はなかった。

IVM 卵子の発生能は *in vivo* 成熟卵子と比べて低い大きい要因は卵細胞質の成熟が *in vivo* と比べ劣っているからである。

ネコの IVF 卵子では MPF (M-phase promoting factor) と MAPK (mitogen activated protein kinase) 活性は *in vivo* 成熟卵子のそれらと比べ低いことが示された³⁶⁾。

MPF と MAPK は卵子の成熟分裂過程でお互いに作用しあって GVBD 期から M-II 期で休止機構を制御しているが、IVM では MPF と MARK の最大値は GVBD 期と同じ時期に起こっているし、IVM の培養時間も関係して 40 時間よりも 24 時間の培養で高いことが指摘されており、*in vivo* とはずれている。これらのことは明らかに IVM の培養条件が両因子のレベルや活性に影響を与え、*in vivo* 成熟との違いや発生能を左右していることは明らかであり、さらなる IVM 条件の吟味が必要である。

ロ) IVM 用卵子での卵胞細胞の役割：

マウス、ウシ、ブタ、ヒトなどで卵子の IVM には卵胞細胞が未成熟卵子に少なくとも 2 層以上に生理化学的に機能的な結合(細胞間の狭間隙結合)していることが必須である³⁷⁾。しかし、この機能の細胞間、分子間レベルでの機構は完全に明らかにされてはいない。

卵胞細胞を除去した未成熟卵子(DOs)は別な卵胞細胞との共培養によって、核成熟分裂を完了して IVF, IVC により発生能を回復することがマウス^{38, 39)}、ウシ^{40, 41)}、ヒト⁴²⁾などで報告されている。

ネコ卵子の IVM での CC の重要性は他種動物と同様に 1997 年に報告⁴³⁾されている。

ネコ卵子の IVM での CC のパラクライン分泌物

が IVM 率やそれにつづく IVF, IVC の効率に著しい影響を与えることが示された。

この報告⁴⁴⁾では、CC を裸化(DOs)すると他動物種の DOs と同様、自然の核成熟分裂は起こらないが、FSH, LH の存在で M-I 期まで進行する。そして COCs と共培養すると DOs は M-II 期まで達する。DOs は FSH と LH の存在下で培養すると約 21% が M-II 期達し、受精能を持つものもあるが、胚盤胞までには至らない。

しかし、COCs と共培養した DOs は 74% 以上 M-II 期に達し、IVFC により 35% が胚盤胞まで発生することが確認されている。

ハ) IVM の培養液：

ネコ卵子の IVM 用基礎培地として MEM, TCM-199, SOF など用いられてきており、TCM-199 が比較的多用されている。これら基礎培地に GTH (FSH, LH), 成長因子類や別にエネルギー源を添加して用いられている(表 38-3)。

ネコ卵子の IVM 培地には FSH と LH がどの基礎培地にも添加されているのが特徴である。

また成長因子とくに IGF-1 と EGF は広く哺乳類卵子の IVM に効果が認められており、多用されているが、ネコ卵子の IVM にはあまり多く使われていない。

10ng/ml の EGF を添加した IVM 卵子の IVF 後の発生率はほとんど増加させないが、胚盤胞形成率は有意に(55% v 43%)増大させた⁴⁵⁾。0, 10, 25, 50ng EGF の添加 IVM では 25ng/EGF 区で胚盤胞形成率が高くなり、50 ng/ml 区では卵細胞質の成熟度を有意に高めたことが報告⁴⁶⁾されている。

一方、IGF-1 については 100 ng/ml を添加すると、M-II 期の達成率が有意に増加(52~66% v 70~86%)するが、CC の少ない卵子の成熟率は改善されなかった⁴⁷⁾。

ニ) 成熟培養時間：

ネコ卵子の IVM に要する時間は、これまでの報告から 24~30 時間が最も良い成果を上げている。この IVM の時間帯は全く前処理なしで任意に摘出卵巣内卵子を用いた時のものであり、最近では 24 時間の培養が多い。

一方、GTH 処理後の卵巣内卵子の場合、IVM の培養時間は 12 時間でも 70~80% の成熟率が得られることが報告⁴⁸⁾されている。

表 38-3 ネコ卵子の IVM 用培地組成 (原著)

組成	Godard ⁴⁴⁾ (2008)	Nagano ⁵⁰⁾ (2008)	Tsujioka ⁵¹⁾ (2008)	Tharasanit ⁵²⁾ (2011)	Yu ⁴⁸⁾ (2010)	Naoi ⁴⁹⁾ (2008)	Merlo ⁵³⁾ (2008)
基礎培地	MEM (GIBCO)	25mM Hepir TCM-199	TCM-199 3mg/ml NaHCO ₃	TCM-199 NaHCO ₃	TCM-199 (M-7528)	Earles TCM-199	FOFaa LH
FSH	1μg/ml oFSH	0.02unit/ml	0.1IU/ml	0.1IU/ml rhFSH		0.1IU/ml hMGT	} 0.1IU rFSH-LH
LH	1μg/ml oLH		0.0063IU/ml			hCG	
E ₂	1μg/ml	1μg/ml	1mg/ml			1μg/ml	
ピルビン酸	1mM/L	0.2mM	0.275mg/ml (Na-)	1.0mM			
乳酸			0.6mg/ml (Ca-)				
グルタミン	1mM/L			2.0mM			
FCS					10%		
BSA	4mg/ml	3%脂質free	3mg/ml	4mg/ml		0.4% (w/v)	5mg/ml
FGF							25ng/ml
IGF-1							
ITS							2.5ng/ml
L-システイン			0.1mg/ml				1.2mM
ペニシリン	100IU/ml				} 1% P.S		
ストレプトマイシン	100μg/ml						
ゲンタマイシン		50μg/ml	0.05mg/ml				50μg/ml
培養時間 (hr)	28	24, (30), 36	24	24	6, 12, (24)	24	24

この報告では 0, 50, 100, 200, 400IU の eCG 投与後, 100 時間前後に卵巣摘出して採卵して, 0, 6, 12, 18, 24 時間の IVM を行い M-II 期への達成率を調べている。GTH 投与区では 12~18 時間の IVM で 70~80% が M-II 期に達した。一方, GTH 無処理区では 12 時間の IVM では 50% 以下であるが, 24 時間の IVM で約 70% 以上が M-II 期に達している。

これらの結果から任意卵巣から採取した卵母細胞の IVM に要する時間は 24~30 時間帯といえるが, TCM-199 の基礎培地では 24 時間の報告が多い。

ii) IVF

ネコ IVF での精子処理, 媒精法などは他動物の IVF と同様である。

イ) 精子と精子の処理:

IVF 用として精巣上体精子, 射出精子(電気刺激射精)で新鮮または凍結精子が広く用いられている。

IVF に供す精子は前処理として受精培地で前処理, 調整するがスィムアップ法で選抜した精子がよく用いられている。

ロ) 媒精培地と媒精時間:

ネコ IVF 用培地として mBO 液(BO+6mg/ml BSA +20μg/ml ヘパリン)^{49,50)}, TALP 液(TALP+6mg/ml BSA+10μg/ml ヘパリン⁴⁸⁾または TALP+0.22mg/ml Na ピルビン酸+6mg/ml BSA⁵¹⁾, mTyrodes 液(mTyrodes+1% (v/v) MEM-NEAA+6mg/ml BSA+1mM L-glutamine+0.36mM Na-pyruvate+0.11mM Ca-lactate⁵²⁾), Hepes を除いた Ham F10 液⁴⁴⁾, SOFaa +6mg/ml BSA 液+20μg/ml penicillamine-hypotaurine-epine pherine (PHE)+10μg/ml heparine 液⁵²⁾などが用いられている。

これらの媒精培地のうち, 基礎培地として Ham F10 や SOF 液などはネコのみで使われており, 極めて特異的でネコ科で有効に用いられることになればと考えられる。

媒精に供される精子はそれぞれの各媒精液でのスィムアップ法で選抜した精子を 0.5~2.0×10⁶/ml の最終濃度になるよう調整して COCs (3~10 個, or 20~30 個)と一緒に培養して受精させている。

精子と COCs との媒精培養時間は 12, 18, 24 時間行った報告が多くみられる。