

博士論文

ブタおよびヒト小卵胞由来卵母細胞
の体外成熟能改善に関する研究

平成 29 年 3 月

奥平 裕一

岡山大学大学院
環境生命科学研究科

目次

宣誓および署名	2
謝辞	3
要旨	4
第 1 章 材料および方法	8
第 2 章 IVM 前半 24 時間中のブタ小中卵胞由来 COC および 裸化卵母細胞内の cAMP と cGMP 動態	14
第 3 章 Phosphodiesterase (PDE) 阻害剤がブタ SF 由来卵母細胞の IVM 能および胚発生能に及ぼす影響	29
第 4 章 完全合成培地を用いたヒト小卵胞由来卵母細胞の IVM	42
第 5 章 総括	56
参考文献	58
参考資料 1 略語リスト	72
参考資料 2 培養液組成表	74

宣言および署名

本論文に含まれる研究内容は、他の研究機関および他の大学で学位や報告のために受理されたものを含んでいないこと、および、本論文内に引用文献として引用したものを除いて、他人がすでに公表または執筆中の内容を含んでいないことを宣言します。

日付：

署名：

謝辞

本研究を行うにあたり、終始適切なお指導、ご鞭撻を賜りました岡山大学大学院 環境生命科学研究科 舟橋弘晃 教授に心より深く感謝の意を表します。研究を進めるにあたり、多くのご助言を頂きました岡山大学大学院 環境生命科学研究科 若井拓哉 准教授、岡山大学 生殖補助医療技術教育研究センター 高山修 助教および本橋秀之 助教に厚く御礼申し上げます。研究生活を共にし、多くの協力を頂き、熱い議論や杯を交わした、動物生殖細胞工学研究室の先輩後輩諸氏に感謝いたします。最後に、精神面および経済面で支えてくださった家族の皆様に感謝いたします。

要旨

卵母細胞の体外成熟 (IVM) とは、卵胞から未成熟卵を取り出して、第二減数分裂中期 (M-II 期) までの核成熟と、正常な受精能および発生能を獲得する細胞質成熟を達成させる過程である。卵巣表層には大小様々な胞状卵胞が存在し、その中の未成熟卵母細胞を効率的に IVM させることが出来れば、雌性生殖細胞の高度利用が可能となる。哺乳動物の卵巣では直径 3 mm 未満の小卵胞 (SF) が大半を占めているが、SF 由来の卵丘細胞 - 卵母細胞複合体 (COC) の IVM 能および胚発生能は、直径 3 - 6 mm の中卵胞 (MF) のそれらに比べて著しく低いことがブタやウシなどの家畜種でよく知られている。しかし、その原因や SF と MF 間で何が異なっているのかはまだ解明されていない。IVM 中の細胞内 cAMP と cGMP 量の劇的な変化は、卵母細胞の減数分裂再開に大きく関与している。そこで本研究では、先ず、ブタをモデルとして、IVM 前半 24 時間中の cAMP と cGMP 量の変動を、SF および MF 間で比較するとともに、得られた知見をもとに SF 由来卵母細胞の IVM 能および胚発生能の改善を試みた。また、近年ヒトの生殖補助医療では、ゴナドトロピン注射の副作用である卵巣過剰刺激症候群の回避や、癌患者の妊孕性温存の手段として、卵巣刺激が不要な IVM が注目されている。しかし、ヒト SF 由来の COCs の IVM に用いる培養液や培養条件等は未だ確立していない。さらに、通常培養液には血清や卵胞液が添加されるが、それらはロット間差や組成の不明確さ、感染リスクが問題となっている。そこで次に、SF 由来ヒト COCs の IVM に適した完全合成培地の検討を行った。

1. IVM 前半 24 時間中のブタ小中卵胞由来卵丘細胞 - 卵母細胞複合体 (COC) および裸化卵母細胞 (DO) 内の cAMP と cGMP 量

SF あるいは MF 由来 COCs を採取し、24 時間 IVM を行った (eCG、hCG および

dibutyryl cAMP (dbcAMP) 添加 mPOM 中で 20 時間培養、その後 4 時間はそれらを不含の mPOM 中で培養)。IVM 培養開始 0, 10, 20, 24 時間に、COCs を回収し、COC および DO 内の cAMP と cGMP 量を ELISA 法で測定した。また、IVM 培養開始 0, 10, 20 時間に、COC あたりの卵丘細胞数を測定し、卵丘細胞あたりの cAMP と cGMP 量を推定した。

IVM 前半 24 時間中の SF および MF 由来 DO の cAMP と cGMP 量に変化はなく、SF と MF 間でも差は無かった ($P>0.05$)。IVM 20 時間で MF 由来 COC の cAMP 量 (33.0 ± 0.5 fmol) は、SF 由来のそれ (28.4 ± 1.0 fmol) より高かった ($P<0.05$)。IVM 0 および 10 時間において、MF 由来の COC の cGMP 量 (81.8 ± 4.5 fmol および 64.8 ± 8.4 fmol) は、SF 由来のそれ (41.7 ± 10.6 fmol および 24.8 ± 8.2 fmol) より高かった ($P<0.05$)。IVM 前半 20 時間を通して、MF 由来の COC 中の卵丘細胞数は、SF 由来のそれより多かった ($P<0.05$)。卵丘細胞あたりの推定 cAMP 量は、IVM 10 時間で MF (7.3 ± 0.1 amol) に比べて SF (11.1 ± 0.8 amol) で高かった ($P<0.05$) が、推定 cGMP 量は SF と MF 間で差は無かった ($P>0.05$)。

以上の結果から、IVM 前半 24 時間での COC 中の cAMP と cGMP 量は、SF と MF 間で異なっていることが明らかになった。

2. IVM 培地への Phosphodiesterase (PDE) 阻害剤がブタ SF 由来卵母細胞の IVM 能および胚発生能に及ぼす影響

PDE 阻害剤を用いて、COCs 中の cAMP および cGMP レベルを維持または増加させた時の、SF 由来卵母細胞の IVM 能および胚発生能に及ぼす影響を調べた。SF または MF から COCs を採取し、44 時間 IVM を行った (eCG、hCG および dbcAMP 添加 mPOM 中で 20 時間培養、その後 24 時間はそれらを不含の mPOM 中で培養)。その際 SF 実験区には、IVM 前半 20 時間に PDE4 (cAMP を分解) 特異的阻害剤 rolipram (100

μM) または PDE5 (cGMP を分解) 特異的阻害剤 sildenafil (100 μM) または非特異的 PDE (cAMP と cGMP を分解) 阻害剤 caffeine (10 mM) を添加した。培養後に、卵母細胞の核相を観察し、IVM 能を調べた。また、IVM 終了後に M-II 期卵を選別し、電気刺激によって単為発生させた後、5 日間培養して胚盤胞期胚までの発生能を調べた。

IVM 後の卵母細胞の成熟率は、SF 対照区 ($55.1 \pm 2.7\%$) に比べて rolipram 添加区 ($65.2 \pm 1.1\%$) で増加した ($P < 0.05$) が、caffeine 添加区および sildenafil 添加区では差は無かった ($P > 0.05$)。また、胚盤胞形成率は、MF ($51.6 \pm 4.1\%$) に比べて SF ($38.9 \pm 2.0\%$) では低い ($P < 0.05$) が、rolipram 添加区 ($40.1 \pm 4.3\%$) では同等となった ($P > 0.05$)。

これらから、PDE4 特異的阻害剤を IVM の前半 20 時間添加すると SF 由来卵母細胞の IVM 能および胚発生能が改善されることを明らかにした。

3. 完全合成培地を用いたヒト小卵胞由来卵母細胞の IVM

ゴナドトロピン無刺激下の卵巣に存在する胞状卵胞の数と直径、それら由来の COCs の IVM 能を 2 種類の完全合成培地を用いて調べた。卵巣摘出手術を受けた患者の内、研究目的使用への同意が得られた方の卵巣を実験に供した。ノギスを用いて卵胞直径を測定後、COCs を採取し、44 時間 IVM を行った (eCG、hCG および dbcAMP 添加 IVM 培地中で 20 時間培養、その後 24 時間はそれらを不含の IVM 培地中で培養)。IVM 培地は、mPOM もしくは、ヒト卵胞液組成を参考にして修正 Porcine Oocyte Medium (mPOM) の Na/K 比および乳酸濃度を変えて作製した Human Oocyte Medium (HOM) を用いた。IVM 後に、卵母細胞の核相を観察した。

患者あたり平均 20.9 個の胞状卵胞が存在し、それらから平均 18.5 個の COCs を獲得できた。卵胞直径の中央値は 3.1 mm であった。また、卵胞期と黄体期間で、胞状卵胞数と獲得 COCs 数に差は無かった ($P > 0.05$)。mPOM を用いた IVM 後の M-II 期卵の

割合は、由来卵胞の直径が 5.1 - 6.0 mm (57.1%) および 2.1 - 5.0 mm (35.9%) に比べて、1.0 - 2.0 mm (13.0%) では低かった ($P<0.05$)。けれども、HOM を用いた IVM 後の M-II 期卵の割合は、由来卵胞の直径間で差は無かった ($P>0.05$)。さらに、1.0-2.0 mm の卵胞由来の卵母細胞の IVM 能は、mPOM (13.0%) に比べて、HOM (53.8%) では上昇した ($P<0.05$)。

これらの結果から、ゴナドトロピン無刺激下の卵巣であっても多くの胞状卵胞が存在し、効率的に COCs の獲得が可能であった。また、IVM 培地に HOM を用いると、直径 2.0 mm 以下の卵胞由来卵母細胞の IVM 能を向上させることが示された。

本研究において、IVM 前半中のブタ COC の cAMP と cGMP 量は、SF と MF 間で異なっていることが明らかになり、この違いが IVM 能に関連している可能性が示唆された。さらに、IVM 培地に PDE4 特異的阻害剤を添加すると、SF 由来卵母細胞の IVM 能および胚発生能を改善することができた。これから、IVM 前半 20 時間において、COC 中の cAMP レベルを高く維持することが、体外成熟および胚発生に重要であることが考えられる。またヒト卵の IVM では、今回新たに作成した HOM を用いることで、直径 2.0 mm 以下の卵胞由来卵母細胞の IVM 能を向上させることに成功した。以上の結果から、本研究で得られた知見は、家畜の体外生産やヒトの生殖補助医療での SF 由来卵母細胞の有効活用に貢献し、卵巣あたりの体外受精卵の作出効率を向上させ得る。

第 1 章 材料および方法

試薬および培養液

NaCl、KCl、MgCl₂・6H₂O、Gentamicin、酢酸、流動パラフィンは、ナカライテクス株式会社より購入した。NaH₂PO₄・2H₂O、CaCl₂ 2H₂O は、石津製薬株式会社より購入した。Equine chorionic gonadotropin (eCG) および Human chorionic gonadotropin (hCG) は、あすか製薬株式会社より購入した。Medium 199 (M199) 粉末は、GIBCO (Invitrogen)より購入した。その他の試薬は、特に記述しない限り、シグマアルドリッチジャパン株式会社より購入した。

本研究で使用した培養液の組成は巻末の参考資料 1 に示した。卵丘細胞-卵母細胞複合体 (COCs) の回収、洗浄、選別には modified TL-HEPES-PVA (mTL-HEPES-PVA) を用いた。COCs の体外成熟 (IVM) には、modified porcine oocyte medium (mPOM) もしくは human oocyte medium (HOM) を用いた。胚の体外培養 (IVC) には、porcine zygote medium (PZM) を用いた。なお、mPOM, HOM, PZM および modified medium 199 (mM199) は、5% CO₂ in air, 湿度 100%, 39°C または 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂, 湿度 100%, 37°C の気相条件下で、少なくとも 3 時間以上平衡させてから用いた。

ブタ COCs の採取

ブタ卵巣は、岡山県営食肉地方卸売市場で屠殺された未経産ブタから採取し、75 µg/ml potassium penicillin G および 50 µg/ml streptomycin sulfate を添加した 0.9% NaCl 溶液 (37°C) 中に入れて研究室に輸送した。COCs は、卵巣表層に存在する SF (直径 1 - 3 mm) および MF (直径 3 - 6 mm) から、18-gauge 針と 10 ml シリンジを用いて吸引採取し、室温 (25°C) の修正 TL-HEPES-PVA で 3 回洗浄した。均一な卵細胞質と 3 層以上の卵丘細胞を有する COCs を実体顕微鏡下で選別し、実験に供し

た。

ブタ COCs の IVM

回収した COCs を mPOM で 3 回洗浄し、4 well プレート内のゴナドトロピン (10 IU/ml eCG, 10 IU/ml hCG) および 1 mM dibutyryl cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (dbcAMP) を添加した mPOM 500 μ l 中に 40 - 50 個入れ、5% CO₂ in air, 湿度 100%, 39°C の気相条件下で 20 時間培養した。その後、COCs をゴナドトロピンおよび dbcAMP 無添加の mPOM で 3 回洗浄し、4 well プレート内の mPOM 500 μ l 中に移し、同気相条件下で 24 時間培養した。

ブタ卵母細胞の核相観察

IVM 20 または 44 時間後に、COCs を 0.1% (w/v) hyaluronidase 存在下でピペッティングし、卵丘細胞を除去した。25% (v/v) 酢酸エタノール液 (ehanol : acetic acid=3 : 1) で 48 時間以上固定後、orcein を 1% (w/v) となるよう酢酸にて溶解した酢酸オルセイン液で染色し、位相差顕微鏡 (ECLIPSE 80i, Nikon) 下で核相を観察した。

cAMP および cAMP 量の測定

IVM 0, 10, 20, 24 時間後に、COCs を回収し、mTL-HEPES-PVA 中に移した。これらの一部を用いて、卵丘細胞および透明帯をそれぞれ 0.1% (w/v) hyaluronidase と 0.1% (w/v) protease によって除去し、裸化卵母細胞 (DO) を得た。マイクロチューブに 30 個の COCs または DOs を、10 μ l mTL-HEPES-PVA とともに入れ、実験に供するまで -80°C で保存した。cAMP および cGMP 量の測定には、Direct cAMP または cGMP Enzyme Immunoassay Kit (ARBOR ASSAYS) を用いた。その方法は、kit の説明書の手順に従って行った。反応後、450 nm の波長で iMark microplate reader

(Bio-Rad) により検出した。

卵丘細胞数の測定

IVM 0, 10, 20 時間後の COCs を 0.1% (w/v) PVA を含む phosphate buffered saline (PBS-PVA) で 3 回洗浄し、0.5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を含む 0.05 % (w/v) Trypsin 溶液に入れ、39°C で 10 分間静置した。反応後、10% (v/v) fetal calf serum (FCS) を含む mTL-HEPES-PVA を加え、ピペッティングで卵丘細胞を分散させた。血球計算盤を用いて細胞数を計測し、COC 1 個あたりの卵丘細胞数を算出した。

卵丘細胞の生存性

IVM 0, 20 時間後の COCs を PBS-PVA で 3 回洗浄し、100 μ l PBS-PVA のドロップに移した。ドロップに 1 μ l の 100 μ g/ml Propidium iodide (PI, 最終濃度 1 μ g/ml) および 1 μ l の 100 \times SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen) を加えて、15 分間遮光下でインキュベートした。反応後、COCs を VECTASHIELD (Vector Laboratories Inc.) で 2 回洗浄した。スライドガラス上に VECTASHIELD のドロップを作り、そこに COCs を移し、カバーガラスをかけて封入した。その後、蛍光顕微鏡 (BZ-X710, Keyence) 下で観察した。

単為発生および IVC

IVM 44 時間後に、COCs を 0.1% (w/v) hyaluronidase 存在下でピペッティングし、卵丘細胞を除去した。第一極体を放出した M-II 期 (第一極体放出) 卵を選別し、実験に供した。卵を、39°C で加温した electroporation medium で 3 回洗浄後、電気刺激用チャンバー (90 mm のガラスディッシュに、1 mm 間隔で平行な 2 本のワイヤ電極

を取り付けた)の電極間に少量の同液でドロップをつくり、その中に移した。電気刺激は、BTX electro cell manipulator ECM 2001 M (Biotechnologies and Experimental Research Inc.)を使用し、120 Vで30 μ secのパルスを1回かけて行った。電気刺激後の卵を、0.4% (w/v) BSA および 5 μ M cytochalasin B を含んだ mM199 で3回洗浄後、同液 500 μ l 中で 5% CO₂ in air, 湿度 100%, 39°C の気相条件下において4時間培養した。その後、PZM で3回洗浄(それぞれ5分間隔)し、同液 300 μ l 中で 5% CO₂ in air, 湿度 100%, 39°C の気相条件下において5日間 IVC した。培養2日目に2細胞期胚への卵割率、培養5日目に胚盤胞期胚への発生率を調べた。得られた胚盤胞期胚を10 μ g/ml Hoechst 33342 を含む mTL-HEPES-PVA 中に移し、室温で20分間反応させた。染色後、蛍光顕微鏡 (BZ-X710, Keyence) 下で観察し、胚盤胞中の総細胞数を調べた。

ヒト卵巣ドナー

本研究は岡山大学倫理委員会の承認(承認番号1818)を得て実施した。医学的理由により卵巣摘出手術を受けた患者の内、研究目的使用への同意が得られた方の卵巣を実験に供した。なお、全ての患者は、卵巣摘出前6週間はホルモン療法の履歴は無かった。

ヒトCOCsの採取

ヒト卵巣は、室温にて、摘出後1時間以内に研究室に輸送した。なお以降の操作は全て室温で行った。到着後、PBSで2回洗浄し、付着している血液を除去した。視認できた胞状卵胞の直径をノギスで計測後、COCsを18-gauge針と10mlシリンジを用いて吸引採取し、mTL-HEPES-PVA中に移した。そして、均一な卵細胞質と3層以上の卵丘細胞を有するCOCsを、実体顕微鏡下で選別した。

ヒト COCs の IVM

IVM 培地には、mPOM もしくは human oocyte medium (HOM) を用いた。回収した COCs を IVM 培地で 3 回洗浄し、ゴナドトロピン (10 IU/ml eCG, 10 IU/ml hCG) および 1 mM dbcAMP を添加した 20 μ l IVM 培地ドロップ (流動パラフィンで覆った) 中に 1 個ずつ入れ、5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂, 湿度 100%, 37°C の気相条件下で 20 時間培養した。その後、COCs をゴナドトロピンおよび dbcAMP を含まない IVM 培地で 3 回洗浄し、20 μ l IVM 培地ドロップ (流動パラフィンで覆った) 中に移し、同気相条件下で 24 時間培養した。

ヒト卵母細胞の核相観察

IVM 44 時間後に、COCs を 0.1% (w/v) hyaluronidase 存在下でピペッティングし、卵丘細胞を除去した。裸化卵を 10 μ g/ml Hoechst 33342 を含む mTL-HEPES-PVA 中に移し、室温で 10 分間反応させた。染色後、蛍光顕微鏡 (ECLIPSE 80i, Nikon) 下で核相を観察した。

免疫蛍光染色

IVM 終了後、COCs を 0.1% (w/v) hyaluronidase 存在下でピペッティングし、卵丘細胞を除去した。M-II 期 (第一極体放出) 卵のみを、2% paraformaldehyde および 0.2% Triton X-100 を含む PBS 中に移し、室温で 1 時間固定・透過処理した。その後、2000 倍希釈したマウスモノクローナル抗 α -tubulin 抗体 (Sigma) 液中に移し、4°C で一晩反応させた。3 回洗浄後、300 倍希釈した Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Molecular Probes) 液中に移し、室温で 1 時間反応させた。3 回洗浄後、10 μ g/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 液中に移し、室温で 20 分間反応させた。なお、上述の卵の洗浄、抗体および DAPI の希釈は 1% (w/v) BSA を含む PBS で行った。染

色後、共焦点レーザー走査型顕微鏡（FV1200, Olympus）下で紡錘体および染色体を観察した。

統計解析

全ての実験はそれぞれ 3 回以上繰り返し、実験結果の統計処理は、統計解析ソフト Prism 6（GraphPad Software Inc.）を用いて行った。解析方法は、Bonferroni/Dunn 検定による一元配置分散分析、カイ二乗検定、t 検定のいずれかを用いて行った。なお、有意水準が 5%以下（ $P < 0.05$ ）の場合において、統計学的に有意な差があるとした。

第2章 IVM前半24時間中のブタ小中卵胞由来COCおよび裸化卵母細胞内のcAMPとcGMP動態

緒言

一般的に性成熟前のブタが多くの国々において食肉用に屠殺されているので、体外胚生産のための配偶子資源として用いる卵巣は、性成熟前の雌ブタから容易に得ることができる。ブタの体外胚生産では、直径3-6 mmの中卵胞(MF)由来の卵丘細胞-卵母細胞複合体(COCs)を用いてIVM後に体外受精(IVM-IVF)し、胚を作製する技術は良く確立されている[1, 2]。しかしながら、ブタ卵巣表層に存在するMFの数は限られており、直径3 mm未満の小卵胞(SF)が大半を占めている[3]。SF由来のCOCsのIVM能および胚発生能はMFのそれらに比べて著しく低いことがよく知られている[4-6]。近年当研究室では、SF由来の卵母細胞であってもIVM後に第一極体を持つ成熟卵母細胞は、IVF後の精子侵入能および雌雄両前核形成能が、MFと同等であることを明らかにしている[6]。ウシでは、卵母細胞由来のパラクライン因子、およびギャップジャンクションを介した卵母細胞と卵丘細胞間の相互作用は、卵成熟過程での大規模な染色体の変化に関わる、また十分に成長した卵母細胞の胚発生能の獲得に影響を及ぼすと考えられている[7]。当研究室では、卵丘細胞由来のオートクライン因子がSF由来卵母細胞の成熟および発生能に正の影響を及ぼす[8]ことや、IVM20時間でギャップ結合を人為的に崩壊させると、SF由来卵母細胞の減数分裂をM-II期まで促す[9]ことを発見している。けれども、なぜSF由来卵母細胞の成熟能がMFに比べて低いのか、SFおよびMF由来卵母細胞間で何が異なっているのかはまだよく分かっていない。

Cyclic-AMP (cAMP) と cyclic-GMP (cGMP) は共にセカンドメッセンジャーであり、卵丘細胞と卵母細胞間のギャップ結合を介して、卵母細胞の減数分裂再開を制御し

ていることが知られている[10, 11]。cAMP は卵丘細胞で生産され、ギャップ結合を
って卵母細胞内に輸送される[12, 13]。卵母細胞内の cAMP レベルが高いと、cAMP 依
存的なプロテインキナーゼの働きによって maturation promoting factor (MPF) の活
性が阻害されるため、卵母細胞の減数分裂は GV 期で停止する[14]。cGMP は、卵丘細
胞内で natriuretic peptide precursor type C/natriuretic peptide receptor 2 経路を介
して合成され[15]、ギャップ結合をって卵母細胞内に輸送され、卵母細胞内の
phosphodiesterase-3 (PDE3) の活性を負に制御し、cAMP の分解を阻害することで
卵母細胞の減数分裂再開を抑制している[15, 16]。ゴナドトロピンの刺激によって起こ
る卵丘細胞内の cAMP レベルの上昇[17, 18]によって、mitogen-activated protein
kinases (MAPK) が活性化され、ギャップ結合を構成しているタンパク質をリン酸化
し、ギャップ結合の透過性が減少する[19, 20]。それによって、卵母細胞内の cAMP お
よび cGMP レベルが低下し、卵母細胞の減数分裂が再開される[19-21]と考えられてい
る。

したがって、SF 由来卵母細胞の成熟能が MF に比べて低いのは、IVM 前半における
ゴナドトロピンの刺激後の COC および卵母細胞内の、cAMP と cGMP レベルの変化が
異なっているからかもしれない。そこで本研究では、COC および裸化卵母細胞 (DO)
内の cAMP と cGMP 量の IVM 前半 24 時間における変動を、MF と SF 間で比較した。

実験デザイン

IVM 20 および 44 時間後の卵母細胞の核相

SF (直径 1 - 3 mm) または MF (直径 3 - 6 mm) から COCs を採取し、20 または
44 時間 IVM を行った(ゴナドトロピンおよび dbcAMP 添加 mPOM 中で 20 時間培養、
その後 24 時間はそれらを不含の mPOM 中で培養)。IVM 20 もしくは 44 時間後に卵

丘細胞を除去し、卵母細胞の核相を観察した。

IVM 24 時間中の COC および DO 内の cAMP と cGMP 量

SF または MF から COCs を採取し、24 時間 IVM を行った（ゴナドトロピンおよび dbcAMP 添加 mPOM 中で 20 時間培養、その後 4 時間はそれらを不含の mPOM 中で培養）。IVM 0, 10, 20, 24 時間において、COC および DO 内の cAMP および cGMP 量を ELISA 法により測定した。

IVM 20 時間中の COC あたりの卵丘細胞数

SF または MF から COCs を採取し、20 時間 IVM を行った（ゴナドトロピンおよび dbcAMP 添加 mPOM 中で培養）。IVM 0, 10, 20 時間において、COCs から卵丘細胞を単離後、COC あたりの卵丘細胞数を測定した。また、本結果と上述の cAMP と cGMP 量の結果を用いて、卵丘細胞あたりの推定 cAMP および cGMP 量を算出した。詳しい計算方法は以下の通りである。

卵丘細胞あたりの推定 cAMP/cGMP 量 = ([COC あたりの cAMP/cGMP 量] - [DO あたりの cAMP/cGMP 量]) / [COC あたりの卵丘細胞数]

統計解析

3 から 7 回の繰り返しデータは、統計解析ソフト Prism 6 (GraphPad Software Inc.) を用いて解析した。解析方法は、カイ二乗検定 (Table 1, 2) または、Bonferroni/Dunn 検定による一元配置分散分析 (Table 3, Fig. 1 - 3) を用いて行った。なお、有意水準が 5% 以下 ($P < 0.05$) の場合において、統計学的に有意な差があったとした。

結果

IVM 20 および 44 時間後の卵母細胞の核相

IVM 20 時間 (Table 1) では、大半の卵母細胞が GV-II 期の核相を示したが、その割合は SF ($44.1 \pm 2.6\%$) に比べて MF ($58.7 \pm 1.9\%$) で有意に高かった ($P < 0.05$)。一方、GV-0 期の核相を示した卵母細胞の割合は、MF ($8.8 \pm 1.9\%$) に比べて SF ($23.4 \pm 5.0\%$) で有意に高かった。そして、IVM 44 時間 (Table 2) では、M-II 期に到達した卵母細胞の割合は、SF ($54.2 \pm 3.3\%$) に比べて MF ($79.3 \pm 4.0\%$) で有意に高かった ($P < 0.05$)。また、GV 期および M-I 期の卵母細胞の割合は、MF (それぞれ $6.1 \pm 2.0\%$ および $11.6 \pm 2.6\%$) に比べて SF (それぞれ $16.4 \pm 2.3\%$ および $20.6 \pm 3.2\%$) で有意に高かった ($P < 0.05$)。

IVM 24 時間中の COC および DO 内の cAMP と cGMP 量

DO 内の cAMP 量 (Fig. 1B) は、IVM 24 時間中に MF と SF ともに変化は無く ($P > 0.05$)、MF と SF 間でも差は無かった ($P > 0.05$) が、MF 由来 DO 内の cAMP 量は、IVM 開始後に増加傾向にあった。一方、COC 内の cAMP 量 (Fig. 1A) は、IVM 0 および 24 時間に比べて、IVM 10 および 20 時間で MF と SF ともに有意に増加した ($P < 0.05$)。また、IVM 0, 10, 24 時間では MF と SF 間で差は無かった ($P > 0.05$) が、IVM 20 時間において、SF (28.4 ± 1.0 fmol/COC) に比べて MF (33.0 ± 0.5 fmol/COC) で有意に高かった ($P < 0.05$)。

DO 内の cGMP 量 (Fig. 2B) は、IVM 24 時間中に MF と SF ともに変化は無く ($P > 0.05$)、MF と SF 間でも差は無かった ($P > 0.05$)。けれども、COC 内の cGMP 量 (Fig. 2A) は、IVM 開始後 10 時間から 20 時間の間に MF と SF ともに基底レベルまで低下し、IVM 0 および 10 時間では、SF (それぞれ 41.7 ± 10.6 fmol/COC および 24.8 ± 8.2 fmol/COC) に比べて MF (それぞれ 81.8 ± 4.5 fmol/COC および 64.8 ± 8.4

fmol/COC) で有意に高かった ($P<0.05$)。IVM 20 および 24 時間においては、COC 内の cGMP 量は MF と SF 間では差は無かった ($P>0.05$)。

IVM 20 時間中の COC あたりの卵丘細胞数

COC あたりの卵丘細胞数 (Table 3) は、IVM 20 時間を通して、SF に比べて MF で多かった ($P<0.05$)。この結果と COC および DO 内の cAMP 量の結果を用いて、卵丘細胞あたりの推定 cAMP 量 (Fig. 3A) を計算したところ、MF と SF とともに IVM 0 時間 (MF, 1.1 ± 0.2 amol/cell; SF, 1.2 ± 0.5 amol/cell) に比べて、IVM 10 時間 (MF, 7.2 ± 0.1 amol/cell; SF, 11.1 ± 0.8 amol/cell) および IVM 20 時間 (MF, 6.7 ± 0.4 amol/cell; SF, 8.2 ± 0.5 amol/cell) で有意に高かった ($P<0.05$)。IVM 10 時間でのみ、MF (7.2 ± 0.1 amol/cell) に比べて SF (11.1 ± 0.8 amol/cell) で有意に高かった ($P<0.05$)。一方、卵丘細胞あたりの推定 cGMP 量 (Fig. 3B) は、MF (0 h, 14.9 ± 4.6 amol/cell; 10 h, 8.0 ± 3.4 amol/cell) と SF (0 h, 12.5 ± 3.6 amol/cell; 10 h, 5.3 ± 2.1 amol/cell) 間で差は無かった ($P>0.05$) が、MF と SF とともに IVM 0 時間から 10 時間の間に低下する傾向 ($P>0.05$) にあった。IVM 20 時間での卵丘細胞あたりの推定 cGMP 量は、MF と SF とともに基底レベル (MF, -3.2 ± 1.4 amol/cell; SF, -3.1 ± 1.8 amol/cell) となった。

図表

Table 1. Meiotic stages of MF and SF derived oocytes 20 h after the start of IVM

Origin of COCs	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes at the stage of						
		GV-0	GV-I	GV-II	GV-III	GV-IV	ProM-I	M-I
MF	111	10 (8.8 ± 1.9) ^a	5 (4.6 ± 1.1)	65 (58.7 ± 1.9) ^a	13 (11.8 ± 0.9)	15 (13.2 ± 2.4)	1 (1.0 ± 1.0)	2 (1.8 ± 0.9)
SF	111	26 (23.4 ± 5.0) ^b	1 (0.9 ± 0.9)	49 (44.1 ± 2.6) ^b	16 (14.4 ± 0.7)	16 (14.4 ± 5.0)	3 (2.8 ± 1.6)	0

Data are shown as means ± SEM from three replicated trials.

^{a,b}Values with different superscripts within columns are significantly different ($P < 0.05$).

Abbreviations: MF, middle follicles; SF, small follicles; COCs, cumulus-oocyte complexes; GV, germinal vesicle;

ProM-I, prometaphase-I; M-I, metaphase-I.

Table 2. Meiotic stages of oocytes derived from MF and SF after IVM

Origin of COCs	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes at the stage of				
		GV	ProM-I	M-I	A/T-I	M-II
MF	198	12 (6.1 ± 2.0) ^a	6 (3.0 ± 1.2)	23 (11.6 ± 2.6) ^a	0	157 (79.3 ± 4.0) ^a
SF	195	32 (16.4 ± 2.3) ^b	12 (6.2 ± 1.3)	40 (20.6 ± 3.2) ^b	5 (2.6 ± 1.4)	106 (54.2 ± 3.3) ^b

Data are shown as means ± SEM from five replicated trials.

^{a,b}Values with different superscripts within columns are significantly different ($P < 0.05$).

Abbreviations: MF, middle follicles; SF, small follicles; COCs, cumulus-oocyte complexes; GV, germinal vesicle; ProM-I, prometaphase-I; M-I, metaphase-I; A/T-I, anaphase-I and telophase-I; M-II, metaphase-II.

Table 3. Number of cumulus cells in a cumulus-oocyte complex derived from MF and SF at 0, 10 and 20 h after the start of IVM

Origin of COCs	No. of cumulus cells ($\times 10^3$ cells/COC)		
	0 h	10 h	20 h
MF	3.72 ± 0.08^a	3.83 ± 0.05^a	3.88 ± 0.17^a
SF	2.31 ± 0.22^b	2.40 ± 0.16^b	2.73 ± 0.15^b

Data are shown as means \pm SEM from five replicated trials.

^{a,b}Values with different superscripts within columns are significantly different ($P < 0.05$).

Abbreviations: MF, middle follicles; SF, small follicles; COCs, cumulus-oocyte complexes.

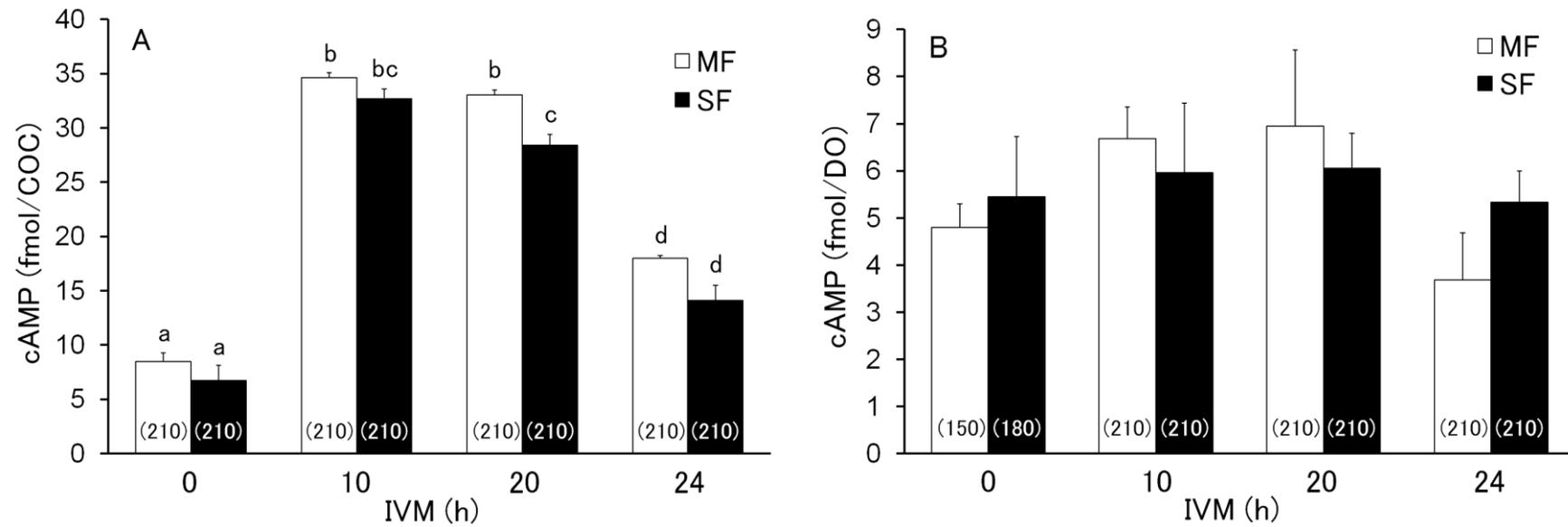


Fig. 1. Contents of cAMP in COC (A) and DO (B) derived from MF and SF at 0, 10, 20 and 24 h after the start of IVM. Different letters indicate statistically significant ($P < 0.05$, 5-7 replicated trials). Numbers in parentheses indicate the total number of COCs or DOs assayed. Abbreviations: MF, middle follicles; SF, small follicles; COC, cumulus-oocyte complex; DO, denuded oocyte.

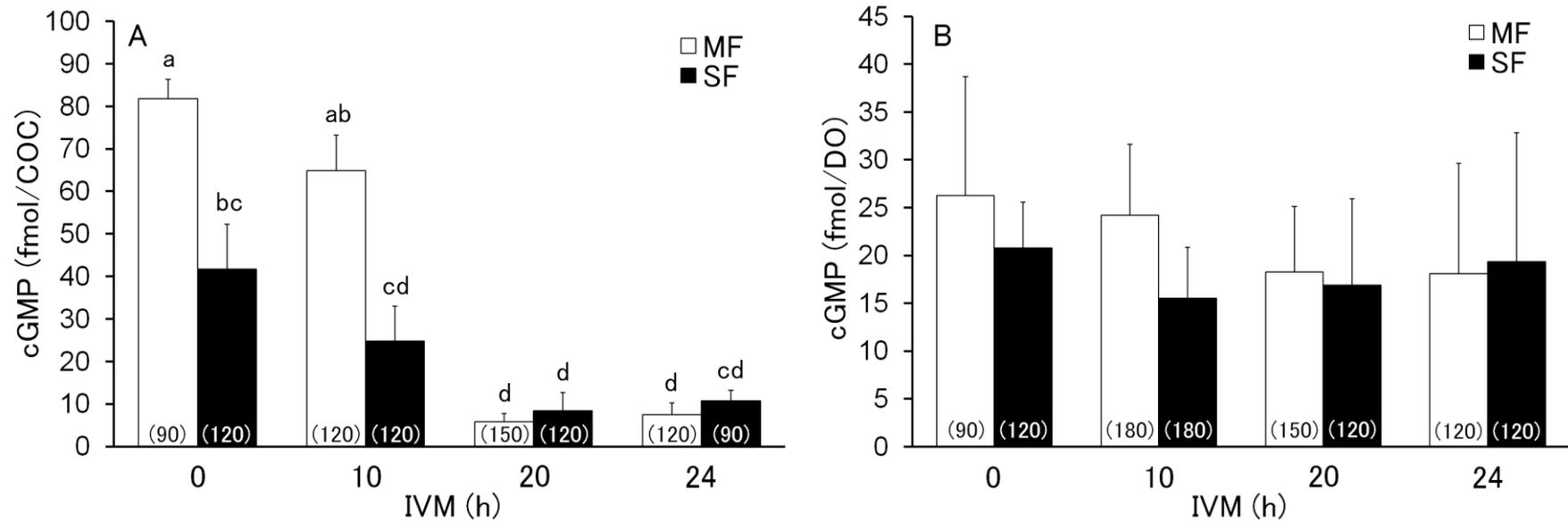


Fig. 2. Contents of cGMP in COC (A) and DO (B) derived from MF and SF at 0, 10, 20 and 24 h after the start of IVM. Different letters indicate statistically significant ($P < 0.05$, 3-6 replicated trials). Numbers in parentheses indicate the total number of COCs or DOs assayed. Abbreviations: MF, middle follicles; SF, small follicles; COC, cumulus-oocyte complex; DO, denuded oocyte.

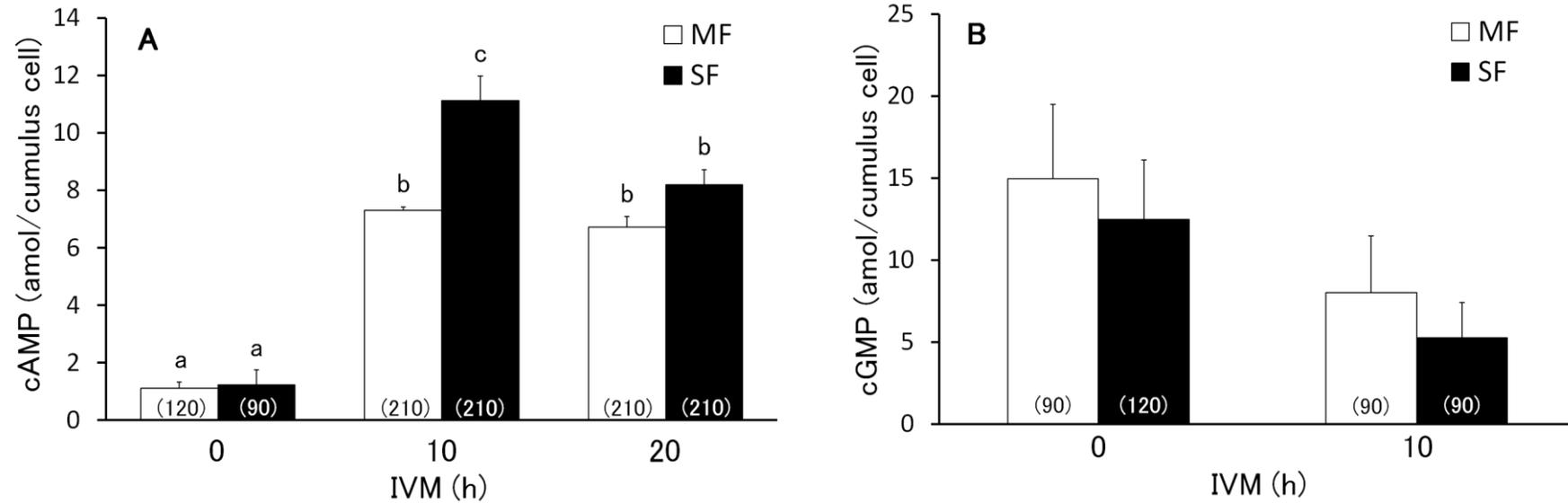


Fig. 3. Estimated cAMP (A) and cGMP (B) derived from MF and SF during the first 20-hours period of IVM. Different letters indicate statistically significant ($P < 0.05$). Numbers in parentheses indicate the total number of COCs assayed. Abbreviations: MF, middle follicles; SF, small follicles.

考察

SF から採取された COCs の体外成熟能が MF のそれに比べて著しく低い[5, 6, 8, 9] ことはよく知られている。本研究での IVM 44 時間後の卵母細胞の核相は、MF では M-II 期、SF では GV 期と M-I 期の割合が高かった。これらの結果は、過去の報告と一致した[6, 8, 9]。

これまで、ブタ MF 由来の COC もしくは卵母細胞内における、IVM 中の細胞内 cAMP 量の変動については異なる結果が報告されている[22-24]。Mattioli ら[22]は、IVM 開始後 24 時間中 (0, 3, 6, 12 および 24 時間)、COC および卵母細胞内の cAMP 量は変わらなかったと報告した。一方、Shimada と Terada [23]は、COC 内の cAMP 量は IVM 開始後 4 時間で有意に増加し、20 時間でピークに達して 48 時間まで維持された (この実験では IVM 48 時間通してゴナドトロピンを添加) ことを示した。さらに彼らは、卵母細胞内の cAMP 量は、IVM 開始後 4 時間で増加して 8 時間でピークに達し、16 時間で減少し始めて 32 時間で基底値まで戻ったことも示した。また、Bagg ら[24]は、由来卵胞の直径は同じであっても、性成熟前と性成熟後では、IVM 中の cAMP レベルの変動は異なることを報告している。本研究では、IVM 前半 24 時間中に卵母細胞内の cAMP 量は MF と SF とともに有意な変化は無かったが、MF では IVM 開始前に比べて増加する傾向になった。また、COC 内の cAMP 量は、ゴナドトロピンと dbcAMP 存在下では顕著に増加し、それらを除去後では再び減少することを観察した。よって、卵丘細胞内の cAMP 量の変化が何らかの機能を刺激し、卵母細胞の減数分裂再開に寄与しているかもしれない。

IVM 20 時間において、dbcAMP 存在下であっても、SF 由来 COCs の cAMP 量は MF に比べて有意に低かった。これまで、異なった卵胞直径 (3 - 8 mm) 間で COC および卵母細胞の cAMP 量を比較している報告[25]はあるが、直径 3 mm の SF については、おそらく本研究が初めてである。過去の報告では、直径 5 - 8 mm 由来の COCs に

比べて、直径 3 mm のそれでは、IVM 中の卵母細胞と卵丘細胞間のギャップ結合は長く維持される、かつ卵丘膨化の程度が低い[25]ことが示されている。卵丘細胞内の cAMP 量の増加は卵丘膨化を引き起こす[26, 27]だけではなく、MAPK 経路を介してコネキシン (ギャップ結合構成因子) をリン酸化し、ギャップ結合を崩壊させる[19, 28]。したがって、IVM 中の SF 由来 COCs の cAMP 量が低いことは、ギャップ結合の崩壊の遅延や不十分な卵丘膨化を引き起こし、それらが体外成熟能の低さに関連しているかもしれない。本研究では、IVM 開始後 20 時間において、卵母細胞の減数分裂の進行は異なっており、MF では GV-II 期が多かったが、SF では GV-0 期が多かった。過去の報告[29]で、ゴナドトロピンと dbcAMP 存在下で MF 由来 COCs を培養すると、GV-II 期の卵母細胞の割合が増加することが示されている。MF および SF 間での COCs のゴナドトロピンと dbcAMP に対する反応の違いが、IVM 20 時間での cAMP 量や減数分裂の進行の相違を作り出しているかもしれない。最近、当研究室では、IVM 20 時間で SF 由来 COCs の卵丘細胞を除去すると、卵母細胞の成熟能が上昇する[9]ことを発見している。これらから、SF 由来 COCs がゴナドトロピンと dbcAMP に対して適切な反応を成し遂げることは、卵母細胞と卵丘細胞間のギャップ結合の適宜を得た崩壊を誘導させるのに重要であると考えられる。

本研究では、IVM 0, 10, 20 および 24 時間における、COCs と卵母細胞の cGMP 量に関しても調べた。我々が知る限りでは、ブタ MF および SF 由来 COCs と卵母細胞の IVM 中の cGMP 量の変動については、今回が初めての報告である。本研究において、IVM 開始後 10 時間から 20 時間の間に、COCs 中の cGMP 量は、MF と SF ともに基底レベルまで低下した。hCG 投与後に、卵巣[30]および卵母細胞[16]内の cGMP 量が低下することが、マウスで報告されている。また、培地に LH を添加後に、単離したマウス卵胞内の cGMP 量が低下する[16, 20, 30]ことも報告されている。これらのマウスでの結果は、本研究の結果と一致した。また、我々は、IVM 0 および 10 時間では SF

由来 COCs の cGMP 量は MF よりも低かったが、卵母細胞では差は無かったことを観察した。NPPC/NPR2 経路を介しての cGMP の合成は、卵母細胞分泌因子および 17β -estradiol によって促進される[15, 31]ことが示されている。卵胞内の 17β -estradiol 濃度は卵胞の成長に伴って増加していく[32]ので、これが MF および SF 由来 COCs 間の cGMP 量が異なる要因かもしれない。一般的に、COC 中の cGMP は PDE3 による cAMP の分解を阻害[15, 20]し、それにより卵母細胞の減数分裂が GV 期で停止すると考えられている。一方で、cGMP/protein kinase G 経路は、脂肪細胞での脂肪代謝に関与している[33, 34]ことがわかっている。卵丘細胞内での脂肪代謝が、ウシ卵母細胞の生存性および成熟能に影響するとの報告[35]があるため、ブタ COCs の成熟能および発生能においての、cGMP の役割を研究する余地はあると考えられる。

本研究において、IVM 20 時間を通して、SF 由来 COC 中の卵丘細胞数は MF のそれよりも有意に少なかった。この結果は過去の報告[4, 36]と一致した。本結果を用いて卵丘細胞あたりの推定 cAMP 量を計算したとき、全体としての動態は COCs の値を反映しており、IVM 10 時間を除いて MF と SF 間で差は無かった。また、卵丘細胞あたりの推定 cGMP 量は、IVM 中に変化はみられず、MF と SF 間でも差は無かった。これらの結果は、COC あたりの総卵丘細胞数が、COCs の cAMP および cGMP 量、そして卵母細胞の減数分裂に反映されることを示唆している。IVM の前か間に SF 由来 COC 中の卵丘細胞を増やすことによって、卵母細胞の成熟能および発生能を改善するかは、更なる研究が必要である。

結論

IVM 前半 20 時間中の COCs の cAMP および cGMP 量は、劇的に変化し、かつ MF と SF 間で異なっていることが明らかになった。これらの違いが卵母細胞の体外成熟能に大きく影響していることが示唆された。

第 3 章 Phosphodiesterase (PDE) 阻害剤がブタ SF 由来卵母細胞の IVM 能および胚発生能に及ぼす影響

緒言

Cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) は、cAMP および cGMP の環状リン酸ジエステルを加水分解する酵素である。PDEs は、PDE1 から PDE11 までの異なる 11 種類のファミリーが存在[37, 38]し、その基質特異性によって 3 つに大別される。PDE4、PDE7 および PDE8 は cAMP を特異的に分解し、一方、PDE5、PDE6 および PDE9 は cGMP を特異的に分解し、また、PDE1、PDE2、PDE3、PDE10 および PDE11 は cAMP と cGMP の両方を分解する[37, 38]。これまでの研究で、顆粒膜細胞／卵丘細胞では、PDE1A [39]、PDE4D [40]、PDE5A [39]、PDE8A [40]および PDE8B [40]が発現し、卵母細胞では、PDE3A [41]、PDE8A [40]および PDE9A [42]が発現していることがわかっている。第 2 章の結果から、IVM 前半 20 時間中の COCs の cAMP および cGMP 量は、MF と SF 間で異なっていることが明らかになった。そして、これらの違いが卵母細胞の成熟能に大きく影響していることが示唆された。また、卵母細胞内の cAMP および cGMP 量は変化しなかったことから、おそらく COC 中の卵丘細胞でのそれらの変動が重要であると考えられる。そこで、本研究では、卵丘細胞で発現している PDE4 および PDE5 に注目した。

PDEs は、卵母細胞および卵丘細胞内の cAMP と cGMP レベルを調節し、卵母細胞の減数分裂再開に重要な役割を担っている[10, 43]。これまでに、卵母細胞の成熟への PDEs 阻害剤の影響に関して調べられている。PDE4 特異的阻害剤は、卵母細胞の成熟[44, 45]を促進することが報告されている。一方、PDE3 特異的阻害剤[44, 46, 47]および PDE5 特異的阻害剤[10, 16]は、卵母細胞の減数分裂再開を阻害することが報告され

ている。しかしながら、PDEs 阻害剤を用いたブタ SF 由来卵母細胞の IVM 能および胚発生能の研究については、著者らが知る限り行われていない。

よって本研究では、PDEs 阻害剤を用いて、COCs 中の cAMP および cGMP レベルを維持または増加させた時の、SF 由来卵母細胞の成熟能および IVM 後の胚発生能に及ぼす影響を調べた。なお、阻害剤は、PDE4 特異的阻害剤 rolipram [48, 49] または PDE5 特異的阻害剤 sildenafil [49, 50] または非特異的 PDE 阻害剤 caffeine [49, 51] を用いた。

実験デザイン

各種 PDE 阻害剤が SF 由来卵母細胞の IVM 能に及ぼす影響

SF または MF から COCs を採取し、44 時間 IVM を行った（ゴナドトロピンおよび dbcAMP 添加 mPOM 中で 20 時間培養、その後 24 時間はそれらを不含の mPOM 中で培養）。なお、SF の実験区では、IVM 前半 20 時間中、非特異的 PDE (cAMP と cGMP を分解) 阻害剤 caffeine (10 mM) または PDE4 (cAMP を分解) 特異的阻害剤 rolipram (100 μ M) または / および PDE5 (cGMP を分解) 特異的阻害剤 sildenafil (100 μ M) を添加した。また、一部の SF 由来 COCs は IVM に先立ち、100 μ M sildenafil 存在または非存在下で前培養を 6 時間行った。IVM 終了後に卵丘細胞を除去し、卵母細胞の核相を観察した。

PDE4 阻害剤が SF 由来卵母細胞の胚発生能に及ぼす影響

SF または MF から COCs を採取し、44 時間 IVM を行った（ゴナドトロピンおよび dbcAMP 添加 mPOM 中で 20 時間培養、その後 24 時間はそれらを不含の mPOM 中で培養）。なお、SF の実験区では、IVM 前半 20 時間中 100 μ M rolipram を添加した。IVM 終了後、卵丘細胞を除去し、第一極体の放出を指標に M-II 期卵を選別した。電気

刺激によって卵を単為発生させ、PZM 中で 5 日間 IVC を行った。IVC 2 日目に 2 細胞期胚への卵割率、IVC 5 日目に胚盤胞期胚への発生率を調べた。また、得られた胚盤胞期胚を Hoechst 33342 で染色し、蛍光顕微鏡下で、胚盤胞中の細胞数を調べた。

PDE4 阻害剤が SF 由来 COCs の卵丘細胞における IVM 中の生存性に及ぼす影響

SF または MF から COCs を採取し、20 時間 IVM を行った（ゴナドトロピンおよび dbcAMP 添加 mPOM 中で 20 時間培養）。なお、SF の実験区では、IVM 前半 20 時間中 100 μ M rolipram を添加した。IVM 0 および 20 時間後に COCs を回収し、SYBR Safe DNA および PI で蛍光染色した。染色後、蛍光顕微鏡下で観察し、COC 中の PI 陽性卵丘細胞の割合によって、A (<25%)、B (25 - 50%)、C (50 - 75%)、D (>75%) に分別した。

統計解析

5 から 9 回の繰り返しデータは、統計解析ソフト Prism 6 (GraphPad Software Inc.) を用いて解析した。解析方法は、Bonferroni/Dunn 検定による一元配置分散分析を用いて行った。なお、有意水準が 5% 以下 ($P < 0.05$) の場合において、統計学的に有意な差があるとした。

結果

各種 PDE 阻害剤が SF 由来卵母細胞の IVM 能に及ぼす影響

IVM 後の成熟率は、SF (対照区; $55.1 \pm 2.7\%$) に比べて、SF (rolipram 添加区; $65.2 \pm 1.1\%$) では有意に高かった ($P < 0.05$, Table 4) が、SF (caffeine 添加区; $48.0 \pm 3.3\%$) は変化無かった ($P > 0.05$, Table 4)。SF (sildenafil 添加区; $42.7 \pm 3.3\%$) の成熟率は、

SF (対照区; $53.2 \pm 4.3\%$) に比べて差は無かった ($P>0.05$, Table 5)。そして、sildenafil と rolipram を同時に添加した SF 区 ($45.8 \pm 2.4\%$) は、SF (対照区) に比べて差は無かった ($P>0.05$, Table 5)。また、sildenafil の有無に関わらず、前培養 6 時間は、SF 由来 COCs の成熟能に影響しなかった ($P>0.05$, Table 6)。

PDE4 阻害剤が SF 由来卵母細胞の胚発生能に及ぼす影響

2 細胞期胚への卵割率 (Table 7) および胚盤胞中の総細胞数 (Table 7) は、3 つの実験区間で有意な差は無かった ($P>0.05$)。一方、胚盤胞形成率 (Table 7) は、MF ($51.6 \pm 4.1\%$) に比べて SF (対照区; $38.9 \pm 2.0\%$) では有意に低かった ($P<0.05$) が、SF (rolipram 添加区; $40.1 \pm 4.3\%$) は MF と同等であった ($P>0.05$)。

PDE 4 阻害剤が SF 由来 COCs の卵丘細胞における IVM 中の生存性に及ぼす影響

IVM 0 時間 (Table 8) では、MF および SF 由来 COCs 中の卵丘細胞は 80%以上が A (PI 陽性細胞の割合: $<25\%$) を示し、MF および SF 間で生存性に有意な差は無かった ($P>0.05$)。IVM 20 時間 (Table 9) では、3 つの実験区で、大部分が A (PI 陽性細胞の割合: $<25\%$) および B (PI 陽性細胞の割合: $25-50\%$) を示した。3 つの実験区間で有意な差は無かった ($P>0.05$) が、SF (rolipram 添加区) では、MF および SF (対照区) に比べて A の割合が多い傾向にあった (それぞれ $53.7 \pm 8.7\%$ vs. $39.7 \pm 8.1\%$ vs. $38.3 \pm 8.0\%$, $P>0.05$)。

图表

Table 4. Effect of rolipram and caffeine treatment during the first 20 hours of IVM on nuclear maturation

Groups	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes at the stage of				
		GV	ProM-I	M-I	A/T-I	M-II
SF	192	9.9 ± 1.9	8.9 ± 1.8 ^{ab}	24.5 ± 1.4	1.5 ± 0.6 ^{ab}	55.1 ± 2.7 ^a
SF (rol)	184	7.4 ± 2.3	6.7 ± 2.3 ^a	19.5 ± 3.9	1.2 ± 0.7 ^a	65.2 ± 1.1 ^b
SF (caf)	194	4.1 ± 1.3	16.9 ± 2.2 ^b	24.8 ± 3.3	6.1 ± 1.9 ^b	48.0 ± 3.3 ^a

Data are shown as means ± SEM from five replicated trials.

^{a,b}Values with different superscripts within columns are significantly different (P < 0.05).

Abbreviations: MF, middle follicles; SF, small follicles; COCs, cumulus-oocyte complexes; rol, rolipram;

caf, caffeine; GV, germinal vesicle; ProM-I, prometaphase-I; M-I, metaphase-I; A/T-I, anaphase-I and telophase-I;

M-II, metaphase-II.

Table 5. Effect of sildenafil and rolipram treatment during the first 20 hours of IVM on nuclear maturation

Groups	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes at the stage of				
		GV	ProM-I	M-I	A/T-I	M-II
MF	204	3.3 ± 2.3	4.5 ± 1.0 ^a	11.2 ± 1.5 ^a	0.5 ± 0.5	80.4 ± 1.9 ^a
SF	207	3.3 ± 2.2	15.0 ± 1.7 ^b	27.0 ± 4.3 ^{ab}	1.6 ± 1.6	53.2 ± 4.3 ^b
SF (sil)	202	9.7 ± 4.4	17.9 ± 3.1 ^b	28.7 ± 4.5 ^b	1.0 ± 0.6	42.7 ± 3.3 ^b
SF (sil + rol)	202	4.5 ± 1.4	17.7 ± 3.7 ^b	30.0 ± 5.6 ^b	2.0 ± 1.5	45.8 ± 2.4 ^b

Data are shown as means ± SEM from five replicated trials.

^{a,b}Values with different superscripts within columns are significantly different ($P < 0.05$).

Abbreviations: MF, middle follicles; SF, small follicles; COCs, cumulus-oocyte complexes; sil, sildenafil;

rol, rolipram; GV, germinal vesicle; ProM-I, prometaphase-I; M-I, metaphase-I; A/T-I, anaphase-I and telophase-I;

M-II, metaphase-II.

Table 6. Effect of sildenafil treatment during pre-IVM for 6 hours on nuclear maturation

Groups	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes at the stage of				
		GV	ProM-I	M-I	A/T-I	M-II
MF	204	7.0 ± 3.0	3.5 ± 1.0 ^a	10.3 ± 2.7 ^a	0	79.2 ± 5.8 ^a
SF	203	6.1 ± 4.3	8.4 ± 0.6 ^b	26.5 ± 2.5 ^b	0.5 ± 0.5	58.5 ± 5.6 ^b
SF (pre-IVM)	200	5.5 ± 1.8	8.6 ± 1.3 ^b	30.3 ± 3.5 ^b	0	55.2 ± 4.0 ^b
SF (pre-IVM + sil)	202	5.0 ± 1.7	6.9 ± 1.2 ^{ab}	34.0 ± 5.3 ^b	0	54.0 ± 3.6 ^b

Data are shown as means ± SEM from five replicated trials.

^{a,b}Values with different superscripts within columns are significantly different ($P < 0.05$).

Abbreviations: MF, middle follicles; SF, small follicles; COCs, cumulus-oocyte complexes; sil, sildenafil;

GV, germinal vesicle; ProM-I, prometaphase-I; M-I, metaphase-I; A/T-I, anaphase-I and telophase-I; M-II, metaphase-II.

Table 7. Early development of oocytes derived from MF and SF after IVM and parthenogenesis

Groups	No. of mature oocytes examined	% of embryos cleaved	% of blastocyst formation	Cells per blastocyst
MF	224	80.0 ± 2.2	51.6 ± 4.1 ^a	30.5 ± 1.2
SF	199	78.9 ± 3.5	38.9 ± 2.0 ^b	29.7 ± 1.2
SF (rol)	151	77.6 ± 5.2	40.1 ± 4.3 ^{ab}	28.6 ± 1.1

Data are shown as means ± SEM from seven to nine replicated trials.

^{a,b}Values with different superscripts within columns are significantly different (P < 0.05).

Abbreviations: MF, middle follicles; SF, small follicles; rol, rolipram.

Table 8. Viability of cumulus cells in a MF and SF derived COC at 0 hour after the start of IVM

Groups	No. of COCs examined	% A	% B	% C	% D
MF	200	85.0 ± 4.2	9.5 ± 1.2	3.5 ± 1.9	2.0 ± 1.5
SF	199	83.0 ± 2.0	12.0 ± 1.4	4.5 ± 0.9	0.5 ± 0.5

Data are shown as means ± SEM from five replicated trials.

Proportion of PI positive cells: A (<25%), B (25-50%), C (50-75%), D (>75%).

Abbreviations: MF, middle follicles; SF, small follicles; COCs, cumulus-oocyte complexes.

Table 9. Viability of cumulus cells in a MF and SF derived COC at 20 hours after the start of IVM

Groups	No. of COCs examined	% A	% B	% C	% D
MF	201	39.7 ± 8.1	38.8 ± 5.3	15.5 ± 2.0	6.0 ± 1.3
SF	199	38.3 ± 8.0	35.1 ± 3.2	18.6 ± 3.3	8.0 ± 2.0
SF (rol)	201	53.7 ± 8.7	28.9 ± 5.3	11.5 ± 3.2	6.0 ± 1.0

Data are shown as means ± SEM from five replicated trials.

Proportion of PI positive cells: A (<25%), B (25-50%), C (50-75%), D (>75%).

Abbreviations: MF, middle follicles; SF, small follicles; COCs, cumulus-oocyte complexes; rol, rolipram.

考察

第2章の知見から、IVM前半20時間中のブタCOCsのcAMPおよびcGMP量は、MFに比べてSFで少ないことが明らかになった。そして、これらの違いが卵母細胞の成熟能に大きく影響していることが示唆された。そこで、本研究では、PDEs阻害剤を用いて、COCs中のcAMPおよびcGMPレベルを維持または増加させた時の、ブタSF由来卵母細胞の成熟能およびIVM後の胚発生能の改善を試みた。その結果、ゴナドトロピンおよびdbcAMPとともに、PDE4特異的阻害剤rolipram[48, 49]をIVMの前半20時間添加すると、SF由来卵母細胞の成熟能を有意に改善できた。卵丘細胞内のcAMP量の増加は卵丘膨化を引き起こす[26, 27]だけではなく、MAPK経路を介してコネキシン（ギャップ結合構成因子）をリン酸化し、ギャップ結合を崩壊させる[19, 28]。過去の報告では、直径5 - 8 mm由来のCOCsに比べて、直径3 mmのそれでは、IVM中の卵母細胞と卵丘細胞間のギャップ結合は長く維持される、かつ卵丘膨化の程度が低い[25]ことが示されている。これらから、ギャップ結合の崩壊の遅延や不十分な卵丘膨化は卵母細胞の成熟に悪影響を及ぼすと考えられている。これまで、PDE4特異的阻害剤は、卵母細胞の成熟[44, 45]を促進することや、卵丘細胞内のMAPKを活性化させる[45]ことが報告されている。また、排卵される卵胞の数を増やす[52]ことから、ゴナドトロピンに対する顆粒膜細胞の反応を促進させることが示唆されている[53]。以上のことから、本研究において、PDE4特異的阻害剤処理によって、卵丘細胞内のcAMP量の増加やMAPKの活性化が誘導されたと考えられる。それらによって、適切なギャップ結合の崩壊や卵丘膨化を引き起こし、SF由来卵母細胞の成熟能が改善したと示唆される。実際、当研究室では、IVM20時間でSF由来COCsの卵丘細胞を除去すると、卵母細胞の成熟能が上昇する[9]ことを発見している。けれども、今回は卵丘膨化やギャップ結合については調べておらず、その仮説を証明するには更なる実験が必要である。

一方、IVMの前半20時間での、PDE5特異的阻害剤sildenafil[49, 50]処理は、SF

由来卵母細胞の成熟能を改善しなかった。過去に PDE5 特異的阻害剤は、卵母細胞の減数分裂再開を阻害する[10, 16]ことが報告されている。本研究において、sildenafil 処理区は、対照区に比べて成熟能が低下する傾向にあった。さらに、sildenafil は rolipram の正の効果を打ち消した。cGMP は、卵丘細胞内で natriuretic peptide precursor type C/natriuretic peptide receptor 2 経路を介して合成され[15]、ギャップ結合を通して卵母細胞内に輸送され、卵母細胞内の PDE 3 の活性を負に制御し、cAMP の分解を阻害することで卵母細胞の減数分裂再開を抑制している[15, 16]。以上から、卵丘細胞内の cGMP レベルを高く維持することは、卵母細胞の成熟能に負に影響すると考えられる。また、第 2 章の結果では、IVM 前の COCs 中の cGMP 量が MF と SF で異なっていた。よって、本研究では、IVM に先立って sildenafil 存在下で前培養 6 時間を行い、SF 由来卵母細胞の成熟能への影響を調べた。その結果、対照区と比べて、成熟能に差は無かったが、IVM 前半 20 時間処理した時のような低下傾向はみられなかった。これから、IVM 中に LH の刺激によって適切に cGMP 量が低下する[16, 20, 30]ことが、卵母細胞の成熟能に重要であると考えられる。さらに、IVM の前半 20 時間中の caffeine 処理も、SF 由来卵母細胞の成熟能を改善せず、逆に低下させる傾向にあった。Caffeine は非特異的 PDE 阻害剤であり[49, 51]、様々な PDEs を阻害して cAMP および cGMP の分解を阻害する。ゆえに、卵丘細胞および卵母細胞ともに、cAMP と cGMP レベルの両方が高く維持されることによって、卵母細胞の成熟能に負に影響したと考えられる。

また、今回、IVM 前半 20 時間での rolipram 処理は、SF 由来卵母細胞の胚発生能を若干改善した。最近、COCs を rolipram で処理すると、卵丘細胞のアポトーシスを抑制[54]し、卵丘細胞の生存性を高めることが示されている。そして、卵丘細胞のアポトーシスは、低い発生能と関連する[55]と報告されている。よって、本研究でも、IVM 中の SF 由来 COCs の卵丘細胞の生存性に、rolipram が及ぼす影響について調べた。そ

の結果、IVM 20 時間後の卵丘細胞の生存率は、rolipram 添加区では対照区に比べて、高い傾向にあったが有意な差はなかった。これまで、前培養で COC 中の cAMP レベルを上げると、IVM 中の COC 内の代謝[56]や、卵母細胞内のグルタチオン濃度[57]が高まり、その後の発生能が上昇することが報告されている。以上のことから、rolipram 処理が SF 由来 COC の何に影響し、その発生能を高めたかについては、今後詳しく調べる必要がある。

結論

PDE4 特異的阻害剤を IVM の前半 20 時間添加すると、SF 由来卵母細胞の IVM 能および胚発生能を改善することが出来た。けれども、IVM 培地への PDE5 特異的阻害剤の添加は、SF 由来卵母細胞の IVM 能に影響を及ぼさなかった。これらから、IVM 前半 20 時間において、COC 中の cAMP レベルを高く維持することが、SF 由来卵母細胞の体外成熟および胚発生に重要であることが示唆された。

第4章 完全合成培地を用いたヒト小卵胞由来卵母細胞のIVM

緒言

近年、ヒトの生殖補助医療技術（ART）では、ゴナドトロピン注射の副作用である卵巣過剰刺激症候群（OHSS）を回避するために、多嚢胞性卵巣（PCO）や多嚢胞性卵巣症候群（PCOS）患者においてIVMが応用されている[58-61]。また、癌患者の妊孕性温存のための手段としても適用されている[62-64]。これらのように、ARTでのIVMの需要が高まっているにもかかわらず、ヒトIVMは未だ確立しておらず、GV期の未成熟卵母細胞からM-II期への成熟率は概して50 - 60%であり、その割合はげっ歯類や家畜等の他の動物種に比べて低い。

COCsを採取する際の卵胞サイズは、卵母細胞の成熟能を決定する重要な因子である[65]。*In vivo*では、黄体期の終わりに、次の排卵卵胞は直径2 - 5 mm（class 5）の卵胞群からリクルートされる[66]。その後、class 6（直径5 - 10 mm）で排卵卵胞候補が選択[66, 67]され、class 7（直径10 - 16 mm）およびclass 8（直径16 - 20mm）を経て排卵される[66]。ヒトARTでは、IVMのためのCOCsの採取は、主席卵胞による負の影響を避けるため、一般的に最も大きい卵胞の直径が14 mmに達する前に行われる[68, 69]。これまでに、直径6 mm以下の小卵胞から採取された卵母細胞の成熟能は乏しい[70]と示唆されていたが、最近、小卵胞（6 mm未満）がIVMのための卵母細胞の源となりうる[71]ことが報告されている。さらには、非刺激下の卵巣に存在する多くの小卵胞は、潜在的な配偶子資源として利用でき、癌患者に妊孕性を保つ機会を提供する。

IVM培地の改良は、IVM遂行のための有望なアプローチであると考えられる。現在ヒトIVMで使用される培地は、大部分が他の哺乳類の卵母細胞の実験に基づいており[65, 72]、まだ改良の余地はある。通常、培養液には血清や卵胞液が添加されるが、そ

れらはロット間差や組成の不明確さ、感染リスクが問題となっている。ブタ IVM では、完全合成培地である Porcine oocyte medium (POM) を用いた培養方法が確立されている[73, 74]。また、POM は、霊長類であるコモンマーモセットの卵母細胞の IVM に適している[75]と報告されている。さらにブタでは、IVM 培地への添加物の条件もよく検討されている。Funahashi と Day [76]は、IVM 前半 20 時間のみゴナドトロピンに暴露すると、卵母細胞の細胞質成熟および卵丘膨化が促進されることを報告している。また、dbcAMP とゴナドトロピン存在下で 20 時間培養後に、それらを含まない培地でさらに 24 時間培養することで、IVM - IVF 後の発生能が改善される[1]ことが明らかになっている。そして、IVM 培地への beta-mercaptoethanol の添加は、卵母細胞内のグルタチオン濃度を上げ、IVM - IVF 後の雄性前核形成および胚発生を促進する[1, 77]ことが分かっている。

本研究では、ブタ IVM をモデルとして、ゴナドトロピン無刺激下の卵巣に存在する小卵胞由来ヒト COCs の IVM を行った。また、ヒト卵胞液組成[78-81]を参考にして mPOM の Na/K 比および乳酸濃度を変えて、新たに Human oocyte medium (HOM) を作成した。そして、mPOM または HOM の 2 種類の完全合成培地を用いた際の成熟能を比較した。

実験デザイン

卵巣所見

本研究は岡山大学倫理委員会の承認（承認番号 1818）を得て実施した。卵巣摘出手術を受けた患者の内、研究目的使用への同意が得られた方の卵巣を実験に供した。ゴナドトロピン無刺激下の卵巣表層に存在する胞状卵胞の数と直径、およびそれらから獲得できる COCs 数を調べた。また黄体の有無によって、卵巣を卵胞期 (Fig. 4A, B) と黄

体期 (Fig. 4C, D) に分け、卵巣周期が胞状卵胞数および獲得 COCs 数に及ぼす影響について調べた。

完全合成培地を用いたヒト COCs の IVM

IVM 培地は、mPOM もしくは HOM を用いた。それらの組成は Table 10 に示した。卵胞の直径を計測後、COCs を採取し、1.0 - 2.0 mm、2.1 - 5.0 mm および 5.1 - 6.0 mm の 3 グループに分けた。44 時間 IVM を行った。IVM 44 時間 (ゴナドトロピンおよび dbcAMP 添加 IVM 培地中で 20 時間培養、その後 24 時間はそれらを不含の IVM 培地中で培養) 後に卵丘細胞を除去し、卵母細胞の核相を観察した。

体外成熟卵の染色体および紡錘体の正常性

HOM を用いた IVM で得られた M-II 期卵 (第一極体放出卵) において、染色体と紡錘体 (微小管) の正常性を評価した。紡錘体は抗 α -tubulin 抗体および蛍光標識二次抗体で免疫染色し、染色体は DAPI で蛍光染色した。染色後、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて観察した。

統計解析

5 から 10 回の繰り返しデータは、統計解析ソフト Prism 6 (GraphPad Software Inc.) を用いて解析した。解析方法は、カイ二乗検定 (Table 12, 13, Fig. 5) または、t 検定 (Fig. 4) を用いて行った。なお、有意水準が 5% 以下 ($P < 0.05$) の場合において、統計学的に有意な差があったとした。

結果

卵巣所見

卵巣は、17名の患者（平均年齢 29.8 ± 6.0 歳）から得られ、その所見は Table 11 に示した。患者あたり平均 20.9 ± 9.1 個の胞状卵胞が存在し、それらから平均 18.5 ± 8.9 個の COCs を獲得できた。卵胞直径の中央値は 3.1 mm であった。また、胞状卵胞数は卵胞期 (24.9 ± 9.9 個) と黄体期 (18.2 ± 7.9 個) 間で差は無かった (Fig. 4E, $P > 0.05$)。さらに、獲得 COCs 数は、卵胞期 (23.4 ± 9.1 個) と黄体期 (15.0 ± 7.4 個) 間で同等であった (Fig. 4E, $P > 0.05$)。

完全合成培地を用いたヒト COCs の IVM

mPOM を用いた IVM 後の M-II 期卵の割合は、由来卵胞の直径が 5.1 - 6.0 mm (57.1%) および 2.1 - 5.0 mm (35.9%) に比べて、1.0 - 2.0 mm (13.0%) では有意に低かった (Table 12, $P < 0.05$)。けれども、HOM を用いた IVM 後の M-II 期卵の割合は、由来卵胞の直径間で差は無かった (Table 13, $P > 0.05$)。また、mPOM と HOM 間で GVBD を起こした卵の割合に差は無かった (Fig. 5A, $P > 0.05$) が、1.0-2.0 mm の卵胞由来の COCs の成熟率は、mPOM (13.0%) に比べて、HOM (53.8%) では上昇した (Fig. 5B, $P < 0.05$)。

体外成熟卵の染色体および紡錘体の正常性

正常な染色体の整列と紡錘体の形成を持つ卵 (Fig. 6A, B) も得られたが、多くの卵で染色体の不整列や紡錘体の形成異常がみられた (Fig. 6C, D)。

図表

Table 10. The chemical composition of mPOM and HOM

Component	mPOM	HOM
(mM)		
NaCl	108.00	108.00
KCl	10.00	4.65
KH ₂ PO ₄	0.35	0.35
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.40	0.40
NaHCO ₃	25.00	25.00
Na-pyruvate	0.20	0.20
Hemi Ca-lactate	4.00	4.00
Na-lactate		12.50
Glucose	4.00	4.00
sorbitol	5.00	5.00
L-glutamine	2.00	2.00
L-cysteine	0.60	0.60
BME aminoacids solution	1.52 (2% v/v)	1.52 (2% v/v)
MEM non-essential aminoacids solution	0.70 (1% v/v)	0.70 (1% v/v)
Gentamicin	10 µg/ml	10 µg/ml
Poly vinyl alcohol	3 mg/ml	3 mg/ml
Beta-mercaptoethanol	50 µM	50 µM

Table 11. Characteristics of excised ovaries

Patients	Age ^a (years)	No. of follicles ^a	Follicular diameter (mm)		Ovarian cycle ^b	No. of COCs collected ^a
			range	median		
1	21	9	1.6-6.0	2.8	luteal	8
2	24	20	1.3-5.0	3.4	follicular	16
3	24	35	1.9-5.8	3.3	follicular	26
4	25	12	1.2-6.0	3.0	luteal	7
5	25	29	1.0-4.3	2.2	luteal	26
6	26	17	2.1-5.9	4.4	luteal	13
7	28	22	1.0-3.5	2.3	luteal	20
8	29	10	2.6-5.3	3.1	luteal	9
9	29	15	3.8-8.8	4.9	luteal	11
10	29	15	1.8-4.2	2.7	luteal	12
11	29	32	2.2-8.0	3.8	follicular	37
12	30	33	1.1-6.0	2.7	luteal	28
13	32	20	2.0-5.0	3.6	luteal	16
14	35	17	1.7-4.8	2.3	follicular	23
15	37	37	1.6-5.9	2.7	follicular	32
16	39	22	0.9-4.4	2.9	follicular	19
17	44	11	1.6-6.6	3.9	follicular	11
Total ^a	29.8 ± 6.0	20.9 ± 9.1	0.9-8.8	3.1		18.5 ± 8.9

^aData are shown as Mean ± SD.

^bOvaries were classified into follicular or luteal phase according to absence or presence of a corpus luteum respectively (Fig. 1).

Table 12. Meiotic stages of oocytes after IVM using mPOM

Follicle diameter (mm)	No. of oocytes	No. (%) of oocytes at the stage of				
		GV	M-I	A/T-I	M-II (%)	Deg
5.1-6.0	7	0	1	2	4 (57.1) ^a	0
2.1-5.0	78	5	24	5	28 (35.9) ^a	16
1.0-2.0	23	3	10	1	3 (13.0) ^b	6
total	108	8	35	8	35 (32.4)	22

Data from six replicated trials.

^{a, b}Values with different superscripts within columns are significantly different ($P < 0.05$).

Abbreviations : GV, germinal vesicle; M-I, metaphase-I; A/T-I, anaphase-I and telophase-I;

M-II, metaphase-II; Deg, degeneration.

Table 13. Meiotic stages of oocytes after IVM using HOM

Follicle diameter (mm)	No. of oocytes	No. (%) of oocytes at the stage of				
		GV	M-I	A/T-I	M-II (%)	Deg
5.1-6.0	6	0	2	0	4 (66.7)	0
2.1-5.0	63	2	22	3	22 (34.9)	14
1.0-2.0	13	3	3	0	7 (53.8)	0
total	82	5	27	3	33 (40.2)	14

Data from five replicated trials.

Abbreviations : GV, germinal vesicle; M-I, metaphase-I; A/T-I, anaphase-I and telophase-I;

M-II, metaphase-II; Deg, degeneration.

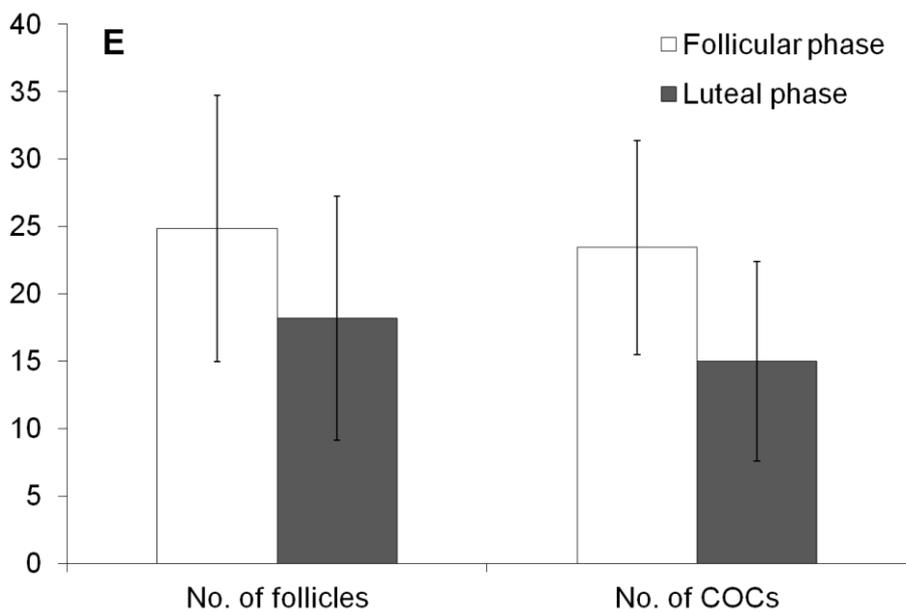
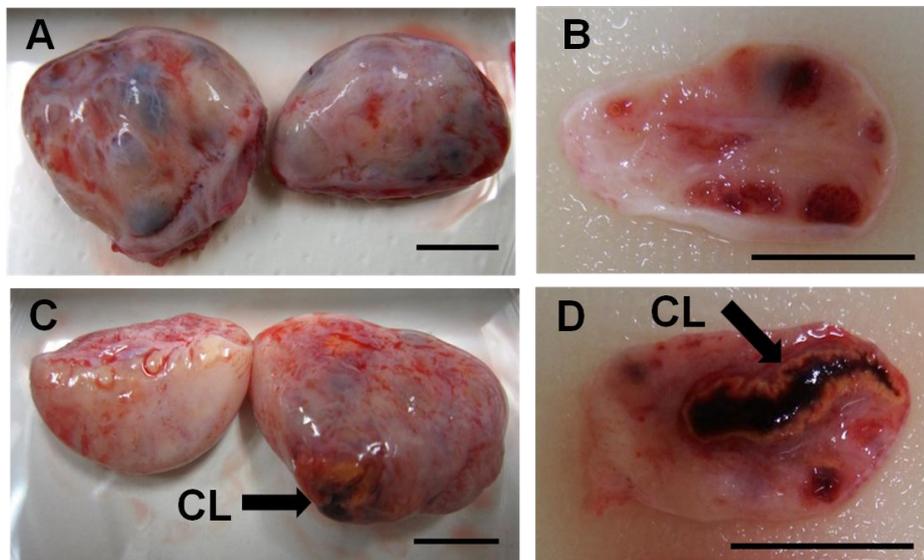


Fig. 4. Ovarian cycle phase at oocyte retrieval. Ovary at follicular phase (A, B), absence of corpus luteum. Ovary at luteal phase (C, D), presence of corpus luteum. Images of whole ovary in A and C. Images of cut ovary in B and D. Collecting COCs from different phases of ovarian cycle (E). Follicular phase from 7 patients and luteal phase from 10 patients. CL=corpus luteum. Scale bar=1 cm. The data are shown as Mean \pm SD

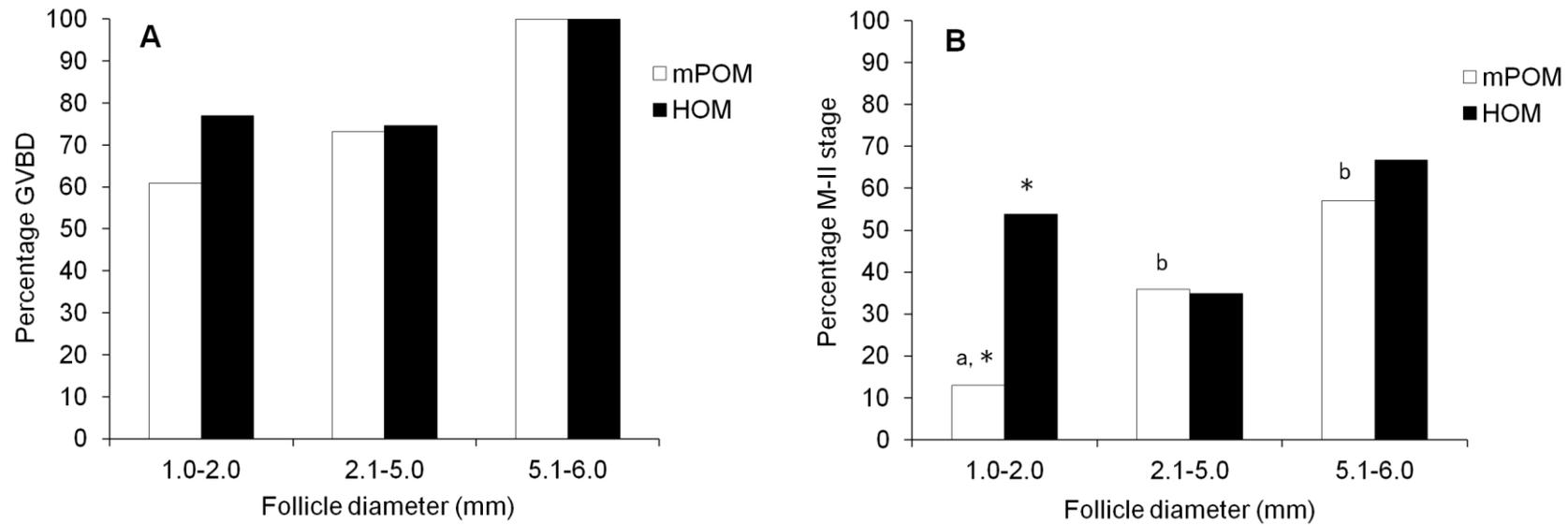


Fig. 5. Proportion of germinal vesicle breakdown (GVBD; A) and metaphase II (M-II; B) stage after *in vitro* maturation (IVM) using mPOM (□; data from six replicated trials) and HOM (■; data from five replicated trials).

*Denotes statistically significant ($P < 0.05$) differences among two groups.

^{a, b}Different letters indicate statistically significant ($P < 0.05$).

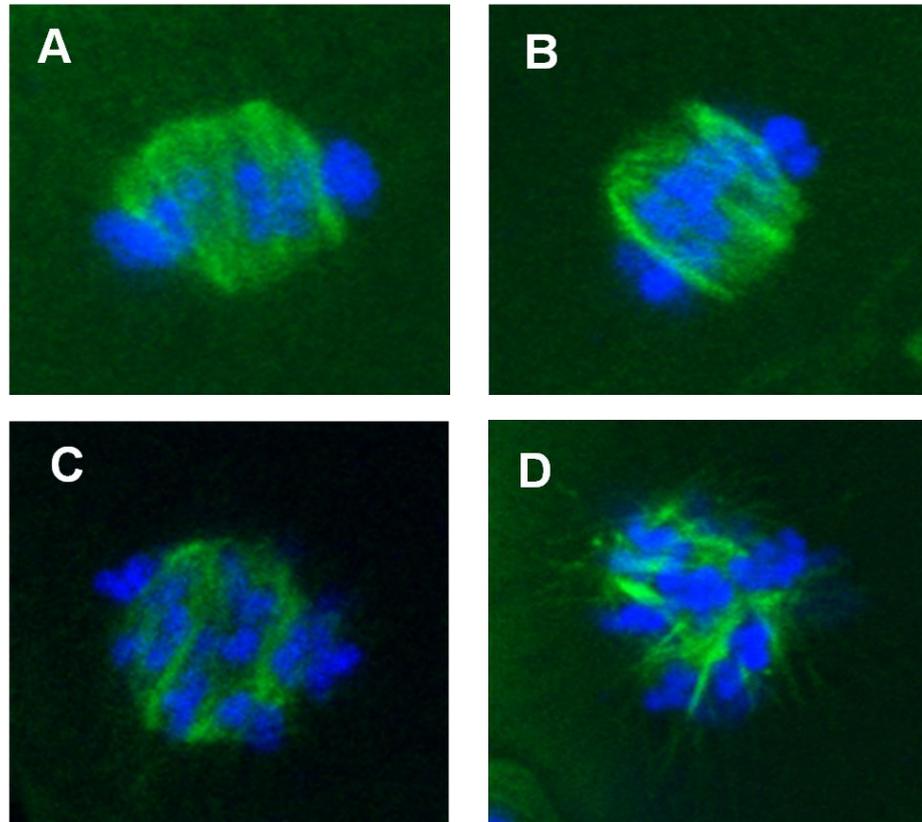


Fig. 6. Structures of chromosomes (blue) and microtubules (green) in M-II oocytes after IVM using HOM. Bipolar spindle with chromosomes aligned at the equator (A, B). Abnormal chromosomal organization associated with bipolar spindle (C). Abnormal spindle structure associated with disorganized chromosomes (D).

考察

本研究では、ゴナドトロピン無刺激下の卵巣であっても、患者あたり平均 18.5 個の COCs が獲得できた。さらに、平均胞状卵胞数および獲得 COCs 数は卵巣周期に影響されなかった。これらの結果は、過去の報告[82, 83]と一致した。したがって、摘出卵巣は、ヒト未成熟卵の貴重な源になりうると考えられる。

これまで卵胞直径の増大に伴い体外成熟能が高まることが様々な動物種で良く知られている[84-87]。ヒトでは、卵胞期において直径 9 - 15 mm の卵胞から採取された卵の M-II 期到達率が、直径 3 - 4 mm の卵胞に比べて、有意に高い[88]ことが報告されている。また、体外成熟可能な最小限の卵胞直径は 5 mm [70]との報告がある。よって、臨床 IVM では 6 - 12 mm の卵胞から経膈採卵される[69]。けれども、本研究のようにゴナドトロピン無刺激下の卵巣では小さな卵胞が大半であると思われる。そこで、本研究では、直径 6 mm 以下の卵胞から COCs を採取し、1.0 - 2.0, 2.1 - 5.0, 5.1 - 6.0 mm の 3 つのグループに分け、その IVM 能を 2 種類の完全合成培地を用いて調べた。IVM の結果、2 mm 以下のとても小さい卵胞由来の COCs であっても、成熟能を持っていることが明らかになった。また、HOM は mPOM に比べて、2 mm 以下の小卵胞由来の COCs の培養に適していた。一般的に *in vivo* では、黄体期の終わりに、次の排卵卵胞は直径 2 - 5 mm (class 5) の卵胞群からリクルートされる[66]。よって、2 mm 以下の小卵胞由来の COCs の効率的な IVM は、雌性生殖細胞の高度利用を可能にする。

今回我々は、mPOM の Na/K 比と乳酸濃度を変えて HOM を作成した。Na/K 比は mPOM では 12.9 であるが、HOM では 29.1 に変えた。これはヒト卵胞液を参考にしており、卵胞液中の Na 濃度は 147.8 ± 8.9 mM、K 濃度は 5.2 ± 0.5 mM、Na/K 比は 28.4 [78]と報告されている。ウシでは、卵胞液中の Mg 濃度を模倣することで、核成熟を促進し、その後の胚盤胞形成率も上昇する[89]ことが示されており、培養液組成を生理的条件に近づけることは有用であると考えられる。一方、乳酸濃度は mPOM の

4.00 mM から HOM では 16.50 mM に変えた。ヒト卵胞液中の乳酸濃度は 6.12 ± 0.17 mM [80]であり、卵胞直径の増加に従い増加する[79, 80]ことが報告されている。また、排卵時のヒト卵管液中の乳酸濃度は 10.50 ± 1.48 mM [81]である。これらから、HOM の乳酸濃度は生理的条件よりも高めに設定した。さらに、ゴナドトロピンの刺激は、顆粒層細胞および卵丘細胞での、乳酸の生産を促進することがラット[90]、マウス[91]、ヒト[79]で報告されている。もしも 2.0 mm 以下の卵胞由来 COC 中の卵丘細胞は、乳酸を産生する能力が低いとしたら、培地中の乳酸濃度を高めることで成熟能の改善につながったかもしれない。しかしながら、今回は培地中の Na/K 比と乳酸濃度の両方を変えているので、そのどちらかが成熟能に影響したかは更なる検討が必要である。

そして本研究では、HOM を用いた IVM 後の M-II 期卵において、染色体と紡錘体の正常性を評価した。その結果、正常な染色体の整列と紡錘体の形成を持つ卵も得られたが、多くの卵で染色体の不整列や紡錘体の形成異常がみられた。IVM 卵において染色体の不整列および紡錘体の形成異常が多くみられる[92-94]ことはこれまでも報告されている。また、受精後の胚発生能が体内成熟卵に比べて低い[58, 95]ことも知られている。これらから、第一極体を放出して形態が正常な M-II 期卵でも、卵側の染色体および紡錘体構造の異常や細胞質成熟が十分に伴わないことが IVM の問題として挙げられる。けれども近年、経膈超音波下で直径 6 mm 未満の卵胞から未成熟卵を採取し、IVM - ICSI 後に正常な産子が得られている[71]。本研究の卵巣においても、存在する卵胞のほとんどが 6 mm 以下であり、そこから得られた IVM 卵を臨床応用できる可能性は十分にある。しかし、今回は IVM 後の細胞質成熟、受精能および胚発生能は評価しておらず、更なる検討が必要である。

結論

ゴナドトロピン無刺激下の卵巣であっても多くの胞状卵胞が存在し、それらから効率的に COCs の獲得が可能であった。よって摘出卵巣は、ヒト IVM の研究や癌患者の妊孕性温存に用いる、卵母細胞の貴重な供給源となり得る。また、IVM 培地に HOM を用いると、直径 2.0 mm 以下の小卵胞由来 COCs の成熟能を改善できた。けれども、IVM 卵の質の向上のためには、さらなる培養条件の改良が必要である。

第5章 総括

卵母細胞の体外成熟 (IVM) とは、卵胞から未成熟卵を取り出して、第二減数分裂中期 (M-II 期) までの核成熟と、正常な受精能および発生能を獲得する細胞質成熟を達成させる過程である。卵巣表層には大小様々な胞状卵胞が存在し、その中の未成熟卵母細胞を効率的に IVM させることが出来れば、雌性生殖細胞の高度利用が可能となる。哺乳動物の卵巣では直径 3 mm 未満の小卵胞 (SF) が大半を占めているが、未経産ブタ SF 由来の卵丘細胞 - 卵母細胞複合体 (COC) の IVM 能および胚発生能は、直径 3 - 6 mm の中卵胞 (MF) のそれらに比べて著しく低い[4-6]。しかし、その原因や SF と MF 間で何が異なっているのかはまだ解明されていない。

IVM 中の細胞内 cAMP と cGMP 量の劇的な変化は、卵母細胞の減数分裂再開に大きく関与している[10, 11]。そこで第 2 章では、先ず、ブタをモデルとして、IVM 前半 24 時間中における、COC および裸化卵母細胞 (DO) 内の cAMP と cGMP 量の変動を、SF および MF 間で比較した。その結果、IVM 前半 20 時間中のブタ COC の cAMP と cGMP 量は、SF と MF 間で異なっていることが明らかになり、この違いが卵母細胞の成熟能に大きく影響していることが示唆された。

Phosphodiesterases (PDEs) は、卵母細胞および卵丘細胞内の cAMP と cGMP レベルを調節し、卵母細胞の減数分裂再開に重要な役割を担っている[10, 43]。次に第 3 章では、第 2 章で得られた知見を基に、PDEs 阻害剤を用いて、COC 中の cAMP および cGMP レベルを維持または増加させ、SF 由来卵母細胞の IVM 能および胚発生能の改善を試みた。その結果、IVM 培地に PDE4 特異的阻害剤 rolipram を添加すると、SF 由来卵母細胞の成熟能および胚発生能を改善することができた。けれども、IVM 培地への PDE5 特異的阻害剤 sildenafil の添加は、SF 由来卵母細胞の成熟能に影響を及ぼさなかった。これらから、IVM 前半 20 時間において、COC 中の cAMP レベルを高

く維持することが、ブタ SF 由来卵母細胞の体外成熟および胚発生に重要であることが明らかになった。

また、近年ヒトの生殖補助医療では、ゴナドトロピン注射の副作用である卵巣過剰刺激症候群の回避[58-61]や、癌患者の妊孕性温存の手段[62-64]として、卵巣刺激が不要な IVM が注目されている。しかし、ヒト SF 由来の COCs の IVM に用いる培養液や培養条件等は未だ確立していない。最後に第 4 章では、SF 由来ヒト COCs の IVM に適した完全合成培地の検討を行った。その結果、IVM 培地に今回新たに作成した human oocyte medium (HOM) を用いることで、非刺激下卵巣に存在する直径 2.0 mm 以下の SF 由来卵母細胞の成熟能を向上させることに成功した。

本研究で得られた知見は、家畜の体外生産やヒトの生殖補助医療での SF 由来卵母細胞の有効活用に貢献し、卵巣あたりの体外受精卵の作出効率を向上させ得る。

参考文献

1. Funahashi H, Day BN. Advances in in vitro production of pig embryos. *J Reprod Fertil Suppl* 1997; 52:271-283.
2. Yoshioka K, Suzuki C, Itoh S, Kikuchi K, Iwamura S, Rodriguez-Martinez H. Production of piglets derived from in vitro-produced blastocysts fertilized and cultured in chemically defined media: effects of theophylline, adenosine, and cysteine during in vitro fertilization. *Biol Reprod* 2003; 69:2092-2099.
3. Morbeck DE, Esbenshade KL, Flowers WL, Britt JH. Kinetics of follicle growth in the prepubertal gilt. *Biol Reprod* 1992; 47:485-491.
4. Yoon KW, Shin TY, Park JI, Roh S, Lim JM, Lee BC, Hwang WS, Lee ES. Development of porcine oocytes from preovulatory follicles of different sizes after maturation in media supplemented with follicular fluids. *Reprod Fertil Dev* 2000; 12:133-139.
5. Marchal R, Vigneron C, Perreau C, Bali-Papp A, Mermillod P. Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. *Theriogenology* 2002; 57:1523-1532.
6. Kohata C, Izquierdo-Rico MJ, Romar R, Funahashi H. Development competence and relative transcript abundance of oocytes derived from small and medium follicles of prepubertal gilts. *Theriogenology* 2013; 80:970-978.
7. Lodde V, Franciosi F, Tessaro I, Modina SC, Luciano AM. Role of gap junction-mediated communications in regulating large-scale chromatin configuration remodeling and embryonic developmental competence acquisition in fully grown bovine oocyte. *Journal of Assisted Reproduction*

- and Genetics 2013; 30:1219-1226.
8. Bui TM, Nguyen KX, Karata A, Ferre P, Tran MT, Wakai T, Funahashi H. Presence of vascular endothelial growth factor during the first half of IVM improves the meiotic and developmental competence of porcine oocytes from small follicles. *Reprod Fertil Dev* 2016.
 9. Ferré P, Bui TMT, Wakai T, Funahashi H. Effect of removing cumulus cells from porcine cumulus-oocyte complexes derived from small and medium follicles during IVM on the apoptotic status and meiotic progression of the oocytes. *Theriogenology* 2016; 86:1705-1710.
 10. Celik O, Celik N, Gungor S, Haberal ET, Aydin S. Selective Regulation of Oocyte Meiotic Events Enhances Progress in Fertility Preservation Methods. *Biochem Insights* 2015; 8:11-21.
 11. Gilchrist RB, Luciano AM, Richani D, Zeng HT, Wang X, Vos MD, Sugimura S, Smitz J, Richard FJ, Thompson JG. Oocyte maturation and quality: role of cyclic nucleotides. *Reproduction* 2016; 152:R143-157.
 12. Bornslaeger EA, Schultz RM. Regulation of mouse oocyte maturation: effect of elevating cumulus cell cAMP on oocyte cAMP levels. *Biol Reprod* 1985; 33:698-704.
 13. Salustri A, Petrungaro S, De Felici M, Conti M, Siracusa G. Effect of follicle-stimulating hormone on cyclic adenosine monophosphate level and on meiotic maturation in mouse cumulus cell-enclosed oocytes cultured in vitro. *Biol Reprod* 1985; 33:797-802.
 14. Bornslaeger EA, Mattei P, Schultz RM. Involvement of cAMP-dependent protein kinase and protein phosphorylation in regulation of mouse oocyte

- maturation. *Dev Biol* 1986; 114:453-462.
15. Zhang M, Su YQ, Sugiura K, Xia G, Eppig JJ. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. *Science* 2010; 330:366-369.
 16. Vaccari S, Weeks JL, 2nd, Hsieh M, Menniti FS, Conti M. Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. *Biol Reprod* 2009; 81:595-604.
 17. Downs SM, Hunzicker-Dunn M. Differential regulation of oocyte maturation and cumulus expansion in the mouse oocyte-cumulus cell complex by site-selective analogs of cyclic adenosine monophosphate. *Dev Biol* 1995; 172:72-85.
 18. Shimada M, Nishibori M, Isobe N, Kawano N, Terada T. Luteinizing hormone receptor formation in cumulus cells surrounding porcine oocytes and its role during meiotic maturation of porcine oocytes. *Biol Reprod* 2003; 68:1142-1149.
 19. Norris RP, Freudzon M, Mehlmann LM, Cowan AE, Simon AM, Paul DL, Lampe PD, Jaffe LA. Luteinizing hormone causes MAP kinase-dependent phosphorylation and closure of connexin 43 gap junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption. *Development* 2008; 135:3229-3238.
 20. Norris RP, Ratzan WJ, Freudzon M, Mehlmann LM, Krall J, Movsesian MA, Wang H, Ke H, Nikolaev VO, Jaffe LA. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development* 2009; 136:1869-1878.

21. Conti M, Hsieh M, Zamah AM, Oh JS. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 356:65-73.
22. Mattioli M, Galeati G, Barboni B, Seren E. Concentration of cyclic AMP during the maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. *J Reprod Fertil* 1994; 100:403-409.
23. Shimada M, Terada T. Roles of cAMP in regulation of both MAP kinase and p34(cdc2) kinase activity during meiotic progression, especially beyond the MI stage. *Mol Reprod Dev* 2002; 62:124-131.
24. Bagg MA, Nottle MB, Grupen CG, Armstrong DT. Effect of dibutyryl cAMP on the cAMP content, meiotic progression, and developmental potential of in vitro matured pre-pubertal and adult pig oocytes. *Mol Reprod Dev* 2006; 73:1326-1332.
25. Bagg MA, Nottle MB, Armstrong DT, Grupen CG. Effect of follicle size and dibutyryl cAMP on the cAMP content and gap junctional communication of porcine prepubertal cumulus-oocyte complexes during IVM. *Reprod Fertil Dev* 2009; 21:796-804.
26. Dekel N, Kraicer PF. Induction in vitro of mucification of rat cumulus oophorus by gonadotrophins and adenosine 3',5'-monophosphate. *Endocrinology* 1978; 102:1797-1802.
27. Eppig JJ. Gonadotropin stimulation of the expansion of cumulus oophori isolated from mice: general conditions for expansion in vitro. *J Exp Zool* 1979; 208:111-120.
28. Norris RP, Freudzon M, Nikolaev VO, Jaffe LA. Epidermal growth factor

- receptor kinase activity is required for gap junction closure and for part of the decrease in ovarian follicle cGMP in response to LH. *Reproduction* 2010; 140:655-662.
29. Funahashi H, Cantley TC, Day BN. Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to dibutyryl cyclic adenosine monophosphate improves developmental competence following in vitro fertilization. *Biol Reprod* 1997; 57:49-53.
 30. Liu X, Xie F, Zamah AM, Cao B, Conti M. Multiple pathways mediate luteinizing hormone regulation of cGMP signaling in the mouse ovarian follicle. *Biol Reprod* 2014; 91:9.
 31. Zhang M, Su YQ, Sugiura K, Wigglesworth K, Xia G, Eppig JJ. Estradiol promotes and maintains cumulus cell expression of natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) and meiotic arrest in mouse oocytes in vitro. *Endocrinology* 2011; 152:4377-4385.
 32. Shores EM, Hunter MG. Immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes and comparison with hormone production during follicle development in the pig. *Reprod Fertil Dev* 1999; 11:337-344.
 33. Lafontan M, Moro C, Berlan M, Crampes F, Sengenès C, Galitzky J. Control of lipolysis by natriuretic peptides and cyclic GMP. *Trends Endocrinol Metab* 2008; 19:130-137.
 34. Armani A, Marzolla V, Rosano GM, Fabbri A, Caprio M. Phosphodiesterase type 5 (PDE5) in the adipocyte: a novel player in fat metabolism? *Trends Endocrinol Metab* 2011; 22:404-411.
 35. Sanchez-Lazo L, Brisard D, Elis S, Maillard V, Uzbekov R, Labas V,

- Desmarchais A, Papillier P, Monget P, Uzbekova S. Fatty acid synthesis and oxidation in cumulus cells support oocyte maturation in bovine. *Mol Endocrinol* 2014; 28:1502-1521.
36. Schoevers EJ, Colenbrander B, Roelen BA. Developmental stage of the oocyte during antral follicle growth and cumulus investment determines in vitro embryo development of sow oocytes. *Theriogenology* 2007; 67:1108-1122.
37. Bender AT, Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* 2006; 58:488-520.
38. Azevedo MF, Faucz FR, Bimpaki E, Horvath A, Levy I, de Alexandre RB, Ahmad F, Manganiello V, Stratakis CA. Clinical and molecular genetics of the phosphodiesterases (PDEs). *Endocr Rev* 2014; 35:195-233.
39. Egbert JR, Uliasz TF, Shuhaibar LC, Geerts A, Wunder F, Kleiman RJ, Humphrey JM, Lampe PD, Artemyev NO, Rybalkin SD, Beavo JA, Movsesian MA, et al. Luteinizing Hormone Causes Phosphorylation and Activation of the cGMP Phosphodiesterase PDE5 in Rat Ovarian Follicles, Contributing, Together with PDE1 Activity, to the Resumption of Meiosis. *Biol Reprod* 2016; 94:110.
40. Sasseville M, Albuz FK, Cote N, Guillemette C, Gilchrist RB, Richard FJ. Characterization of novel phosphodiesterases in the bovine ovarian follicle. *Biol Reprod* 2009; 81:415-425.
41. Sasseville M, Cote N, Guillemette C, Richard FJ. New insight into the role of phosphodiesterase 3A in porcine oocyte maturation. *BMC Dev Biol* 2006; 6:47.

42. Hanna CB, Yao S, Wu X, Jensen JT. Identification of phosphodiesterase 9A as a cyclic guanosine monophosphate-specific phosphodiesterase in germinal vesicle oocytes: a proposed role in the resumption of meiosis. *Fertil Steril* 2012; 98:487-495.e481.
43. Gupta A, Tiwari M, Prasad S, Chaube SK. Role of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases During Meiotic Resumption From Diplotene Arrest in Mammalian Oocytes. *J Cell Biochem* 2017; 118:446-452.
44. Tsafiriri A, Chun SY, Zhang R, Hsueh AJ, Conti M. Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cells: studies using selective phosphodiesterase inhibitors. *Dev Biol* 1996; 178:393-402.
45. Liang CG, Huo LJ, Zhong ZS, Chen DY, Schatten H, Sun QY. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent activation of mitogen-activated protein kinase in cumulus cells is essential for germinal vesicle breakdown of porcine cumulus-enclosed oocytes. *Endocrinology* 2005; 146:4437-4444.
46. Conti M. Specificity of the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate signal in granulosa cell function. *Biol Reprod* 2002; 67:1653-1661.
47. Thomas RE, Armstrong DT, Gilchrist RB. Differential effects of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors on bovine oocyte meiotic maturation. *Dev Biol* 2002; 244:215-225.
48. Wachtel H. Potential antidepressant activity of rolipram and other selective cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase inhibitors. *Neuropharmacology* 1983; 22:267-272.
49. Maurice DH, Ke H, Ahmad F, Wang Y, Chung J, Manganiello VC. Advances

- in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Nat Rev Drug Discov* 2014; 13:290-314.
50. Boolell M, Allen MJ, Ballard SA, Gepi-Attee S, Muirhead GJ, Naylor AM, Osterloh IH, Gingell C. Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 1996; 8:47-52.
 51. Rall TW, Sutherland EW. Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. *J Biol Chem* 1958; 232:1065-1076.
 52. McKenna SD, Pietropaolo M, Tos EG, Clark A, Fischer D, Kagan D, Bao B, Chedrese PJ, Palmer S. Pharmacological inhibition of phosphodiesterase 4 triggers ovulation in follicle-stimulating hormone-primed rats. *Endocrinology* 2005; 146:208-214.
 53. Conti M. Phosphodiesterases and regulation of female reproductive function. *Curr Opin Pharmacol* 2011; 11:665-669.
 54. Di Giacomo M, Camaioni A, Klinger FG, Bonfiglio R, Salustri A. Cyclic AMP-elevating Agents Promote Cumulus Cell Survival and Hyaluronan Matrix Stability, Thereby Prolonging the Time of Mouse Oocyte Fertilizability. *J Biol Chem* 2016; 291:3821-3836.
 55. Ruvolo G, Fattouh RR, Bosco L, Brucculeri AM, Cittadini E. New molecular markers for the evaluation of gamete quality. *J Assist Reprod Genet* 2013; 30:207-212.
 56. Zeng HT, Richani D, Sutton-McDowall ML, Ren Z, Smitz JE, Stokes Y, Gilchrist RB, Thompson JG. Prematuration with cyclic adenosine monophosphate modulators alters cumulus cell and oocyte metabolism and

- enhances developmental competence of in vitro-matured mouse oocytes. *Biol Reprod* 2014; 91:47.
57. Li HJ, Sutton-McDowall ML, Wang X, Sugimura S, Thompson JG, Gilchrist RB. Extending prematuration with cAMP modulators enhances the cumulus contribution to oocyte antioxidant defence and oocyte quality via gap junctions. *Hum Reprod* 2016; 31:810-821.
 58. Trounson A, Wood C, Kausche A. In vitro maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients*. *Fertility and Sterility* 1994; 62:353-362.
 59. Cha KY, Han SY, Chung HM, Choi DH, Lim JM, Lee WS, Ko JJ, Yoon TK. Pregnancies and deliveries after in vitro maturation culture followed by in vitro fertilization and embryo transfer without stimulation in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2000; 73:978-983.
 60. Child TJ, Abdul-Jalil AK, Gulekli B, Tan SL. In vitro maturation and fertilization of oocytes from unstimulated normal ovaries, polycystic ovaries, and women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2001; 76:936-942.
 61. Chian RC. In-vitro maturation of immature oocytes for infertile women with PCOS. *Reprod Biomed Online* 2004; 8:547-552.
 62. Fadini R, Dal Canto M, Mignini Renzini M, Milani R, Fruscio R, Cantu MG, Brambillasca F, Coticchio G. Embryo transfer following in vitro maturation and cryopreservation of oocytes recovered from antral follicles during conservative surgery for ovarian cancer. *J Assist Reprod Genet* 2012; 29:779-781.
 63. De Vos M, Smits J, Woodruff TK. Fertility preservation in women with

- cancer. *Lancet* 2014; 384:1302-1310.
64. Prasath EB, Chan ML, Wong WH, Lim CJ, Tharmalingam MD, Hendricks M, Loh SF, Chia YN. First pregnancy and live birth resulting from cryopreserved embryos obtained from in vitro matured oocytes after oophorectomy in an ovarian cancer patient. *Hum Reprod* 2014; 29:276-278.
 65. Trounson A, Anderiesz C, Jones G. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reproduction* 2001; 121:51-75.
 66. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum Reprod* 1986; 1:81-87.
 67. Gougeon A, Lefevre B. Evolution of the diameters of the largest healthy and atretic follicles during the human menstrual cycle. *J Reprod Fertil* 1983; 69:497-502.
 68. Russell JB. Immature oocyte retrieval combined with in-vitro oocyte maturation. *Hum Reprod* 1998; 13 Suppl 3:63-70; discussion 71-65.
 69. Son WY, Chung JT, Herrero B, Dean N, Demirtas E, Holzer H, Elizur S, Chian RC, Tan SL. Selection of the optimal day for oocyte retrieval based on the diameter of the dominant follicle in hCG-primed in vitro maturation cycles. *Human Reproduction* 2008; 23:2680-2685.
 70. Wynn P, Picton HM, Krapez JA, Rutherford AJ, Balen AH, Gosden RG. Pretreatment with follicle stimulating hormone promotes the numbers of human oocytes reaching metaphase II by in-vitro maturation. *Hum Reprod* 1998; 13:3132-3138.
 71. Guzman L, Ortega-Hrepich C, Albuz FK, Verheyen G, Devroey P, Smits J, De Vos M. Developmental capacity of in vitro-matured human oocytes retrieved

- from polycystic ovary syndrome ovaries containing no follicles larger than 6 mm. *Fertility and Sterility* 2012; 98:503-507.e502.
72. Nogueira D, Sadeu J, Montagut J. In Vitro Oocyte Maturation: Current Status. *Seminars in Reproductive Medicine* 2012; 30:199-213.
 73. Yoshioka K, Suzuki C, Onishi A. Defined system for in vitro production of porcine embryos using a single basic medium. *J Reprod Dev* 2008; 54:208-213.
 74. Akaki Y, Yoshioka K, Noguchi M, Hoshi H, Funahashi H. Successful piglet production in a chemically defined system for in-vitro production of porcine embryos: dibutyryl cyclic amp and epidermal growth factor-family peptides support in-vitro maturation of oocytes in the absence of gonadotropins. *J Reprod Dev* 2009; 55:446-453.
 75. Tomioka I, Takahashi T, Shimada A, Yoshioka K, Sasaki E. Birth of common marmoset (*Callithrix jacchus*) offspring derived from in vitro-matured oocytes in chemically defined medium. *Theriogenology* 2012; 78:1487-1493.
 76. Funahashi H, Day BN. Effects of the duration of exposure to hormone supplements on cytoplasmic maturation of pig oocytes in vitro. *J Reprod Fertil* 1993; 98:179-185.
 77. Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Prather RS, Day BN. Presence of beta-mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured in vitro and the rate of blastocyst development after in vitro fertilization. *Theriogenology* 1998; 50:747-756.
 78. Edwards RG. Follicular fluid. *J Reprod Fertil* 1974; 37:189-219.
 79. Harlow CR, Winston RM, Margara RA, Hillier SG. Gonadotrophic control of

- human granulosa cell glycolysis. *Hum Reprod* 1987; 2:649-653.
80. Leese HJ, Lenton EA. Glucose and lactate in human follicular fluid: concentrations and interrelationships. *Hum Reprod* 1990; 5:915-919.
81. Gardner DK, Lane M, Calderon I, Leeton J. Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells**Supported by IVF America Inc., Greenwich, Connecticut and Monash IVF Pty. Ltd., Melbourne, Victoria, Australia. *Fertility and Sterility* 1996; 65:349-353.
82. Cha KY, Koo JJ, Ko JJ, Choi DH, Han SY, Yoon TK. Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program**Prize paper, presented at the 45th Annual Meeting of The American Fertility Society, San Francisco, California, November 11 to 16, 1989. *Fertility and Sterility* 1991; 55:109-113.
83. Maman E, Meirov D, Brengauz M, Raanani H, Dor J, Hourvitz A. Luteal phase oocyte retrieval and in vitro maturation is an optional procedure for urgent fertility preservation. *Fertility and Sterility* 2011; 95:64-67.
84. Erickson GF, Sorensen RA. In vitro maturation of mouse oocytes isolated from late, middle, and pre-antral graafian follicles. *J Exp Zool* 1974; 190:123-127.
85. Moor RM, Trounson AO. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent developmental capacity. *J Reprod Fertil* 1977; 49:101-109.
86. Motlik J, Crozet N, Fulka J. Meiotic competence in vitro of pig oocytes

- isolated from early antral follicles. *J Reprod Fertil* 1984; 72:323-328.
87. Martino A, Mogas T, Palomo MJ, Paramio MT. Meiotic competence of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 1994; 41:969-980.
 88. Tsuji K, Sowa M, Nakano R. Relationship between human oocyte maturation and different follicular sizes. *Biol Reprod* 1985; 32:413-417.
 89. Iwata H, Hashimoto S, Ohota M, Kimura K, Shibano K, Miyake M. Effects of follicle size and electrolytes and glucose in maturation medium on nuclear maturation and developmental competence of bovine oocytes. *Reproduction* 2004; 127:159-164.
 90. Billig H, Hedin L, Magnusson C. Gonadotrophins stimulate lactate production by rat cumulus and granulosa cells. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1983; 103:562-566.
 91. Boland NI, Humpherson PG, Leese HJ, Gosden RG. Pattern of lactate production and steroidogenesis during growth and maturation of mouse ovarian follicles in vitro. *Biol Reprod* 1993; 48:798-806.
 92. Racowsky C, Kaufman ML. Nuclear degeneration and meiotic aberrations observed in human oocytes matured in vitro: analysis by light microscopy. *Fertil Steril* 1992; 58:750-755.
 93. Li Y, Feng H-L, Cao Y-J, Zheng G-J, Yang Y, Mullen S, Critser JK, Chen Z-J. Confocal microscopic analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes matured in vitro. *Fertility and Sterility* 2006; 85:827-832.
 94. Shirasawa H, Kumagai J, Sato W, Kumazawa Y, Sato N, Terada Y. Retrieval and in vitro maturation of human oocytes from ovaries removed during surgery for endometrial carcinoma: a novel strategy for human oocyte

research. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2013; 30:1227-1230.

95. Walls ML, Ryan JP, Keelan JA, Hart R. In vitro maturation is associated with increased early embryo arrest without impairing morphokinetic development of useable embryos progressing to blastocysts. *Hum Reprod* 2015; 30:1842-1849.

参考資料 1

略語リスト

A/T-I	Anaphase-I and Telophase-I
ART	Assisted reproductive technology
BSA	Bovine serum albumin
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate
CL	Corpus luteum
COCs	Cumulus oocyte complexes
dbcAMP	Dibutyryl cyclic adenosine 3' 5' monophosphate
DO	Denuded oocyte
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
eCG	Equine chorionic gonadotropin
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FCS	Fetal calf serum
GV	Germinal vesicle
GVBD	Germinal vesicle breakdown
hCG	Human chorionic gonadotropin
HOM	Human oocyte medium
IVC	In vitro culture
IVM	In vitro maturation
M-I	Metaphase-I
M-II	Metaphase-II

MF	Middle follicle
M199	Medium 199
OHSS	Hyperstimulation syndrome
PBS	Phosphate buffered saline
PCO	Polycystic ovaries
PCOS	Polycystic ovary syndrome
PDE	Phosphodiesterase
PI	Propidium iodide
POM	Porcine oocyte medium
ProM-I	Prometaphase-I
PVA	Polyvinyl alcohol
PZM	Porcine zygote medium
SD	Standard deviation
SEM	Standard error of the mean
SF	Small follicle
TL-HEPES	Hepes-buffered Tyrode's lactate

參考資料 2

培養液組成表

Modified TL-HEPES-PVA (mTL-HEPES-PVA)

Component	Concentration (mM)
NaCl	114.00
KCl	3.20
NaHCO ₃	2.00
NaH ₂ PO ₄	0.34
Na-lactate	10.00
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.50
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.00
Sorbitol	12.00
HEPES	10.00
Na-pyruvate	0.20
Gentamicin	25 µg/ml
Penicillin G potassium	75 µg/ml
Polyvinyl alcohol	1 mg/ml

Phenol red 5 µg/ml

pH 7.4

Modified porcine oocyte medium (mPOM)

Component	Concentration (mM)
NaCl	108.00
KCl	10.00
KH ₂ PO ₄	0.35
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.40
NaHCO ₃	25.00
Na-pyruvate	0.20
Hemi-Ca-lactate	4.00
Glucose	4.00
L-glutamine	2.00
Sorbitol	5.00
L-cysteine	0.60
BME amino acids solution	1.52
MEM non essential amino acids solution	0.70
Gentamicin	10 µg/ml
Polyvinyl alcohol	3 mg/ml
Beta-mercaptoethanol	50 µM

Electroporation medium

Component	Concentration (mM)
Mannitol	250.0
HEPES	0.5
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.1
Polyvinyl alcohol	100 µg/ml

pH 7.2

Modified medium 199 (mM199)

M199 with Earle's salts supplemented with

Component	Concentration (mM)
Glucose	3.05
Hemi-Ca-lactate	2.92
Na-pyruvate	0.91
Sorbitol	12.00
NaHCO ₃	26.20
Penicillin G potassium	75 µg/ml
Gentamicin	25 µg/ml

pH 7.4

Porcine zygote medium (PZM)

Component	Concentration (mM)
NaCl	108.00
KCl	10.00
KH ₂ PO ₄	0.35
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.40
NaHCO ₃	25.00
Na-pyruvate	0.20
Hemi-Ca-lactate	4.00
L-glutamine	2.00
Hypotaurine	5.00
BME amino acids solution	1.52
MEM non essential amino acids solution	0.70
Gentamicin	10 µg/ml
Polyvinyl alcohol	3 mg/ml

Human oocyte medium (HOM)

Component	Concentration (mM)
NaCl	108.00
KCl	4.65
KH ₂ PO ₄	0.35
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.40
NaHCO ₃	25.00
Na-pyruvate	0.20
Hemi-Ca-lactate	4.00
Na-lactate	12.50
Glucose	4.00
L-glutamine	2.00
Sorbitol	5.00
L-cysteine	0.60
BME amino acids solution	1.52
MEM non essential amino acids solution	0.70
Gentamicin	10 µg/ml
Polyvinyl alcohol	3 mg/ml
Beta-mercaptoethanol	50 µM