

第9回麻布大学 生殖・発生工学セミナー

異種間移植を利用した未成熟生殖細胞の成熟と胚発生

金子 浩之, 菊池 和弘, 前泊 直樹*, 中井美智子

(独)農業生物資源研究所・*麻布大学

1. はじめに

原始卵胞に含まれる卵母細胞（以下、原始卵胞卵母細胞と略）は、畜産あるいは医学領域において卵母細胞の潜在的な資源である。しかしながら、未成熟な生殖細胞は受精・初期発生能を有さないため、何らかの方法で初期発生能を付与する必要がある。1989年に Gosden ら [1] がヒツジの卵巣をヌードマウスへ移植すること（異種間移植）によって、未発達な卵胞を胞状卵胞へと発育させ得ることを示した。この研究以降、異種間移植が未成熟な卵母細胞を成熟させる有力な手法と期待され、種々の動物の卵巣移植が行われてきた。しかしながら、遺伝的な距離が極めて近いマウスからヌードラットへの卵巣の移植例で産仔が得られた [2] のみで、他の哺乳動物ではかろうじて初期胚発生に到達した段階である [3]。今回の発表では、私たちのグループが実施してきた異種間移植を用いたブタの原始卵胞卵母細胞への初期発生能の付与について紹介する。

2. 原始卵胞卵母細胞への成熟能および受精能の付与

この実験では、ヌードマウスからの移植卵巣の回収適期およびヌードマウスに対するホルモン処理の開始適期について検討した。生後20日齢のブタ卵巣の卵胞は95%以上が原始卵胞で構成される（図1）。このような幼若期卵巣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。マウスの臍開口（即ち胞状卵胞の出現）から、10、30および60日後にeCG（妊馬絨毛性性腺刺激ホルモン）を5IU投与した。48時間後に移植卵巣から卵母細胞を採取し、体外培養系を用いて成熟能（減数分裂再開能）および受精能の有無を解析した。その結果、臍開口後60

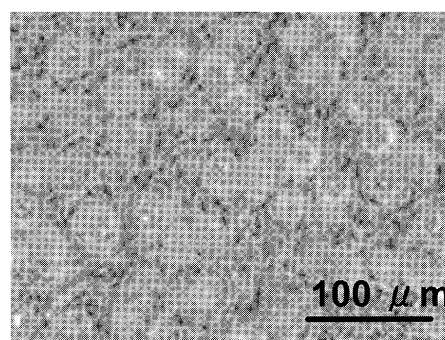


図1 生後20日齢のブタ卵巣像。
多数の原始卵胞が見られる。

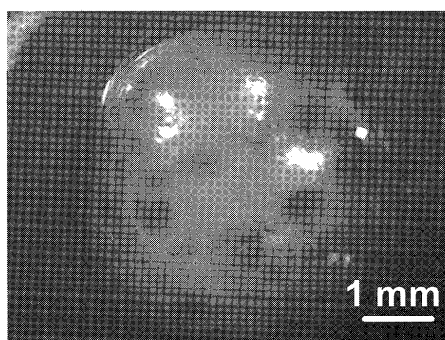


図2 移植ブタ卵巣像。
マウスの臍開口後60日にeCGを投与した。

日にeCGをマウスに投与すると、他の群に比較して移植卵巣内に直径1～2mm前後の胞状卵胞が増加すること、より多くのフルサイズに達した卵母細胞（直径115 μm以上）が回収できることが明らかとなった（図3）。さらに、回収したブタ卵母細胞は成熟能および受精能（図4）を有することが明らかとなった [4]。

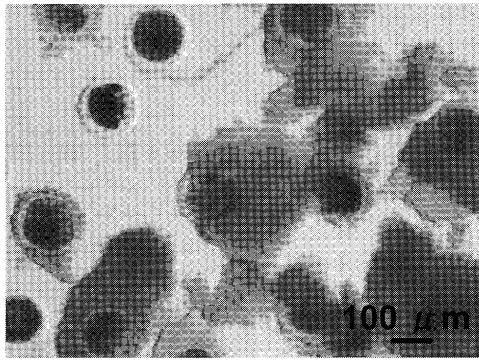


図3 移植ブタ卵巣から回収した卵母細胞-卵丘細胞複合体。

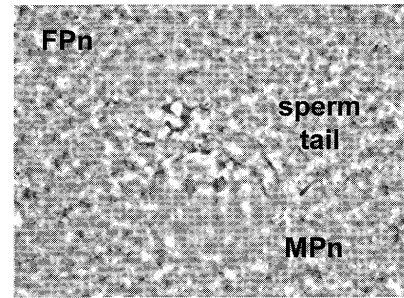


図4 移植ブタ卵巣から回収した卵母細胞の受精像。
FPn：雌性前核，MPn：雄性前核。

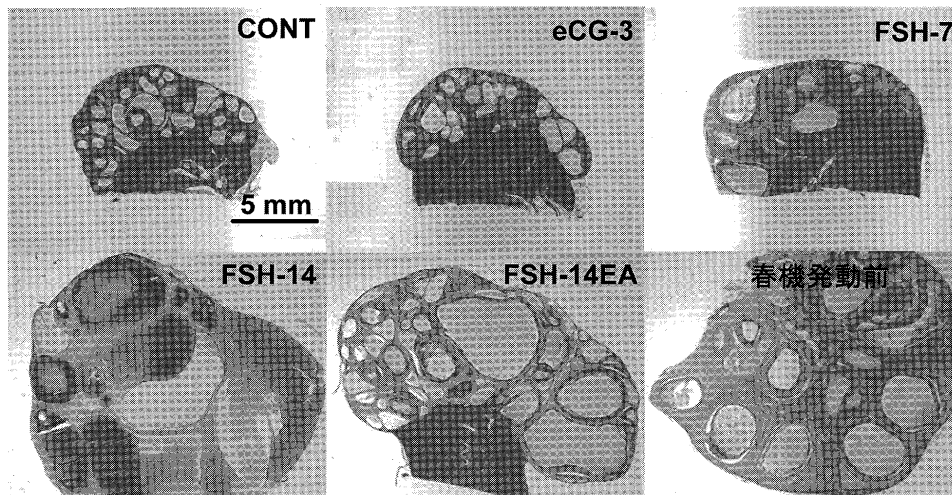


図5 種々のホルモン処理後の移植ブタ卵巣像。
比較のため春機発動前の屠場卵巣像を示した。CONT：ホルモン無投与。

3. 原始卵母細胞からの初期胚発生

上述の実験系によって得た原始卵母細胞由来の成熟卵母細胞は、媒精後、体外培養系および成雌ブタの卵管内移植によって分割は起こるものの胚盤胞に到達し得なかった [5]。その原因は卵母細胞の細胞質成熟が不十分であると推定される。そこで、卵胞発育を長期間刺激することによって卵母細胞の成熟を促進し、採取した卵母細胞の成熟能および初期胚発生能を体外培養系を用いて調べた。

臍開口後60日前後のヌードマウスにeCGの投与、またはブタFSHを充填した浸透圧ポンプの皮下留置を行った。移植卵巣を、eCG投与2日(eCG-2群)または3日後(eCG-3群)、FSH投与7日間(FSH-7群)または14日間後(FSH-14群)に採取した。また卵胞の血腫化を抑制する目的で、FSH処理開始7日後に抗エストロジオール血清を投与し、その7日後に移植卵巣を採取した(FSH-14EA群)。

その結果、ホルモン処理群、特にFSH-14EA群では胞状卵胞の発育が顕著であったが、FSH-14群では胞状卵胞の多くが血腫となった(図5)。

フルサイズに達したブタ卵母細胞のマウス1匹あたりの回収数は、eCG-3、FSH-7およびFSH-14EA群において、性腺刺激ホルモンを投与しなかった対照群に比較して明らかな増加を示した(図6)。体外成熟後、上記3処理群では対照群に比較して多数の卵母細胞が成熟した(図7)。

さらに100個前後の成熟卵母細胞を体外受精し7日間の体外培養の結果、eCG-3、FSH-7およびFSH-14EA群においてそれぞれ1卵母細胞ずつ胚盤胞への発生が観察された(図8および9)。以上の結果から、ヌードマウスにホルモン処理を施すことによって、移植したブタ原始卵母細胞に低率ながらも胚発生能を付与できることが明らかとなった [3]。

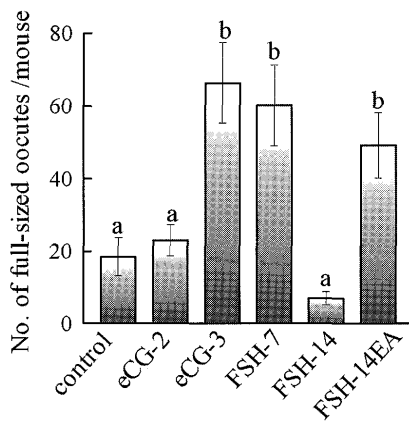


図6 種々のホルモン処理後にマウスより回収された卵母細胞（直径 $\geq 115 \mu\text{m}$ ）の数

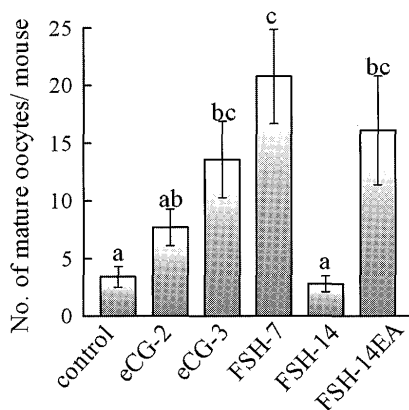


図7 種々のホルモン処理後にマウスより回収された卵母細胞の成熟能

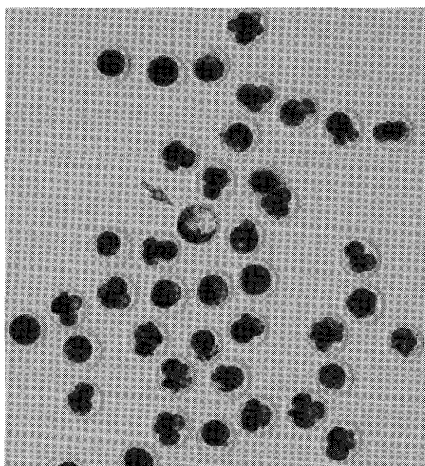


図8 FSH-14EA処理後、回収した卵母細胞の体外受精後の発生状況。矢印：胚盤胞

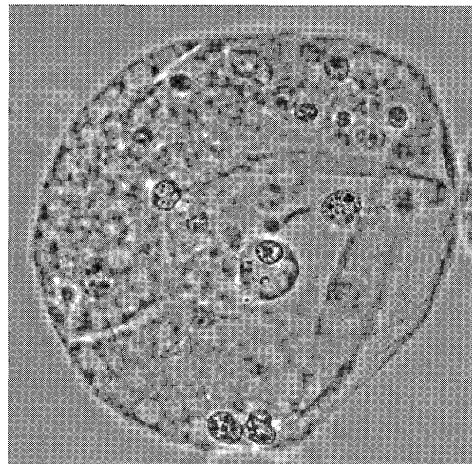


図9 FSH-14EA処理によって得られたブタ初期胚盤胞。細胞数：30

せることによって、原始卵胞卵母細胞を成熟させ受精能を与え初期胚盤胞にまで発生させることが可能となった。しかしながら、依然として胚発生率は低率である。その原因は現在の手法では原始卵胞卵母細胞に完全な細胞質成熟を付与できないものと推察され、今後その問題点を解消する必要があるものと考えられる。

参考文献

- 1) Gosden RG, Boulton MI, Grant K, Webb R. Follicular development from ovarian xenografts in SCID mice. *J Reprod Fertil* 1994; 101: 619-623.
- 2) Snow M, Cox S-L, Jenkin G, Trounson A, Shaw J. Generation of live young from xenografted mouse ovaries. *Science* 2002; 297: 2227.
- 3) Kaneko H, Kikuchi K, Noguchi J, Ozawa M, Ohnuma K, Maedomari N, Kashiwazaki N. Effects of gonadotrophin treatments on meiotic and developmental competence of oocytes in porcine primordial follicles following xenografting to nude mice. *Reproduction* 2006; 131: 279-288.
- 4) Kaneko H, Kikuchi K, Noguchi J, Hosoe M, Akita T. Maturation and fertilization of porcine oocytes from primordial follicles by a combination of xenografting and in vitro culture. *Biol Reprod* 2003; 69: 1488-1493.
- 5) Kikuchi K, Kaneko H, Nakai M, Noguchi J, Ozawa M, Ohnuma K, Kashiwazaki N. In vitro and in vivo developmental ability of oocytes derived from porcine primordial follicles xenografted into nude mice. *J Reprod Dev* 2006; 52: 51-57.

4. 終わりに

これまでの研究から、ブタ原始卵胞をヌードマウスに移植し、ホルモン処理と体外培養系を組み合わせ