

In vitro production of mouse embryos using oocytes derived from *in vivo* and *in vitro* grown follicles

（体内および体外発育卵胞由来の卵子を用いた
マウス胚の体外生産に関する研究）

学位論文内容の要旨

通常、胚の体外生産は体内で発育した胞状卵胞由来の未成熟卵子を体外で成熟（IVM）および受精（IVF）させ、体外で発生培養（IVC）することにより行っている。しかし、体外成熟卵子からの胚の生産効率は体内成熟卵子に比べると低い。また、卵巣内に多数存在する前胞状卵胞を体外で発育させ、成熟卵胞を得ることができれば胚の生産効率は一層向上する。しかし、前胞状卵胞由来の卵子を用いた胚の生産はマウスで成功例が報告されているが、その作出効率は低い。そこで本研究では、体内および体外発育卵胞由来の卵子を用いたマウス胚の体外生産法を改善するため実験を行った。

第1章では、体内発育卵胞由来のマウス卵子を用い、IVM、IVF および IVC の各ステップにおける培養気相中の酸素濃度が胚の生産効率に及ぼす影響について調べた。体内で発育した胞状卵胞から採取した未成熟卵子は、5 あるいは 20%酸素の気相中で 15～17 時間の IVM を行った。さらに、体外成熟卵子は 5 あるいは 20%酸素の気相中で IVF および IVC を行い発生能を調べた。その結果、IVM および IVC での酸素濃度を 5%にすると体外受精胚の胚盤胞への発生率は向上したが、IVF における酸素濃度の違いは胚盤胞への発生率に影響を及ぼさなかった。分割率は、15 時間の IVM では酸素濃度を 5%にすると高くなったが、16 および 17 時間の IVM では酸素濃度の影響は見られなかった。これらの結果から、IVM および IVC における気相中の酸素濃度を 5%に低下させることによって胚の生産効率の向上することが明らかになった。また、高濃度酸素下での IVM は、卵子の核成熟あるいは受精能獲得を遅延させることが示唆された。

第2章では、IVM における気相中の酸素が卵子の核成熟、受精能および発生能に及ぼす影響について検討した。すなわち、胞状卵胞から採取したマウスの未成熟卵子は 5 あるいは 20%酸素の気相中で 12～19 時間の IVM を行ったのち、

IVF および IVC に供し、卵子の核成熟率（第二減数分裂中期の卵子の割合）、受精率、胚盤胞への発生率および胚盤胞の細胞数を調べた。また、体外成熟卵子の成績は、体内成熟卵子（排卵卵子）の成績と比較した。その結果、卵子の核成熟率には IVM における酸素濃度による差異は見られなかった。また、受精率と分割率の最高値も酸素濃度によって差異は見られなかったが、両率の最高値は 5 および 20%酸素下で IVM を行った場合、それぞれ 16 および 17 時間の培養で得られた。胚盤胞への発生率は、IVM における培養時間に拘わらず 5%酸素下で高い値を示し、5%酸素下で 16 時間の IVM を行った場合に胚盤胞への発生率と胚盤胞の細胞数が最高値を示した。また、体内成熟卵子の胚盤胞への発生率および胚盤胞の細胞数は、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（hCG）処理の 15 時間目に採取して IVF に供した場合に最高値を示し、その値は 5%酸素下で 16 時間成熟培養した卵子の発生率よりも高い値であった。これらの成績から、5%酸素下での IVM の優位性が確認されるとともに、現在の培養法では約 16 時間の IVM が最適であることが明らかになった。また、高濃度の酸素下での IVM は卵子の核成熟には影響を及ぼさないが、受精・発生能の獲得を遅らせるとともに、発生能を低下させることも明らかになった。しかし、5%酸素下で体外成熟した卵子でも体内成熟卵子に比べると発生能が低いことも示された。

第 3 章では、体外発育卵胞由来のマウス胚を作出するため、二次卵胞を卵巣から単離してメンブレン・インサートあるいは微小滴中で個別に 5~6 日間培養したのち、培地内に hCG を添加して排卵を誘起した。その結果、インサートおよび微小滴中で培養した卵胞の生存率に差異は認められなかったが、インサート中で培養した卵胞の方が排卵率は高かった。そこで、インサート中で培養した卵胞から排卵された卵子の核相および発生能を調べた。その結果、排卵卵子は約 80%が第二成熟分裂中期にあり、IVF および IVC 後に約 50%が胚盤胞に発育することが分かった。これらの結果から、体外培養により発育および排卵した卵胞に由来する卵子が発生能を有することが確認され、インサートを用いた卵胞培養法がマウス胚の体外生産のみならず卵胞発育や排卵機構の研究に活用できることが示された。

以上のように本研究によって、現在の培養法でマウスの体内発育卵胞由来未成熟卵子から胚を生産するためには、5%酸素下で約 16 時間の IVM が効果的であり、高濃度酸素下での IVM は卵子の受精能獲得を遅らせ、発生能を低下させることが明らかとなった。また、メンブレン・インサートを用いた卵胞培養法はマウス胚の体外生産だけでなく、卵胞発育や排卵機構の研究に活用できることが示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 橋 芳 幸
副 査 教 授 安 居 院 高 志
副 査 教 授 昆 泰 寛
副 査 助 教 授 片 桐 成 二

学 位 論 文 題 名

In vitro production of mouse embryos using oocytes derived from *in vivo* and *in vitro* grown follicles

(体内および体外発育卵胞由来の卵子を用いた
マウス胚の体外生産に関する研究)

学位論文提出者は、体内および体外発育卵胞由来の卵子を用いたマウス胚の体外生産効率を改善するために研究を行った。

まず、体内発育卵胞由来のマウス未成熟卵子を用い、体外成熟 (IVM)、体外受精 (IVF) および発生培養 (IVC) における培養気相中の酸素濃度が胚の生産効率に及ぼす影響について調べた。その結果、IVM および IVC における気相中の酸素濃度を通常 20% から 5% に低下させることによって胚の生産効率が向上することを明らかにした。そこで、IVM における気相中の酸素濃度の影響について、さらに検討を加えた結果、5% 酸素下での IVM は約 16 時間の培養が適当であり、通常 20% 酸素下での IVM に比べ卵子の受精・発生能の獲得時期を早めるとともに発生能を高め、胚の生産効率を向上させることを示した。

ついで、体外発育卵胞由来卵子を用いて効率的にマウス胚を生産するため、卵巣から単離した二次卵胞をメンブレン・インサートあるいは微小滴中で個別に培養したのち、培地内にヒト絨毛性性腺刺激ホルモンを添加して排卵を誘起した。その結果、インサートを用いた培養法は微小滴培養法に比べて卵胞の発育率と排卵率が高く、インサート中で発育した卵胞から排卵された卵子が体内発育卵胞由来の体外成熟卵子と同等の発生能を有することを明らかにした。また、インサートを用いた卵胞培養法はマウス胚の体外生産だけでなく、卵胞発育や排卵機構の研究にも活用できることが示された。

本研究により体内および体外発育卵胞由来の卵子を用いたマウス胚の体外生産効率が改善された。また、メンブレン・インサートを用いた卵胞培

養法が胚の体外生産だけでなく、卵胞発育や排卵機構の研究にも有用であることが示された。よって、審査員一同は、学位論文提出者アハメド アブドゥル ガディル アダム氏が博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有するものと認めた。