

博士論文

成分既知培地を用いたブタ卵母細胞と胚盤胞の  
発生能および品質向上に関する研究

中村 友美

岡山大学環境生命科学研究科

2017年9月

## 目次

要旨 .....	iii
宣言および署名 .....	v
謝辞 .....	vi
論文業績および学会発表リスト .....	vii
受賞リスト .....	ix
略語リスト .....	x
第 1 章 総説 .....	1
第 2 章 TGF- $\alpha$ がブタ卵成熟と初期胚に及ぼす影響 .....	7
1. 緒言 .....	7
2. 材料および方法 .....	9
3. 結果 .....	13
4. 考察 .....	15
5. 小括 .....	19
第 3 章 TGF- $\alpha$ および FSH がブタ卵成熟と初期胚に及ぼす影響 .....	29
1. 緒言 .....	29
2. 材料および方法 .....	31
3. 結果 .....	35
4. 考察 .....	38
5. 小括 .....	43
第 4 章 グルコースおよびグリシンがブタ胚盤胞の発生に及ぼす影響 .....	54
1. 緒言 .....	54
2. 材料および方法 .....	56
3. 結果 .....	59
4. 考察 .....	61

5. 小括.....	65
第5章 成分既知ガラス化保存液を用いたブタ胚のガラス化保存.....	71
1. 緒言.....	71
2. 材料および方法.....	73
3. 結果.....	76
4. 考察.....	78
5. 小括.....	81
第6章 総合考察.....	88
引用文献.....	91

## 要旨

胚の体外生産技術は、卵成熟や受精、胚発生における生理機構の解明のほか、胚移植や発生工学的手法を用いた繁殖技術の基盤技術においても重要である。しかし、体外で培養した卵子や胚の発生能および品質は、体内で発育した卵子や胚に比べて劣っており、耐凍性や胚移植後の産子への発生率も低い。本研究では、ブタ卵母細胞と胚の発生能および品質の向上を図り、動物由来成分を使用しない成分既知培地を用いた培養技術を確立するため、卵母細胞の成熟培養および胚盤胞の発生培養について検討を行った。

まず、成熟培地への transforming growth factor (TGF)- $\alpha$ の添加が卵成熟と胚発生に及ぼす影響について検討した。成熟培地に 10 ng/ml TGF- $\alpha$ を添加すると卵母細胞の核成熟を促進したが、equine chorionic gonadotropin (eCG)と human chorionic gonadotropin (hCG)を添加した場合に比べて促進作用は弱かった。成熟培地に eCG と hCG が存在する場合、TGF- $\alpha$ は第二減数分裂中期(MII)卵の割合、媒精後の受精率および卵割率には影響しなかったが、胚盤胞への発生を促進した。TGF- $\alpha$ を添加あるいは無添加で成熟培養した卵母細胞およびそれに由来する胚盤胞の電顕観察を行ったところ、細胞内微細構造に形態的違いが認められ、微細構造の変化が胚盤胞への発生能に関与する可能性が示唆された。

次に、TGF- $\alpha$ と生殖腺刺激ホルモンの作用の関連性を明確にし、動物由来成分を含まない成熟培地を開発するため、成熟培地への TGF- $\alpha$ と卵胞刺激ホルモン(FSH)が卵成熟および体外受精後の胚発生に及ぼす影響について検討した。MII 卵の割合は、FSH を 0.01~0.1 IU/ml の濃度で添加すると無添加に比べて増加し、FSH と TGF- $\alpha$ を両方添加するとさらに増加した。また、受精率および胚盤胞への発生率は、TGF- $\alpha$ を含む成熟培地に FSH を 0.05 IU/ml 以上添加すると FSH 無添加に比べて増加した。一方、TGF- $\alpha$ と FSH は裸化卵母細胞の核成熟を促進しなかった。EGF レセプター阻害剤である AG1478 は、TGF- $\alpha$ による卵母細胞の核成熟促進作用を完全に阻害したが、FSH による作用は完全には阻害しなかった。さらに、TGF- $\alpha$ と FSH が誘導する卵丘膨化の関連遺伝子の発現動態は異なっていた。したがって、

TGF- $\alpha$ と FSH は卵丘細胞を介して卵成熟を促進するが、一部は異なる経路により相乗的に作用していることが示唆された。

ついで、胚の品質を改善するため、グルコースとグリシンが胚盤胞の生存性および孵化に及ぼす影響を検討した。成分既知の胚発生培地(PZM-5)に 2.5~10 mM グルコースを添加して胚盤胞を培養したところ、胚盤胞の生存率および ATP 含量は、無添加で培養した胚盤胞に比べて増加した。また、PZM-5 に 5 mM グルコースと 10 mM グリシンを添加すると、胚盤胞の孵化率、直径および総細胞数が増加し、アポトーシス細胞の出現頻度は低下した。このことから、グルコースとグリシンはブタ胚盤胞の発生を相乗的に促進することが判明し、胚盤胞における生存細胞数を指標とした胚の品質を改善することが示唆された。

さらに、これらの結果を動物繁殖技術へ応用するため、開発した発生培地(PBM:グルコースとグリシンを添加した PZM-5)をガラス化保存液および加温液の基本液として用いるとともに、体外生産胚の耐凍性を向上させる至適培養条件(胚の発生培地、発生ステージ、および培養日数の違い)について検討した。拡張胚盤胞のガラス化・融解後の生存率および孵化率は、胚の発生日齢や培養培地の違いに関わらず、胚盤胞に比べて有意に高かった。媒精後 5 日目から 1 日間 PBM で培養した胚のガラス化・融解後の生存率および孵化率は、PZM-5 で培養した胚に比べて高かった。また、媒精後 4 日目ないしは 5 日目から PBM で培養した胚を、5 日目あるいは 6 日目にガラス化したところ、胚日齢間で融解後の生存性に差は認められなかった。さらに、成分既知ガラス化保存液でガラス化した拡張胚盤胞を受胎豚の子宮に移植することで正常な産子が得られた。これらの結果から、ブタ胚では胚盤胞に比べて拡張胚盤胞で耐凍性が高く、媒精後 5 日目から 1 日間 PBM で培養すると耐凍性が向上し、発生ステージや培養培地が胚の生存性に大きく影響することが示唆された。

以上のように、成分既知培地を用いて、卵母細胞の成熟と体外受精後の初期胚発生能を改善する成熟培養技術、および胚盤胞の発生を促進し品質と耐凍性を向上させる発生培養技術を開発することができた。本研究成果は、動物由来成分を使用せずにブタ卵母細胞や胚の発生能および品質を向上させることができ、畜産分野のみならず、クローン動物あるいはトランスジェニック動物作出など医学の基盤技術にも寄与すると期待される。

## 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まないこと、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まないことを宣誓します。

中村 友美

2017年9月14日

## 謝辞

本論文を執筆するにあたり、御指導と御鞭撻を賜りました岡山大学大学院環境生命科学研究科 教授 齋藤昇博士、舟橋弘晃博士ならびに木村康二博士に心より厚く御礼申し上げます。また、本研究の遂行および論文作成にあたり、終始御指導と御助言をいただきました株式会社機能性ペプチド研究所取締役所長 星宏良博士ならびに国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門 吉岡耕治博士に深謝致します。

また、実験に御協力いただくとともに、有益な御助言をいただきました北海道大学大学院獣医学研究科准教授 永野昌志博士、日本大学生物資源科学部准教授 三角浩司博士、動物衛生研究部門 鈴木千恵博士、麻布大学獣医学部講師 野口倫子博士に心より感謝申し上げます。さらに、本論文を作成するにあたり、的確な御助言をいただきました山形大学理学部教授 渡辺明彦博士に深く感謝申し上げます。

加えて、本研究に多大なる御協力をいただきました株式会社機能性ペプチド研究所 山下祥子氏、星翼氏、株式会社機能性ペプチド研究所ならびに日東ベスト株式会社の皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究の遂行および論文の作成にあたり、支えてくれた家族に心から感謝します。

## 論文業績および学会発表リスト

### <論文リスト>

1. **Mito T, Yoshioka K, Nagano M, Suzuki C, Yamashita S, Hoshi H** 2009 Transforming growth factor- $\alpha$  in a defined medium during in vitro maturation of porcine oocytes improves their developmental competence and intracellular ultrastructure. *Theriogenology* **72** 841–850.
2. **Mito T, Yoshioka K, Yamashita S, Suzuki C, Noguchi M, Hoshi H** 2012 Glucose and glycine synergistically enhance the in vitro development of porcine blastocysts in a chemically defined medium. *Reproduction, Fertility and Development* **24** 443–450.
3. **Mito T, Yoshioka K, Noguchi M, Yamashita S, Hoshi H** 2013 Recombinant human follicle-stimulating hormone and transforming growth factor-alpha enhance in vitro maturation of porcine oocytes. *Molecular Reproduction and Development* **80** 549–560.
4. **Mito T, Yoshioka K, Noguchi M, Yamashita S, Misumi K, Hoshi T, Hoshi H** 2015 Birth of piglets from in vitro-produced porcine blastocysts vitrified and warmed in a chemically defined medium. *Theriogenology* **84** 1314–1320.

### <学会発表リスト>

1. **Mito T, Yoshioka K, Suzuki C, Yamashita S, Ozawa T, Hoshi H** 2006 Effect of transforming growth factor (TGF)- $\alpha$  on porcine oocyte maturation in a defined medium. XII<sup>th</sup> AAAP Animal Science Congress, Asian-Australasian Association of Animal Production Societies, Busan. (9.18–22) *Abstract* 187.
2. **Mito T, Yoshioka K, Suzuki C, Yamashita S, Hoshi H** 2007 Transforming growth factor (TGF)- $\alpha$  during in vitro maturation of porcine oocytes in a defined medium improves their developmental competence. Tsukuba Meeting for Animal Biotechnology (TMAB), Tsukuba. (1.12–13) *Abstract* 52.

3. 水戸友美, 吉岡耕治, 永野昌志, 鈴木千恵, 山下祥子, 星宏良 2007 成分既知体外成熟培地への TGF- $\alpha$ 添加によるブタの胚発生への影響と卵子の超微形態学的観察. 日本繁殖生物学会. 東京(10月20~22日). *The Journal of Reproduction and Development* **53 Supplement** j133.
4. 水戸友美, 吉岡耕治, 鈴木千恵, 山下祥子, 星宏良 2008 グルコースとグリシンがブタ胚盤胞の発生に及ぼす影響. 日本繁殖生物学会. 福岡(9月18~20日). *The Journal of Reproduction and Development* **54 Supplement** j122.
5. 水戸友美, 吉岡耕治, 鈴木千恵, 山下祥子, 星宏良 2010 ブタ卵子の成熟におけるリコンビナントヒト卵胞刺激ホルモン(rhFSH)および TGF- $\alpha$ の影響と作用機構の解明. 日本繁殖生物学会. 十和田(9月2~4日). *The Journal of Reproduction and Development* **56 Supplement** j121.
6. 水戸友美, 吉岡耕治, 三角浩司, 野口倫子, 鈴木千恵, 山下祥子, 星宏良 2011 ブタ体外生産胚の耐凍性に対する発生ステージ, 日齢および後期胚培養培地の影響. 日本繁殖生物学会. 盛岡(9月15~17日). *The Journal of Reproduction and Development* **57 Supplement** j198.
7. 水戸友美, 吉岡耕治, 三角浩司, 山下祥子, 星翼, 星宏良 2012 MVAC 法を用いたブタ体外生産胚のガラス化保存における平衡時間と融解温度が胚生存性に及ぼす影響. 日本繁殖生物学会. つくば(9月6~8日). *The Journal of Reproduction and Development* **58 Supplement** j173.
8. 水戸友美, 吉岡耕治, 星翼, 山下祥子, 星宏良 2015 リコンビナントヒト血清アルブミン(rHSA)がブタ胚盤胞の発生およびガラス化保存後の生存性に及ぼす影響. 日本動物細胞工学会. 仙台(7月9~10日). *PROGRAM&ABSTRACTS* 84.

## 受賞リスト

第 12 回山形県科学技術奨励賞(2013). 山形県. 山形県庁(10 月 1 日).

## 略語リスト

cAMP	cyclic adenosine 3',5'-monophosphate
cGMP	cyclic guanosine 5'-monophosphate
COCs	cumulus-oocyte complexes
dbcAMP	dibutyryl cyclic adenosine monophosphate
DOs	denuded oocytes
EGF	epidermal growth factor
FSH	follicle-stimulating hormone
GV	germinal vesicle
GVBD	germinal vesicle breakdown
HAPLN1	hyaluronan and proteoglycan link protein 1
HAS2	hyaluronan synthase 2
LH	luteinizing hormone
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MII	metaphase II
PBM	porcine blastocyst medium
PBS	phosphate buffered saline
PFM	porcine fertilization medium
PKA	protein kinase A
PKC	protein kinase C
PKG	cGMP-dependent protein kinase
POE-CM	porcine oocyte, embryo-collection medium
POM	porcine oocyte medium
PVA	polyvinyl alcohol
PZM-5	porcine zygote medium-5

TGF- $\alpha$	transforming growth factor-alpha
TNFAIP6	tumor necrosis factor alpha induced protein 6
TUNEL	terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP–digoxigenin nick end-labelling
UBB	ubiquitin
VCAN	versican

## 第1章 総説

多くの哺乳動物の雌では、胎生期において始原生殖細胞が生殖巣原基に移動して卵原細胞となって増殖し、一部が卵母細胞へと分化する。卵母細胞は出生前後に減数分裂を開始し、第一分裂前期で細胞分裂を停止する。卵母細胞は一層の卵胞上皮細胞により取り囲まれ、原始卵胞(一次卵胞)が作られる。一次卵胞内の卵胞上皮細胞は活発に増殖し、卵母細胞と卵胞上皮細胞の間に透明帯が出現する。このような卵胞を二次卵胞と呼び、重層化した卵胞上皮細胞を顆粒膜細胞という。さらに、顆粒膜細胞間の所々に間隙が出現して卵胞腔が形成され、胞状卵胞(三次卵胞)となる。その後、それぞれの卵胞腔は合併して一つの大きな腔を有するグラーフ卵胞へと発育する。グラーフ卵胞の成熟につれて、卵母細胞は何層もの顆粒膜細胞に囲まれた状態で卵胞の一方に押しやられ、卵胞腔に突出する。この部分を卵丘と称し、その部分の顆粒膜細胞を卵丘細胞という。最初の第一分裂前期で停止した卵母細胞は、密着した卵丘細胞に囲まれてコンパクトな卵丘卵母細胞複合体(cumulus-oocyte complexes: COCs)を形成している。この時期の卵母細胞は卵核胞(germinal vesicle: GV)と呼ばれる大型の核を有している。個体の性成熟後、卵母細胞は生殖腺刺激ホルモンなどの刺激によって卵核胞崩壊(germinal vesicle breakdown: GVBD)といわれる核膜の消失を起こして減数分裂を再開する。その後、第一極体を放出して第二分裂中期(metaphase II: MII 期)に進行し、減数分裂を再び停止する。GVをもつ卵母細胞(GV 卵)が MII 期の卵母細胞(MII 卵)へと移行する過程を卵成熟と呼ぶ。MII 卵は卵巣から排卵されて卵管に輸送され、卵管膨大部で受精する。卵母細胞と精子の細胞膜の融合によって精子核が卵細胞質に入ると、精子頭部の核膜が壊れて膨化精子となり、雄性前核が形成される。これと並行して、第二分裂中期で停止していた卵母細胞は減数分裂を再開し、第二極体を放出して、雌性前核を形成する。両前核は受精卵の中央へ移動し、互いに合一する。受精が完了すると、受精卵は卵管から子宮へ移動しながら卵割を繰り返し、子宮に到達する。受精卵は2細胞、4細胞、8細胞と分割を繰り返し、桑実胚になる。桑実胚期に入ると割球同士が密着し凝集する。そして、割球同士の間には胚盤胞腔を形成し胚盤胞になる。この時期の胚では、将来胎児になる内部細胞塊と、胎盤を形成する栄養膜細胞層が顕在化する。胚盤胞腔は拡張を続け、やがて胚が透明帯を押し広げた状態の拡張胚盤胞となり、透

明帯を破って孵化する。孵化によって胚盤胞は子宮内膜上皮と直接接触することが可能になり、栄養膜細胞と子宮内膜上皮細胞が互いに結合して着床する。

雌の生殖機能は、視床下部、下垂体、および卵巣間でのホルモン伝達によって調節されている。視床下部から分泌される生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (gonadotropin releasing hormone: GnRH) は下垂体前葉に作用し、卵胞刺激ホルモン (follicle-stimulating hormone: FSH) と黄体形成ホルモン (luteinizing hormone: LH) の合成および分泌を促進する。FSH と LH は共同して卵巣での卵胞形成を促進し、LH の一過性の大量放出 (LH サージ) により卵母細胞の減数分裂の再開、卵丘細胞の体積の著しい増加 (卵丘膨化)、および排卵が誘起される。FSH と LH による COCs の卵丘膨化や卵成熟の促進は培養下においても観察することができる (Kobayashi *et al.*, 1994; Mattioli *et al.*, 1991)。FSH レセプターは顆粒膜細胞と卵母細胞に、LH レセプターは莢膜細胞と顆粒膜細胞に発現している (Méduri *et al.*, 2002; Yuan *et al.*, 1996) が、FSH と LH による減数分裂は、卵母細胞を取り囲む体細胞を介して刺激される (Amsterdam *et al.*, 1975; Dekel *et al.*, 1988)。FSH と LH は、卵丘・顆粒膜細胞でのサイクリックアデノシン 3', 5' -一リン酸 (cAMP) 産生量の増加と (Downs *et al.*, 1988)、それに続いて起こる mitogen-activated protein kinase (MAPK) の活性化 (Su *et al.*, 2002; Liang *et al.*, 2005) に関与し、卵母細胞の減数分裂の再開を誘起すると考えられている。cAMP は直接 MAPK を活性化せず (Wu *et al.*, 1993)、近年、生殖腺刺激ホルモンによって発現が誘導される epidermal growth factor (EGF) 様成長因子 (Park *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2008)、meiosis activating sterol (MAS)、および性腺ステロイドホルモン (Byskov *et al.*, 1995; Yamashita *et al.*, 2005) がプロテインキナーゼ A II (PKA II) やプロテインキナーゼ C (PKC) 経路を介して MAPK を活性化している可能性が示唆された。しかし、卵丘細胞での MAPK の活性化後、卵母細胞の減数分裂の再開を誘導するメカニズムは解明されていない (Liang *et al.*, 2007)。

哺乳動物の卵成熟においては、生殖腺刺激ホルモンのほかに、卵巣の体細胞で発現する細胞成長因子もまた重要な役割を果たしている。培養下でのマウスの卵成熟において、EGF ファミリーに属する成長因子は EGF, transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), platelet-derived growth factor, nerve growth factor, insulin-like growth factor-I, -II, および fibroblast growth factor ファミリー等多くの細胞成長因子ファミリーに属する成長因子の中で最も GVBD および卵丘膨化に高い促進効

果を示す(Downs, 1989)。EGF は、EGF レセプターに結合してレセプターのチロシンキナーゼを活性化し、ウシ(Lonergan *et al.*, 1996)やブタ(Singh *et al.*, 1997; Abeydeera *et al.*, 2000; Procházka *et al.*, 2000; Uhm *et al.*, 2010)の卵母細胞の核成熟を促進する。さらに、EGF は、胚発生に必要な各種 mRNA やタンパク質、栄養成分の蓄積を伴う細胞質成熟や胚発生を促進することがマウス(Fuente *et al.*, 1999)、ヒト(Goud *et al.*, 1998)、ウシ(Kobayashi *et al.*, 1994; Lonergan *et al.*, 1996)、ブタ(Singh *et al.*, 1997; Abeydeera *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2002)で明らかになっている。一方、卵胞形成に関しては、近年、顆粒膜細胞や卵丘細胞で発現する amphiregulin、epiregulin、betacellulin を含む EGF ファミリー分子がパラクライン型信号伝達物質として LH の下流で働き、GVBD を誘起する可能性がマウスにおいて示されている(Park *et al.*, 2004; Hsieh *et al.*, 2007)。また、FSH もラットの顆粒膜細胞やマウスの卵丘細胞で epiregulin あるいは amphiregulin の発現を誘導する(Sekiguchi *et al.*, 2002; Shimada *et al.*, 2006)。FSH および LH により引き起こされる GVBD は、EGF レセプターの阻害剤である AG1478 によって阻害されることから(Park *et al.*, 2004; Downs and Chen, 2008)、EGF ファミリー分子による EGF レセプターの活性化が必要であることが示唆されている(Zhang *et al.*, 2009)。一方、FSH と EGF ファミリー分子はどちらも卵丘細胞の MAPK 経路を活性化して減数分裂の再開を誘導するが、これらの 2 つの経路は重複あるいは相互接続していない可能性も示唆されており、FSH と EGF ファミリー分子が GVBD を誘起するシグナル伝達機構の関連性は明らかになっていない(Farin *et al.*, 2007)。

一方、哺乳類の胚発生には糖質やアミノ酸が重要な役割を担う。培養下の卵割初期のブタ胚において、培地中に高濃度のグルコースが存在すると 4 細胞期で発生停止が引き起こされる(Flood and Wiebold, 1988; Ankrah and Appiah-Opong, 1999; Medvedev *et al.*, 2004)。しかし、媒精後 2 日目以降に高濃度のグルコースが存在すると、胚盤胞への発生が促進され、胚の細胞数が増加する(Kikuchi *et al.*, 2002b)。また、培地への各種アミノ酸の添加は、様々な動物種において胚発生を促進する(Gardner and Lane, 1993; Bavister and Arlotto, 1990; Lee *et al.*, 2004; Suzuki and Yoshioka, 2006)。ウシでは、培地へのグリシンの添加が培養下での胚の発生率と胚盤胞の細胞数を増加させる(Lee and Fukui, 1996; Takahashi and Kanagawa, 1998)。ブタでは、グリシンは卵管液と子宮液中で最も豊富に存在するアミノ酸であるが(Iritani *et al.*, 1974; Li *et al.*, 2007)、

グリシンの胚発生への作用は報告されていない。

哺乳類における卵母細胞や胚の培養技術は、生体内で起こる現象を体外で再現できるため、卵成熟、受精、胚発生における生理機構の解明に貢献し、生物学および生化学的な基礎知見を得るのに役立つ。また、卵母細胞や胚の培養技術は、クローン動物あるいはトランスジェニック動物作出などの動物繁殖技術においても重要である (Day, 2000)。近年、ヒトの病態モデルや異種間臓器移植のドナーとして、ヒトとの類似性が高い大型動物であるブタが注目されており、トランスジェニックブタ作出に関する研究が行われている。トランスジェニックブタ作出には核移植やクローン技術が用いられるが、これらの技術では初期胚や成熟卵子を大量に使用する。したがって、正常な卵子や胚を効率的に作出できる培養技術の確立は、生物学のみならず医学にも大きく貢献することが期待される。さらに、畜産分野では自然交配に代わり、胚移植による子豚の生産が注目されている。胚移植は、新たな遺伝形質を持つ個体を導入する際に、生体の移動や生体同士の接触がないため感染症伝播の防除に有効であるほか、品種改良や優良家畜の増産にも貢献すると期待されている。しかし、現行の培養系で培養したブタの卵子や胚の発生能は体内で发育した卵子や胚に比べて劣っており、胚移植後の産子への発生率も低い。

ブタ卵母細胞の成熟培養や胚の発生培養では、一般にブタ卵胞液、血清、ウシ血清アルブミンなどの動物から採取した成分、または部分精製した成分(動物由来成分)が培地に含まれている (Vatzias and Hagen, 1999; Bijttebier *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2006)。卵胞液や血清には各種ホルモンや細胞成長因子に加えて多くの未知成分が含まれている (Edwards, 1974)。また、卵胞液に含まれるホルモンや細胞成長因子の濃度は卵胞の发育段階によって変化し (Ainsworth *et al.*, 1980; Bridges *et al.*, 2002)、血清や血清アルブミンも製造ロット間で純度の差が大きい。さらに、ブタ卵胞の細胞には豚繁殖・呼吸障害症候群 (Porcine reproductive and respiratory syndrome: PRRS) ウイルスが存在しており (Sur *et al.*, 2001)、卵胞液や血清には細菌やウイルスが含まれている可能性がある (Galik *et al.*, 2002; Devaux *et al.*, 2003)。これらの問題により、動物由来成分を含む培地の使用は実験の再現性の低下を招き、卵成熟や胚発生における外的要因すなわちホルモン、細胞成長因子、糖質、アミノ酸、およびビタミン類などの生理作用の解析を困難にする。成分既知培地は、実験の再現性を高め、卵成熟や胚発生における外的要因の生理作用の解析に有

用であり、受精や着床率が高い、いわゆる高品質の成熟卵子や初期胚を安定して作出することが可能になると考えられている。また、ブタでは、2 つ以上の精子が卵細胞質と融合する多精子受精が他の動物種に比べて頻発し、正常な胚発生の妨げとなっている(Nagai and Moor, 1990; Wang *et al.*, 1998)が、成熟培地中の卵胞液をポリビニルアルコール(PVA)に変更した成分既知培地を用いて卵母細胞を培養すると、体外受精後の多精子受精が減少することが示されている(Yoshioka *et al.*, 2008)。近年、ブタ卵管液の無機塩類とエネルギー基質の組成に基づいた成分既知培地で、卵母細胞の成熟基礎培地である porcine oocyte medium(POM)(Yoshioka *et al.*, 2008)、体外受精培地である porcine fertilization medium(PFM)(Yoshioka *et al.*, 2003)、および受精卵の発生培地である porcine zygote medium-5(PZM-5)(Suzuki and Yoshioka, 2006)が開発された。これらの成分既知培地を用いて、卵母細胞を成熟培養し、体外受精することで胚盤胞を作出できる培養システムが構築されたが、培養した胚の生存能力は体内発育胚に比べて依然として低く、胚盤胞の細胞数は少ない(Yoshioka *et al.*, 2002)。また、培養した胚盤胞では透明帯からの孵化が起こることはほとんどない(Robl and Davis, 1981; Magli *et al.*, 1998; Dobrinsky *et al.*, 1996)。これらの原因の一つとして培養条件が不十分であることが考えられる。したがって、卵成熟や胚発生に必要な各種因子の同定やそれらの作用機構の解明、および高品質の成熟卵子や初期胚の作出のためには、成分既知培地を改良し、より再現性の高い安定した培養系の確立が必要である。

ブタ胚の超低温保存技術は、優良な遺伝子資源の長期保存のほか、胚移植における時間的・地理的制約を無くし、低コストで新規血統が導入可能になるなど利便性の向上にも有効である。しかし、ブタ胚は他の哺乳動物の胚に比べて低温感受性が高く(Wilmot, 1974; Polge *et al.*, 1974; Nagashima *et al.*, 1995)、ウシ胚などで従来行われているような緩慢凍結では、ブタの桑実胚や初期胚盤胞の保存は困難である(Dobrinsky, 1997)。また、胚を培養液中で急速に凍結すると、細胞内外の水分が結晶化し、細胞膜や細胞内小器官などの細胞構造が物理的に損傷してしまう。そこで、高濃度の凍結保護物質とともに超急速に冷却することにより、細胞内外に氷晶を形成させることなく超低温保存できるガラス化保存法が開発された(Rall and Fahy, 1985)。ブタ胚においても、ガラス化保存法による超低温保存が可能になり、ガラス化・融解した胚を移植することで産子の作

出にも成功している(Kobayashi *et al.*, 1998; Dobrinsky *et al.*, 2000)。ブタの卵母細胞や胚は、マウス、ウシ、およびヒツジに比べて非常に多くの脂質を含んでいる(McEvoy *et al.*, 2000; Sturmey and Leese, 2003)。ブタの卵母細胞や胚に含まれる多量の脂質は、エネルギー源として卵成熟、受精、および胚発生に重要な役割を果たすと考えられている(Brown, 2001; Kikuchi *et al.*, 2002a)が、胚の高い低温感受性の原因であることも示唆されている(Nagashima *et al.*, 1995)。体外受精後に、遠心と顕微操作により機械的に脂肪顆粒を除去し、その後ガラス化保存した体外生産胚から子豚を作出することに成功したと報告されている(Nagashima *et al.*, 2007)。しかし、脂肪顆粒除去は透明体に傷をつけるため病原体伝播のリスクを増加させるうえ、大きな労力と手間を要する。最近、Maehara *et al.*(2012)は、体外成熟および体外受精により作出した桑実胚を脂肪顆粒除去することなく、中空系法でガラス化保存することに成功したと報告した。体外生産胚の非侵襲的で簡単な凍結保存技術は、研究および産業上、有用である。しかし、体外生産胚の超低温保存は、体内発育胚に比べると難しく(Greve and Callesen, 2004)、超低温保存に耐える品質の胚を作出する培養技術を開発する必要がある。

本研究では、ブタ卵母細胞と胚の発生能および品質向上を図り、成分既知培地を用いた培養技術を確立するため、卵母細胞の成熟培養および胚の発生培養について検討を行った。第 2 章では、TGF- $\alpha$ がブタ卵成熟と胚発生に及ぼす影響について検討した。第 3 章では、TGF- $\alpha$ と FSH のブタ卵成熟および胚発生への作用を明らかにするとともに、それぞれの作用機構の関連性を検討した。第 4 章では、グルコースとグリシンがブタ胚盤胞の生存性および孵化に及ぼす影響を検討した。さらに、第 5 章では、これらの結果を動物繁殖技術へ応用するために、開発した発生培地をガラス化保存液および加温液の基本液として用いるとともに、体外生産胚の耐凍性を向上させる至適培養条件について検討した。

## 第2章 TGF- $\alpha$ がブタ卵成熟と初期胚に及ぼす影響

### 1. 緒言

哺乳動物の卵成熟は生殖腺刺激ホルモンや細胞成長因子の刺激により引き起こされ、卵母細胞では減数分裂を再開し第一極体を放出して MII 期に達する核成熟と、受精や初期胚発生に関与する細胞質成熟が起こる。培養系において、FSH 様の作用を示すウマ血清性生殖腺刺激ホルモン (eCG) と LH 様の作用を示すヒト絨毛性生殖腺刺激ホルモン (hCG) を成熟培地に添加してブタの COCs を培養すると、核成熟を促進する (Minato and Toyoda, 1982)。また、FSH 様の作用を示す妊馬血清性生殖腺刺激ホルモン (PMSG)、hCG、およびエストラジオールを成熟培養 20 時間まで成熟培地に添加し、その後これらのホルモンとステロイドを除去してブタの COCs を培養すると、核成熟および細胞質成熟を促進する (Funahashi and Day, 1993)。しかし、ブタでは、体外成熟した卵母細胞を体外受精すると、雄性前核形成不全や多精子受精 (Funahashi and Day, 1997; Niwa, 1993) といった異常受精が高率に起こることから、依然として細胞質成熟が不十分であると考えられる。

哺乳動物の卵母細胞においては、EGF、TGF- $\alpha$ 、amphiregulin、epiregulin、betacellulin 等を含む EGF ファミリー分子も核成熟および細胞質成熟を誘起する (Coskun and Lin, 1994; Singh *et al.*, 1997; Procházka *et al.*, 2000; Akaki *et al.*, 2009)。Amphiregulin、epiregulin、および betacellulin は LH の刺激により顆粒膜細胞で発現し、オートクラインあるいはパラクライン的に作用して、卵丘膨化や GVBD を誘起する (Park *et al.*, 2004)。EGF および TGF- $\alpha$  もブタ (Gruppen *et al.*, 1997b; Coskun and Lin, 1994) を始め、マウス (Downs *et al.*, 1988; Brucker *et al.*, 1991)、ラット (Dekel and Sherizly, 1985; Tsafiriri *et al.*, 1989)、ウシ (Lonergan *et al.*, 1996; Kobayashi *et al.*, 1994) の卵母細胞の核成熟を促進するが、LH (hCG) の刺激は EGF と TGF- $\alpha$  の発現を誘起しない (Sekiguchi *et al.*, 2004; Hsieh *et al.*, 2009)。ブタにおいて、EGF は卵母細胞で強く発現している (Singh *et al.*, 1995b) が、TGF- $\alpha$  は GV 卵から MII 卵までの全ての成熟段階において卵母細胞では検出されない (Singh and Armstrong, 1995a; Yoshida *et al.*, 1998)。TGF- $\alpha$  は顆粒膜細胞と卵

丘細胞で発現しており、卵胞発達に際して起こる顆粒膜細胞の増殖にオートクライン様の作用機序で働き、卵成熟を促進する可能性がある(Singh and Armstrong, 1995a)。TGF- $\alpha$ は50個のアミノ酸からなるポリペプチドで、EGFと30~40%の相同性を有する(Marquardt *et al.*, 1983)。TGF- $\alpha$ はEGFレセプターに結合してレセプターのチロシンキナーゼを活性化し、EGFと同様の生理作用を示す(Massague, 1983; Pike *et al.*, 1982)が、角化細胞のコロニー様増殖や血管新生において、TGF- $\alpha$ はEGFよりも効果が高いことが報告されている(Barrandon and Green, 1987; Schreiber *et al.*, 1986)。ウシでは、成熟培地にTGF- $\alpha$ を添加すると卵丘膨化を促進し、受精率と体外受精後の胚盤胞への発生を高める(Kobayashi *et al.*, 1994)。ブタでは、成熟培地にTGF- $\alpha$ を添加すると卵母細胞の核成熟を促進すると報告されている(Coskun and Lin, 1994)が、卵成熟におけるTGF- $\alpha$ が、受精および胚発生に及ぼす作用については報告されていない。

卵母細胞の細胞質成熟には、胚発生に必要な各種 mRNA やタンパク質、栄養成分の蓄積(Watson, 2007)のほか、細胞内小器官の局在や構造の変化が関係する(Ferreira *et al.*, 2009; Cran, 1985)。ブタ卵母細胞では、体内成熟の間、ミトコンドリアの数が減少する(Cran, 1985)。また、小グループのミトコンドリアはGVBD後に小胞体で包まれ、発達して伸長する(Cran, 1985)。さらに、電子顕微鏡により観察される脂肪滴の電子密度は、体内発育胚と体外生産胚では異なっている(Kikuchi *et al.*, 2002a)。したがって、成熟培地へのTGF- $\alpha$ 添加による卵母細胞や胚の微細構造の変化を明らかにすることは興味深い。

本章では、卵成熟におけるTGF- $\alpha$ が核成熟、細胞内微細構造、受精、および胚発生に及ぼす影響について検討した。またTGF- $\alpha$ 添加培地で成熟培養後に発生した胚盤胞を移植し、産子への発育能を検討した。

## 2. 材料および方法

### 1) 成熟培養

食肉処理場で得られた春機発動前のブタの卵巣を、約 25°C のリン酸緩衝液 (PBS) または生理食塩水 (0.9% (w/v) NaCl) に入れて研究室に輸送した後、PBS または生理食塩水で 3 回洗浄した。COCs を、18 ゲージの注射針を取り付けた 10 ml シリンジを用いて胞状卵胞 (直径 3~6 mm) から吸引採取し、porcine oocyte, embryo-collection medium (POE-CM; Research Institute for the Functional Peptides, Higashine, Japan, 表 2-1) で 2 回洗浄した。成熟培養には、卵丘細胞が密に付着した COCs を選択し、基礎培地として porcine oocyte medium (POM; Research Institute for the Functional Peptides, 表 2-1) を用いた。選別した COCs を、10 IU/ml eCG (セトロロピン; Aska Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan) および 10 IU/ml hCG (ゴナトロピン; Aska Pharmaceutical Co.) を添加した POM、あるいは無添加の POM に、TGF- $\alpha$  (PeproTech, London, UK) を 0, 1, 10, または 100 ng/ml 添加した成熟培地で 2~3 回洗浄後、成熟培地 150  $\mu$ l のドロップ中に 15~20 個ずつ移し、38.5~39°C、5% CO<sub>2</sub>、5% O<sub>2</sub>、90% N<sub>2</sub> 気相下で 44 時間培養した。生殖腺刺激ホルモンは成熟培養開始後 20 時間まで、TGF- $\alpha$  は 44 時間目まで POM に添加して COCs を培養した。

### 2) 核成熟の評価

卵母細胞の核成熟の観察法は、Yoshioka *et al.* (2008) に従った。成熟培養後の COCs を、38°C に保温した 1 mg/ml ヒアルロニダーゼ (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, USA) を含む POE-CM 中で処理し、ガラスキャピラリーピペットで卵丘細胞を除去した。得られた裸化卵母細胞 (DOs) を、パラフィンとワセリンを 1:12 で混合して溶解した小滴をカバーガラスの四隅に対応する位置に添付したスライドガラス上へのせ、カバーガラスで DOs を押さえて、アセトアルコール (エタノール: 酢酸 = 3:1) で 24~48 時間固定した。固定後、1% (w/v) アセトオルセインで染色し、アセトグリセロール (酢酸: グリセロール: 蒸留水 = 1:1:3) で脱色した。作製した標本を位相差顕微鏡 (DMRE; Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Germany, または BX50; OLYMPUS, Tokyo, Japan) を

用いて観察し、卵母細胞の核相を調べて、減数分裂を再開した GVBD 卵、または、第一極体を放出した MII 卵に分類した。

### 3) 媒精

体外受精には同一ロットの凍結精液(動物衛生研究所 吉岡耕治博士、鈴木千恵博士より供与)と porcine fertilization medium (PFM; Research Institute for the Functional Peptides, 表 2-1)を用いた。凍結融解精液は、40% および 80% パーコール溶液 (GE Healthcare UK, Buckinghamshire, UK) に重層し、700 × g で 20 分間遠心した。最下層の精子に PFM を加えて懸濁し、500 × g、5 分間遠心して上清を除き、この操作を繰り返して精子を 2 回洗浄した。成熟培養後の COCs は、精子を  $1 \times 10^6$  個/ml に調整した 100  $\mu$ l のドロップ中で、10 時間媒精した。媒精後の卵子は前項と同様の方法で標本を作製し、1 つ以上の膨化した頭部を有する精子あるいは雄性前核が卵子細胞質中に存在する場合を卵子が受精しているものとした。供試卵子数に対する、受精卵の割合を精子侵入率、受精卵の総数に対する、第二極体と 2 つの前核を有する卵子の割合および雄性前核を有する卵子の割合を、正常受精率および雄性前核形成率として算出した。

### 4) 発生培養

媒精後の胚を POE-CM 中で 4 分間攪拌混合して卵丘細胞を除去し、POE-CM と porcine zygote medium-5 (PZM-5; Research Institute for the Functional Peptides, 表 2-1) でそれぞれ 2 回ずつ洗浄後、50  $\mu$ l の PZM-5 ドロップ中に約 25 個ずつ移し、5 日間、38.5~39°C、5% CO<sub>2</sub>、5% O<sub>2</sub>、90% N<sub>2</sub> 気相下で培養した。媒精後 2 日目および 5 日目に実体顕微鏡を用いて胚を観察し、2 細胞期以降の胚および胚盤胞の割合を、卵割率および胚盤胞への発生率とした。

### 5) 胚盤胞の細胞数計測

媒精後 5 日目に胚盤胞へ発生した胚については、Yoshioka *et al.* (2008) の方法により乾燥標本を作製して細胞数を計測した。胚盤胞を低張液 (0.9% (w/v) クエン酸ナトリウム、1% (v/v) ウシ胎児血清 (HyClone, South Logan, UT, USA)) で 10~15 分間処理後、固定液 I (メタノール: 酢酸: 蒸留

水=10:3:7)に移し、スライドガラスに少量の固定液Iとともに1つずつ乗せ、ガラスキャピラリーピペットを用いて割球を分散させた。風乾後、カルノア液(メタノール:酢酸=3:1)の滴下と乾燥を3回繰り返し、2% (v/v)ギムザ染色液で30分間染色し、顕微鏡下で細胞数を計測した。

#### 6) 透過型電子顕微鏡観察

卵母細胞および胚盤胞の透過型電子顕微鏡観察法は、Nagano *et al.* (1999)に従った。生殖腺刺激ホルモンを培養開始後20時間含み、10 ng/ml TGF- $\alpha$ を添加あるいは添加しないPOMで44時間成熟培養をしたCOCsの卵丘細胞を除去して第1極体の放出を確認したDOs、および媒精後5日目の胚盤胞を、2.5% (v/v)リン酸緩衝グルタルアルデヒド液(pH 7.3)で1時間前固定した後、0.1 Mリン酸緩衝液で3回洗浄し、1% (w/v)オスミウム酸-リン酸緩衝液で1時間後固定した。これらのDOsおよび胚盤胞をエタノールで段階的に脱水してエポキシ樹脂に包埋し、マイクローム(REICHERT-NISSEI ULTRACUT S, Leica, Wetzlar, Germany)を用いて準超薄切片を作製して、0.5% (w/v)トリイジンブルー(pH 7.5)で染色した。その後、準超薄切片を用いてウルトラマイクロームで超薄切片を作製して、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で電子染色し、透過型電子顕微鏡(JEM-1210; JEOL, Tokyo, Japan)を用いて観察した。微細構造の観察には、卵母細胞の赤道面および胚盤胞の内部細胞塊と栄養膜細胞を含む面の切片を用いた。

#### 7) 胚盤胞の外科的移植

受胚豚として、ランドレース×大ヨークシャー交雑種4頭(6~7ヶ月齢、体重84~101 kg)を使用した。受胚豚の発情同期化法は、Yoshioka *et al.* (2003)に従った。黄体期のブタにジノプロストとして15 mgのプロスタグランジン F<sub>2 $\alpha$</sub>  (PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ) (パナセラン Hi; Meiji Seika Co. Ltd., Tokyo, Japan)を1日2回、合計5回筋肉内注射して黄体退行を誘起した。5回目のPGF<sub>2 $\alpha$</sub> 投与の72時間後、hCG 1500 IUを筋肉内注射して排卵を誘起した。生殖腺刺激ホルモンと10 ng/ml TGF- $\alpha$ を添加して成熟培養したCOCsを媒精し、5日間の発生培養によって得られた胚盤胞を、1頭あたり20~22個ずつ、受胚豚の子宮へ外科的に移植した。移植後20日目に超音波診断装置(SSD-900; Aloka Co. Ltd., Tokyo, Japan)により妊娠を確認した。妊娠したブタについて、妊娠期間、分娩率

および一腹あたりの産子数を記録した。

#### 8) 統計処理

統計処理には、Statistical Analysis System (SAS Institute, Cary NC, USA)を使用した。多重比較検定としてTukey-KramerのHSD検定を行った。パーセント値および胚盤胞の総細胞数については、アークサイン変換および対数変換後、検定を行った。危険率5%未満の場合に、統計学的に有意な差があると判定した。

### 3. 結果

#### 1) 卵成熟における生殖腺刺激ホルモンと TGF- $\alpha$ の作用

生殖腺刺激ホルモンおよび TGF- $\alpha$ が卵成熟に及ぼす作用を明らかにするため、eCG、hCG、および種々の濃度の TGF- $\alpha$ を添加して COCs を成熟培養後、卵母細胞の核相を調べた。eCG と hCG 無添加の場合、GVBD 卵および MII 卵の割合は、TGF- $\alpha$ を 10 ng/ml 添加すると有意に増加した( $P < 0.05$ )が、eCG と hCG を添加した場合には、GVBD 卵および MII 卵の割合に、TGF- $\alpha$ 添加による有意な変化は認められなかった(表 2-2)。また、eCG と hCG を添加した場合、eCG と hCG 無添加の場合と比較して GVBD 卵および MII 卵の割合は有意に高かった( $P < 0.05$ )。生殖腺刺激ホルモンが存在する場合、TGF- $\alpha$ による卵母細胞の核成熟促進作用は見られなかったが、TGF- $\alpha$ を 10 ng/ml の濃度で添加すると他の濃度に比べて MII 卵の割合が最も高かった。したがって、以降の試験では TGF- $\alpha$ を 10 ng/ml の濃度で使用した。

#### 2) 成熟培養時の TGF- $\alpha$ が受精および胚発生に及ぼす作用

eCG と hCG 存在下では、TGF- $\alpha$ による卵母細胞の核成熟促進作用は見られなかったが、受精および胚発生に対する作用を調べるため、eCG と hCG、および 10 ng/ml TGF- $\alpha$ を添加して成熟培養した COCs を媒精して発生培養した。その結果、精子侵入率、正常受精率および雄性前核形成率、および卵割率に TGF- $\alpha$ による影響は見られなかった(表 2-3、2-4)。しかし、胚盤胞の発生率は、TGF- $\alpha$ を添加すると無添加に比べて有意に高かった( $P < 0.05$ )。胚盤胞の総細胞数は、TGF- $\alpha$ 添加による差が見られなかった。

#### 3) 成熟卵母細胞および胚盤胞の微細構造における TGF- $\alpha$ の作用

eCG と hCG が存在する場合、TGF- $\alpha$ を添加して成熟培養すると、卵母細胞の核成熟には影響しないが、受精後の胚盤胞への発生を促進した。TGF- $\alpha$ が卵母細胞の細胞質成熟に関与し、微細構造にも影響している可能性が考えられることから、eCG と hCG を含む POM に 10 ng/ml TGF- $\alpha$ を添加あるいは無添加で成熟培養した成熟卵母細胞、および発生培養後の胚盤胞の電子顕微鏡観

察を行った。その結果、TGF- $\alpha$ 無添加で成熟培養した卵母細胞では、不均質で電子密度の低い筋状の模様をもつ脂肪滴が見られた(図 2-1a)。これに対して、TGF- $\alpha$ を添加して培養した卵母細胞では、無添加に比べて均一な電子密度を有する脂肪滴が比較的多く存在していた(図 2-1b)。また、TGF- $\alpha$ を添加した場合、よく発達した小胞体に取り囲まれたミトコンドリアが、観察した9個中3個の卵母細胞で見られた(図 2-2b)。TGF- $\alpha$ 無添加の卵母細胞ではこのような像は観察されなかった(図 2-2a)。

TGF- $\alpha$ 無添加、または添加して成熟培養したCOCs由来の胚盤胞では、内細胞塊と栄養膜細胞に、円形、または楕円形のミトコンドリアが主に見られた。TGF- $\alpha$ を添加して成熟培養したCOCs由来の胚盤胞の内細胞塊では、多数のクリステを有する伸長したミトコンドリアが観察した10個中5個で見られた(図 2-3b)。これに対して、TGF- $\alpha$ 無添加で成熟培養したCOCs由来の胚盤胞の内細胞塊では、伸長したミトコンドリアは観察した10個中2個に見られたが、クリステは少数しか見られなかった(図 2-3a)。ミトコンドリアのヌアージュ(図 2-4)は、TGF- $\alpha$ 添加、または無添加で成熟培養したCOCs由来の胚盤胞の内細胞塊と栄養膜細胞で10個中5個、または3個に観察された。

#### 4) 胚盤胞の産子への発生能

卵成熟時のTGF- $\alpha$ は受精後の胚盤胞への発生を促進したが、この胚盤胞の正常性を確認する必要がある。そこで、eCG、hCG、およびTGF- $\alpha$ を添加して成熟培養後、発生培養して作出した胚盤胞を、4頭の受胎豚の子宮へ外科的に移植した。その結果、全頭が妊娠・分娩し、合計29頭の産子を得た(表 2-5)。一腹産子数の平均は $7.3 \pm 1.5$ 頭であった。妊娠期間および産子の平均生時体重はいずれも正常範囲であり、全ての子豚は正常に成長した。

#### 4. 考察

本章において、成熟培地に生殖腺刺激ホルモンが存在しない場合、TGF- $\alpha$ を添加すると卵母細胞の核成熟が促進されることを明らかにした。また、生殖腺刺激ホルモンを含む成熟培地に、TGF- $\alpha$ を添加すると、卵母細胞の核成熟率、媒精後の受精率および卵割率に差は認められなかったが、胚盤胞への発生能が促進されることを明らかにした。

成熟培地に生殖腺刺激ホルモンが存在しない場合、10 ng/ml TGF- $\alpha$ を添加すると卵母細胞の核成熟を促進した(表 2-2)。この結果は、TGF- $\alpha$ がラット(Tsafiriri *et al.*, 1989)、マウス(Brucker *et al.*, 1991)、ウシ(Kobayashi *et al.*, 1994)、およびブタ(Coskun and Lin, 1994)の卵成熟を促進したという報告と一致していた。また、生殖腺刺激ホルモンも卵成熟を強力に促進したが、生殖腺刺激ホルモンが存在する場合、TGF- $\alpha$ 添加による更なる促進効果は認められなかった(表 2-2)。生体内において、卵成熟は生殖腺刺激ホルモンの刺激によって開始する。FSH 様の作用と LH 様の作用を併有する eCG と hCG は、培養下のブタの COCs において、卵母細胞の核成熟および卵丘膨化を促進する(Funahashi and Day, 1993)ことが示されており、本研究においても同様の結果が得られた。ブタ卵母細胞の体外成熟における生殖腺刺激ホルモン(LH および FSH)は、卵成熟、雄性前核形成、および発生能の改良を指標として示される卵母細胞の品質を高める(Mattioli *et al.*, 1991; Sun *et al.*, 2001)。LH は卵丘細胞と卵母細胞において顕著な応答を引き起こすが、これらの細胞にはほとんどあるいは全く LH レセプターが発現しておらず、直接は作用できない(Peng *et al.*, 1991)。近年、EGF ファミリー分子が卵胞における LH 作用の潜在的なシグナル伝達物質であることが示された(Park *et al.*, 2004; Conti *et al.*, 2006)。特に、amphiregulin および epiregulin は、LH あるいはその類似体である hCG によって急速に誘導され、排卵前の卵胞でオートクライン様およびパラクライン様に LH シグナルを伝達する作用をされると考えられている(Park *et al.*, 2004; Ashkenazi *et al.*, 2005; Sekiguchi *et al.*, 2004)。しかし、マウスやラットの卵巣において、LH の刺激は EGF と TGF- $\alpha$ の発現を誘起しない(Sekiguchi *et al.*, 2004; Hsieh *et al.*, 2009)。このことは、マウスやラットにおいて EGF と TGF- $\alpha$ は排卵時の卵胞における EGF レセプターの生理的な活性化因子ではないことを示唆している(Hsieh *et al.*, 2009)。ブタの卵巣では LH の刺激が EGF や

TGF- $\alpha$ の発現を誘起するのかは明らかにされていない。一方、TGF- $\alpha$ は卵成熟を誘起し、卵胞でのプロゲステロン産生を促進することから、LHの作用に類似しているという報告もある(Tsafiriri *et al.*, 1989)。したがって、本研究で成熟培地に添加した外因性の TGF- $\alpha$ は、amphiregulin や epiregulin のような EGF ファミリー分子の代わりに、LH のシグナル伝達物質として卵成熟を誘起する可能性も考えられた。また、eCG と hCG が存在する場合、卵成熟において TGF- $\alpha$ 添加による相加的あるいは相乗的な促進作用は認められなかったことから、TGF- $\alpha$ は eCG と hCG と共通した機構で卵母細胞の核成熟を促進する可能性が示唆された。

一方、生殖腺刺激ホルモンの存在下で成熟培地に TGF- $\alpha$ を添加すると、媒精後の胚盤胞への発生を促進した(表 2-4)。受精後の正常な胚発生には卵母細胞の核成熟だけでなく細胞質成熟が重要である(Eppig *et al.*, 1994; Hyttel *et al.*, 1997)。成熟培地への細胞成長因子の添加は、卵母細胞の細胞質成熟やその後の胚盤胞形成を促進することが、マウス(Fuente *et al.*, 1999)、ネコ(Merlo *et al.*, 2005)、ヒツジ(Guler *et al.*, 2000)、ウシ(Kobayashi *et al.*, 1994)、およびブタ(Abeydeera *et al.*, 1998)で明らかになっている。ブタにおいて、EGF は卵母細胞や卵丘細胞におけるタンパク質合成のパターンを変え(Singh *et al.*, 1997; Uhm *et al.*, 2010)、卵母細胞の核成熟のみならず、雄性前核形成や胚盤胞への発生促進を指標とした細胞質成熟の両方を促進する(Ding and Foxcroft, 1994; Grupen *et al.*, 1997b)ことから、TGF- $\alpha$ もタンパク質合成に影響している可能性がある。また、EGF レセプターを介した経路により誘導されるステロイドホルモン(プロゲステロン、テストステロン、およびエストラジオール)は、卵母細胞の成熟に重要な役割を果たす(Jamnongjit *et al.*, 2005)。FSH の存在下で TGF- $\alpha$ を添加して顆粒膜細胞を培養すると、プロゲステロン産生が促進されると報告されている(Yeh *et al.*, 1993)。プロゲステロンはブタ卵母細胞の細胞質成熟にも影響する(Yuan *et al.*, 2016)ため、TGF- $\alpha$ の添加によるステロイドホルモンの産生が卵母細胞の細胞質成熟の促進に関与し、胚発生を促進した可能性も考えられた。

細胞質成熟には、胚発生に必要な各種 mRNA やタンパク質、栄養成分の蓄積(Watson, 2007)のほか、ミトコンドリア、脂肪滴、リボソーム、小胞体、表層顆粒、ゴルジ体などの細胞内小器官の局在や構造の変化も関与する(Ferreira *et al.*, 2009; Cran, 1985)。本研究において、TGF- $\alpha$ を添加して成熟培養した卵母細胞は、無添加で培養した卵母細胞に比べてより均一な電子密度の脂肪

滴を含んでいた(図 2-1)。脂肪滴はトリグリセリドやステロールエステルのような中性脂肪を蓄積しており(Brown, 2001)、エネルギー源として卵成熟、受精、および胚発生に重要な役割を果たすと考えられている(Brown, 2001; Kikuchi *et al.*, 2002a)。電顕で観察される脂肪滴の電子密度は、トリグリセリドの不飽和度に応じて変化する(Abe *et al.*, 1999)ため、脂肪滴の形態的な変化は、卵母細胞や胚のエネルギー状態に依存する可能性がある(Kikuchi *et al.*, 2002a)。Cran(1985)は、hCG 処理 0~20 時間後のブタ卵母細胞の脂肪滴は均一な電子密度であったが、50 時間後にはほとんどの脂肪滴が電子密度の低い筋状の模様を含む形態を呈したと報告している。一方、Kikuchi *et al.*(2002a)は、体内あるいは培養下で成熟した卵母細胞では、均質な電子密度の脂肪滴とマーブル状の電子密度の脂肪滴が結合していたと報告している。卵母細胞の脂肪滴の高電子密度性は精子侵入直後に失われるが、前核形成後に回復する(Kikuchi *et al.*, 2002a)。しかし、脂肪滴の電子密度は、体内で発生した前核形成卵子では完全に回復して均一であるのに対し、体外で発生した前核形成卵子では部分的にしか回復せず不均一であった(Kikuchi *et al.*, 2002a)。このことから、ブタ胚における不飽和脂肪酸の再蓄積は、その後の胚発生にとって重要なエネルギーとなることが推察される。本研究においては、TGF- $\alpha$ を添加して体外成熟培養した卵母細胞は、TGF- $\alpha$ 無添加で成熟培養した卵母細胞と比べてより均一な脂肪滴を含んでいた(図 2-1)。したがって、TGF- $\alpha$ を添加して成熟培養した卵母細胞における脂肪酸の蓄積が、媒精後の胚発生能に関与する可能性が考えられた。

また、TGF- $\alpha$ を添加して成熟培養した卵母細胞において、一部のミトコンドリアは小胞体に囲まれていたが、この典型的な特徴は TGF- $\alpha$ 無添加で成熟培養した卵母細胞では観察されなかった(図 2-2)。Cran(1985)は、体内で成熟したブタの卵母細胞では GVBD 後にミトコンドリアが小胞体に囲まれると報告しており、TGF- $\alpha$ を添加して成熟培養した卵母細胞のミトコンドリア周囲の小胞体は、体内で成熟した卵母細胞の特徴に類似していた。このことから、TGF- $\alpha$ が小胞体や脂肪滴といった細胞内小器官の構造を変化させ、卵母細胞の細胞質成熟を促進する可能性が推察された。

さらに、TGF- $\alpha$ を添加して成熟培養した卵母細胞由来の胚盤胞では、TGF- $\alpha$ 無添加で培養した卵母細胞由来の胚盤胞に比べて、多数のクリステを含むミトコンドリア(図 2-3)とミトコンドリアのヌアージュ(図 2-4)が多く観察された。クリステの発達はミトコンドリアの活性を示す。Hyttel and

Niemann(1990)は、体内で発生したブタの桑実胚と胚盤胞のミトコンドリアは糸状で、多くは管状のクリステを多数有すると報告している。TGF- $\alpha$ を添加して成熟培養した卵母細胞由来の胚盤胞のミトコンドリアのクリステは平板状であったが、クリステが発達しているという点では、体内で発生した胚盤胞と類似していた。ミトコンドリアのヌアージュはリボ核タンパク質から成り、ミトコンドリアの複製に関与していると考えられている(Motta *et al.*, 2000; Weakley, 1976)。このことから、TGF- $\alpha$ を添加して成熟培養した卵母細胞由来の胚では、ミトコンドリアの複製がより促進され、活性化していると推察された。これらの結果から、TGF- $\alpha$ は卵母細胞の細胞内小器官の微細構造に影響し、細胞質成熟を促進することで、胚発生能を向上させる可能性が考えられた。

本研究では、受胚豚1頭あたり20~22個の胚を移植したところ、高い妊娠・分娩率(100%)が得られ、平均7.3頭の子豚を作出することに成功した。体外生産した胚の産子への発生能は、いくつかの研究グループによって報告されているが(Suzuki *et al.*, 2006; Yoshioka *et al.*, 2003; Abeydeera *et al.*, 2000; Marchal *et al.*, 2001; Kikuchi *et al.*, 2002b)、これらの既往研究では体外培養培地にブタ卵胞液、血清あるいは血清アルブミンのような未定義の動物由来成分が添加されている。本研究では、成分既知培地を用いた体外生産システムにより作出したブタ胚盤胞が、胚移植後に正常な産子への発生能を有することを明らかにした。

本章の結果から、TGF- $\alpha$ は卵母細胞の核成熟およびその後の胚発生を促進することを明らかにした。また、TGF- $\alpha$ は卵母細胞や胚の細胞内微細構造を変化させ、正常な胚発生に必要な卵母細胞の細胞質成熟を促進する可能性が推察された。

## 5. 小括

本章では、成分既知の成熟培地を用いて、TGF- $\alpha$ がブタの卵成熟と胚発生に及ぼす影響について検討した。

成熟培地中に生殖腺刺激ホルモン(eCG, hCG)が存在しない場合、10 ng/ml TGF- $\alpha$ を添加すると、無添加に比べて卵母細胞の核成熟率が増加した。成熟培地に生殖腺刺激ホルモンが存在する場合、TGF- $\alpha$ を添加すると、卵母細胞の核成熟率、媒精後の受精率および卵割率に差は認められなかったが、胚盤胞への発生率は無添加に比べて増加した。電顕観察の結果、TGF- $\alpha$ を添加して成熟培養した卵母細胞および媒精後の胚盤胞の細胞内小器官には形態的な変化が認められ、胚発生能に影響する可能性が示唆された。

以上の結果から、TGF- $\alpha$ は卵母細胞の核成熟およびその後の胚発生を促進することを明らかにした。また、TGF- $\alpha$ は卵母細胞や胚の細胞内微細構造を変化させ、卵母細胞の細胞質成熟を促進する可能性が推察された。

表 2-1 培地組成

組成	POM	PFM	PZM-5	POE-CM
NaCl	108.00 mM	108.00 mM	108.00 mM	108.00 mM
KCl	10.00 mM	10.00 mM	10.00 mM	10.00 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.35 mM	0.35 mM	0.35 mM	0.35 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.40 mM	0.40 mM	0.40 mM	0.40 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25.00 mM	25.00 mM	25.00 mM	5.00 mM
Hepes	-	-	-	25.00 mM
Glucose	4.00 mM	1.00 mM	-	-
Na-pyruvate	0.20 mM	0.20 mM	0.20 mM	0.20 mM
Ca-(lactate) <sub>2</sub> ·5H <sub>2</sub> O	2.00 mM	4.00 mM	2.00 mM	2.00 mM
L-glutamine	2.00 mM	-	2.00 mM	-
Hypotaurine	5.00 mM	-	5.00 mM	-
L-Arginine·HCl	0.10 mM	-	0.10 mM	-
L-Cystine	0.05 mM	-	0.05 mM	-
L-Histidine	0.05 mM	-	0.05 mM	-
L-Isoleucine	0.20 mM	-	0.20 mM	-
L-Leucine	0.20 mM	-	0.20 mM	-
L-Lysine·HCl	0.20 mM	-	0.20 mM	-
L-Methionine	0.05 mM	-	0.05 mM	-
L-Phenylalanine	0.10 mM	-	0.10 mM	-
L-Threonine	0.20 mM	-	0.20 mM	-
L-Tryptophan	0.02 mM	-	0.02 mM	-
L-Tyrosine	0.10 mM	-	0.10 mM	-
L-Valine	0.20 mM	-	0.20 mM	-
L-Alanine	0.10 mM	-	0.10 mM	-
L-Asparagine·H <sub>2</sub> O	0.10 mM	-	0.10 mM	-
L-Aspartic Acid	0.10 mM	-	0.10 mM	-
L-Glutamic Acid	0.10 mM	-	0.10 mM	-
Glycine	0.10 mM	-	0.10 mM	-
L-Proline	0.10 mM	-	0.10 mM	-
L-Serine	0.10 mM	-	0.10 mM	-
Theophylline	-	2.50 mM	-	-
Adenosine	-	1.00 μM	-	-
L-cysteine	0.60 mM	0.25 μM	-	-
Gentamicin	0.01 mg/ml	0.01 mg/ml	0.01 mg/ml	0.01 mg/ml
Polyvinyl alcohol	3.00 mg/ml	3.00 mg/ml	3.00 mg/ml	3.00 mg/ml
Phenol red	-	-	-	2.00 μg/ml
浸透圧(mOsm)*	289 ± 1	279 ± 1	283 ± 1	268 ± 1

\*平均値±標準誤差を示す.

すべての培地は pH 7.3 に調整.

表 2-2 成熟培地への TGF- $\alpha$ 添加が卵母細胞の核成熟に及ぼす影響

生殖腺刺激ホルモン (eCG, hCG)	TGF- $\alpha$ (ng/ml)	卵母細胞数	GVBD (%)	MII (%)
-	0	84	15 (18.0 $\pm$ 2.5) <sup>a, A</sup>	5 (5.6 $\pm$ 3.0) <sup>a, A</sup>
	1	101	28 (27.6 $\pm$ 4.5) <sup>ab, A</sup>	12 (12.0 $\pm$ 4.6) <sup>ab, A</sup>
	10	96	39 (40.2 $\pm$ 6.6) <sup>b, A</sup>	24 (24.2 $\pm$ 5.5) <sup>b, A</sup>
	100	89	31 (33.9 $\pm$ 7.2) <sup>ab, A</sup>	9 (9.8 $\pm$ 3.1) <sup>ab, A</sup>
+	0	106	89 (83.8 $\pm$ 4.3) <sup>B</sup>	80 (75.4 $\pm$ 3.9) <sup>B</sup>
	1	106	96 (90.6 $\pm$ 3.0) <sup>B</sup>	89 (84.0 $\pm$ 3.6) <sup>B</sup>
	10	106	94 (88.6 $\pm$ 3.7) <sup>B</sup>	90 (84.8 $\pm$ 4.0) <sup>B</sup>
	100	106	93 (87.7 $\pm$ 2.9) <sup>B</sup>	85 (80.3 $\pm$ 6.0) <sup>B</sup>

6回の繰り返し実験による平均値 $\pm$ 標準誤差を示す.

<sup>a,b,A,B</sup>同一列間の異なる文字間に有意差あり(P < 0.05).

表 2-3 成熟培地への TGF- $\alpha$  添加が<sup>\*</sup>受精率に及ぼす影響

	卵子数	精子侵入 (%)	正常受精 (%)	多精子受精 (%)	雄性前核形成 (%)
無添加	170	52 (30.4 $\pm$ 5.8)	46 (90.0 $\pm$ 4.8)	2 (4.1 $\pm$ 2.9)	47 (92.2 $\pm$ 4.8)
TGF- $\alpha$	172	81 (46.6 $\pm$ 6.2)	69 (86.8 $\pm$ 3.7)	4 (4.6 $\pm$ 2.8)	71 (89.2 $\pm$ 2.7)

9回の繰り返し実験による平均値 $\pm$ 標準誤差を示す。

<sup>\*</sup>精子侵入卵子数あたりの割合。

表 2-4 成熟培地への TGF- $\alpha$ 添加が胚発生率に及ぼす影響

	培養胚数	卵割胚数(%)	胚盤胞数(%)	胚盤胞の細胞数
無添加	299	148 (49.0 $\pm$ 4.8)	48 (15.9 $\pm$ 3.3) <sup>a</sup>	54.8 $\pm$ 3.5
TGF- $\alpha$	293	162 (55.5 $\pm$ 3.5)	82 (28.1 $\pm$ 3.9) <sup>b</sup>	58.4 $\pm$ 2.1

11回の繰り返し実験による平均値 $\pm$ 標準誤差を示す.

<sup>a,b</sup>同一列間の異なる文字間に有意差あり(P < 0.05).

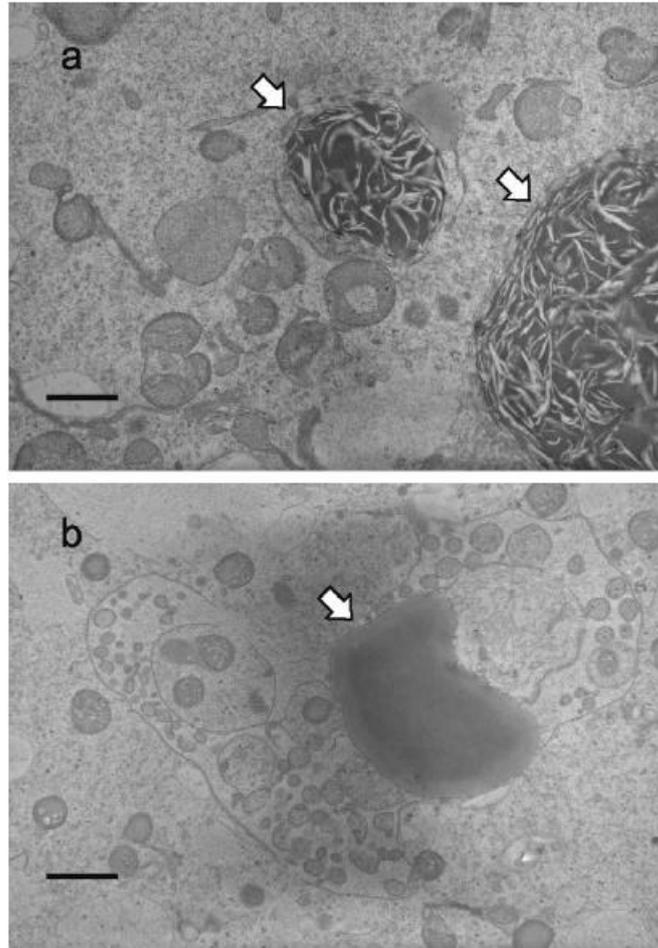


図 2-1 成熟培養後の卵母細胞における脂肪滴の電子顕微鏡写真  
TGF- $\alpha$ 無添加(a)および添加(b)して成熟培養した卵母細胞.  
矢印は脂肪滴を示す. スケールバー= 1  $\mu$ m.

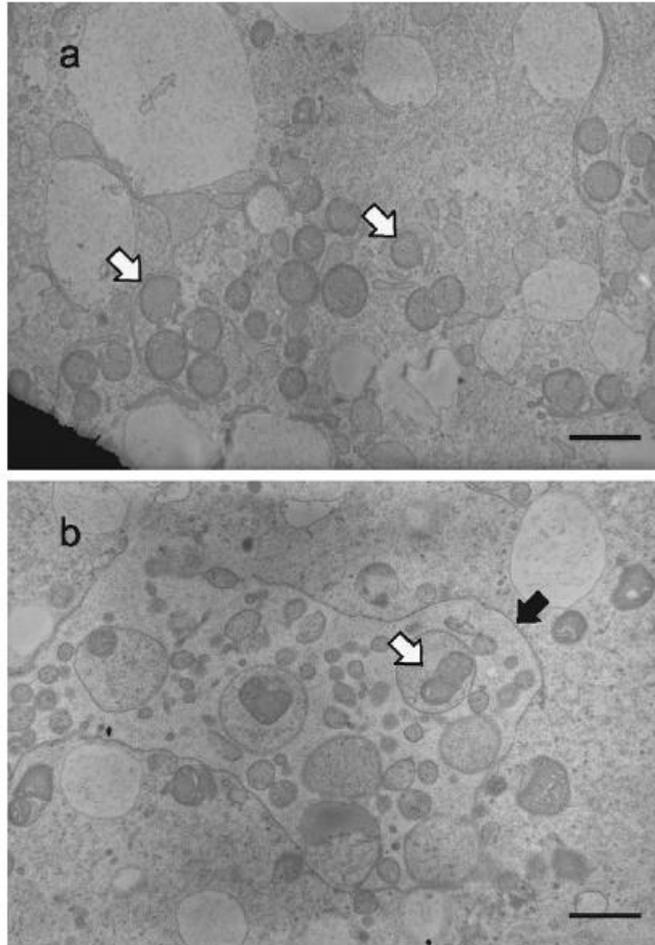


図 2-2 成熟培養後の卵母細胞におけるミトコンドリアと小胞体の電子顕微鏡写真  
TGF- $\alpha$ 無添加(a)および添加(b)して成熟培養した卵母細胞.  
白矢印はミトコンドリア、黒矢印は小胞体を示す. スケールバー= 1  $\mu$ m.

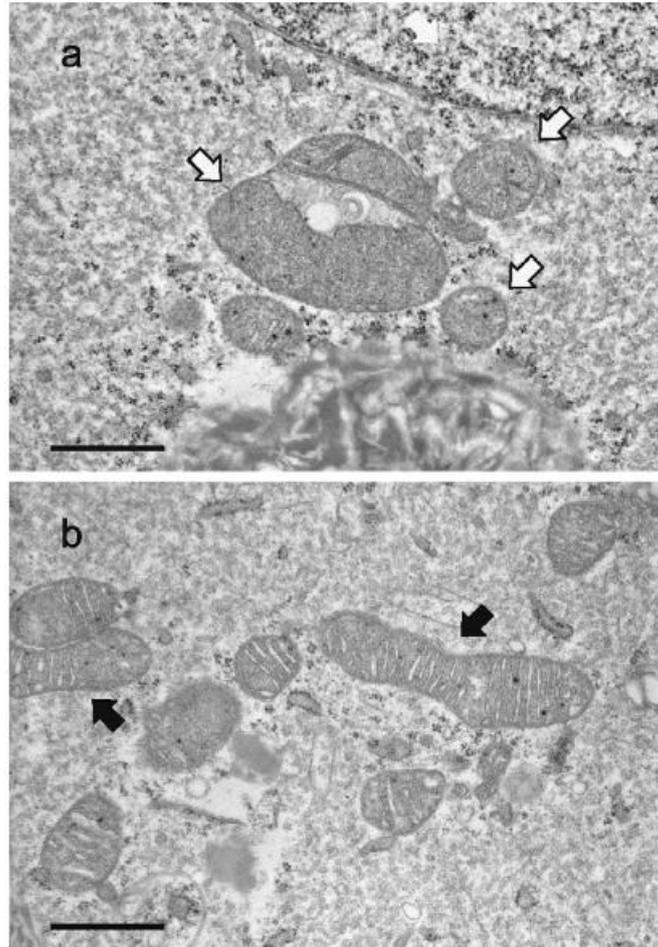


図 2-3 胚盤胞におけるミトコンドリアの電子顕微鏡写真

TGF- $\alpha$ 無添加(a)および添加(b)して成熟培養した卵母細胞由来の胚盤胞.  
白矢印は円形または楕円形のミトコンドリア、黒矢印は伸長したミトコンドリア  
を示す. スケールバー= 1  $\mu$ m.

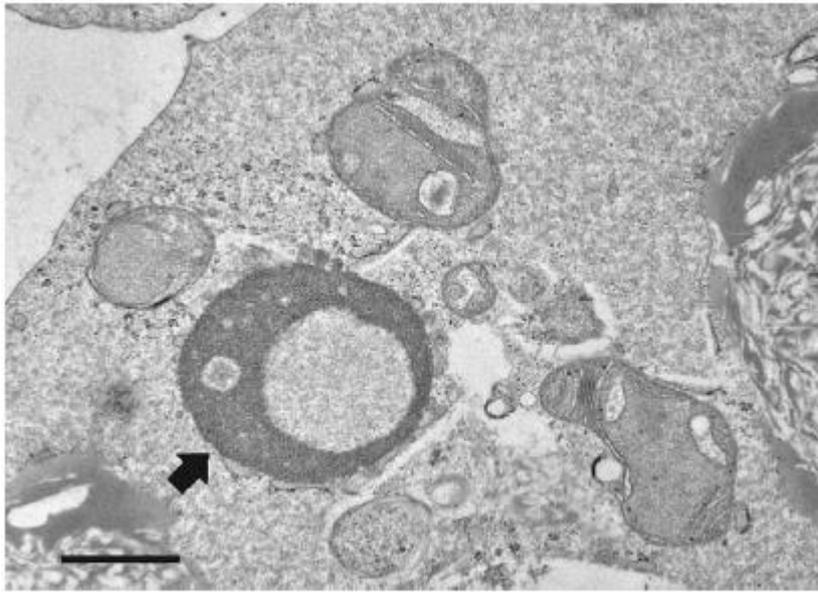


図 2-4 胚盤胞におけるミトコンドリアヌアージュの電子顕微鏡写真  
矢印はミトコンドリアヌアージュを示す. スケールバー= 1  $\mu$ m.

表 2-5 分娩成績

受胚豚	移植胚数	妊娠期間 (日)	産子数 (移植胚数あたり(%))	性比 (雄:雌)	生時体重(kg) <sup>*</sup> [範囲]
C39	22	114	5 (22.7)	3:2	1.05 ± 0.15 [0.75–1.50]
C40	20	116	6 (30.0)	3:3	1.01 ± 0.08 [0.90–1.25]
C43	21	115	8 (38.1)	7:1	1.03 ± 0.09 [0.70–1.35]
C44	20	115	10 (50.0)	6:4	1.15 ± 0.06 [0.80–1.50]
計 <sup>*</sup>	83	115.0 ± 0.5	29 (35.2 ± 6.7)	19:10	1.07 ± 0.04

<sup>\*</sup> 平均値±標準誤差を示す.

### 第3章 TGF- $\alpha$ および FSH がブタ卵成熟と初期胚に及ぼす影響

#### 1. 緒言

前章では、成熟培地に生殖腺刺激ホルモン(eCG、hCG)を添加してブタのCOCsを培養すると、卵母細胞の核成熟を促進した。また、生殖腺刺激ホルモンが存在する場合、TGF- $\alpha$ を添加すると、卵母細胞の核成熟、媒精後の受精率、および卵割率に差は認められなかったが、胚盤胞への発生能が促進されることを明らかにした。しかし、動物由来のホルモン製剤であるeCGおよびhCGは、FSHとLHが混在しており、純度にばらつきがあるため試験結果にも影響を及ぼす可能性がある(Zuelke and Brackett, 1990; Choi *et al.*, 2001)うえ、FSHとLH、それぞれの作用が不明確である。一方、リコンビナント生殖腺刺激ホルモン製剤は高純度でロット間の変動が少ない上、脳下垂体、血清、あるいは尿由来の製剤のようにFSHとLHが相互混入することなく、個別の作用を調べることができる(Michle *et al.*, 2003)。そこで、精製したFSHとLHを用いた卵成熟機構の解析が行われている。ブタのCOCsは、LH単独で添加した培地で培養しても卵丘細胞のcAMP量は増加せず(Mattioli *et al.*, 1994)、卵母細胞の核成熟を促進しない(Ye *et al.*, 2005)。しかし、FSH添加培地で20時間培養後、LHを添加して培養するとCOCsのcAMP量が増加し、卵母細胞の核成熟やその後の胚発生を促進する(Shimada *et al.*, 2003)。これは、FSHによって卵丘細胞のLHレセプターの発現が誘導されたためであることが示されている(Shimada *et al.*, 2003)。

FSHは、卵丘・顆粒膜細胞でのcAMP産生量の増加と(Downs *et al.*, 1988)、それに続いて起こるMAPKの活性化(Su *et al.*, 2002; Liang *et al.*, 2005)に関与し、卵母細胞の減数分裂の再開を誘起すると考えられているが、cAMPがMAPKを活性化するシグナル伝達機構の詳細はわかっていない(Zhang *et al.*, 2009)。最近の知見で、FSHはPKA IIやPKC経路を介してMAPKを活性化している可能性が示唆された(Lu *et al.*, 2001; Liang *et al.*, 2005)。PKCは、EGFが誘導するブタの卵成熟にも関与している可能性が示されている(Coskun and Lin, 1995)が、EGFファミリー分子およびFSHによる卵成熟機構の関連性については明らかにされていない。

FSHやEGFは、COCsにおいて卵成熟に加えて卵丘膨化を促進する(Downs, 1989)。卵丘膨

化は、COCs の卵胞壁からの遊離と排卵、受精、胚発生において積極的な役割を担う(Chen *et al.*, 1993)。膨化した卵丘細胞では、細胞外マトリックスの主成分であるヒアルロン酸(Salustri *et al.*, 1989)が、hyaluronan and proteoglycan link protein 1(HAPLN1)(Neame and Barry, 1993)、tumor necrosis factor alpha induced protein 6(TNFAIP6)(Mukhopadhyay *et al.*, 2001)、および versican(VCAN)(Russell *et al.*, 2003)といったヒアルロン酸結合タンパク質と結合し、特異的な機能的構造を組織化し、また安定化している。COCs の卵丘膨化に関わる hyaluronan synthase 2(HAS2)(Eppig, 1979; Tirone *et al.*, 1997)や TNFAIP6(Fülöp *et al.*, 1997; Yoshioka *et al.*, 2000)等の細胞外マトリックスタンパク質遺伝子は、FSH または amphiregulin、epiregulin、betacellulin のような EGF ファミリー分子によって卵丘細胞で発現を誘導することができる。しかし、ブタの COCs において、ヒアルロン酸およびその結合タンパク質の遺伝子発現に及ぼす TGF- $\alpha$ の影響についてはまだ報告がない。

本章では、TGF- $\alpha$ および FSH が卵成熟に及ぼす影響とその作用機構の関連性を明らかにするとともに、動物由来成分を使用せずに効率良く卵成熟を誘起できる成分既知培地を開発するため、ブタ未成熟卵母細胞を成分既知培地である POM で培養し、卵成熟に対する TGF- $\alpha$ の作用を、核成熟、細胞質成熟、卵丘膨化、および胚発生のそれぞれについて調べ、卵成熟に対する FSH の作用と比較検討した。

## 2. 材料および方法

### 1) 成熟培養、媒精、および発生培養

COCs は、第 2 章 1) に準じて採取した。成熟培養の基礎培地には POM を用い、ホルモンおよびジブチリル cAMP (dbcAMP) を添加した場合は 20 時間まで、TGF- $\alpha$ 、EGF レセプター阻害剤、卵胞液を添加した場合は 44~48 時間まで添加して COCs を培養した。

凍結融解精液は 50% パーコール溶液に懸濁し、80% パーコール溶液に重層して、700  $\times$  g で 20 分間遠心した後、最下層の精子に PFM を加えて 500  $\times$  g で 5 分間の遠心による精子洗浄を 2 回行った。成熟培養後の COCs は、精子濃度を  $1 \times 10^6$  個/ml に調整した 100  $\mu$ l のドロップに加えて 20 時間媒精した。媒精後の胚は、第 2 章 4) に記述した方法と同様に PZM-5 で 5 日間培養した。

### 2) 核成熟および受精の評価

卵母細胞の核成熟および媒精後の受精の評価は、第 2 章 2) および 3) に記述した方法で行った。

### 3) 卵丘膨化の評価

卵丘膨化の程度を評価するため、0, 20, または 44 時間成熟培養をした COCs をそれぞれ 10 個ずつ位相差顕微鏡 (BZ-8000; Keyence, Osaka, Japan) で観察し、それらの面積を ImageJ 1.46m (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて測定した。卵丘膨化の程度は、成熟培養 0 時間の COCs の面積の平均に対するそれぞれの COCs の面積の割合により評価した。

### 4) RT-PCR

RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いて 10 個の COCs から total RNA を抽出し、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit (Roche, Mannheim, Germany) およびランダムへ

キサマープライマーを用いて、total RNA 250 ng から一本鎖相補的 DNA (cDNA) を合成した。ネガティブコントロールとして、total RNA または逆転写酵素を加えずに逆転写反応を行った。

リアルタイム定量 RT-PCR には、FastStart DNA Master SYBR Green I Kit (Roche) を用い、LightCycle® 2.0 system (Roche) で PCR を行った。PCR に用いたプライマー配列と予想される増幅産物のサイズ、および増幅した遺伝子の GenBank アセッション番号を表 3-1 に示す。逆転写された一本鎖 cDNA の一定量 (2.5  $\mu$ l)、3 mM  $MgCl_2$ 、0.5  $\mu$ M の各プライマーおよび 10% LightCycler DNA master SYBR Green I (Roche) を含む 10  $\mu$ l の反応液を調製し、PCR を行った。PCR の反応条件を以下に示した: 95°C 10 分 (1 cycle); 95°C 10 秒、65°C 5 秒 (*HAPLN1*, *ubiquitin [UBB]*)、62°C 10 秒 (*HAS2*, *TNFAIP6*, *VCAN*)、72°C 8 秒 (*HAPLN1*)、または 72°C 10 秒 (*HAS2*, *VCAN*, *UBB*) (45 cycle)。定量には、LightCycler ソフトウェア (Ver. 3; Roche) の 2nd derivative maximum 法を用いた。目的遺伝子の mRNA 量は、*UBB* の増幅 DNA 量に対してノーマライズされた。各プライマーセットの特異性を、定量 PCR 反応後に 2% アガロースゲルを用いた PCR 産物の電気泳動と LightCycler ソフトウェアを用いた融解曲線の分析で確認した。

## 5) 実験デザイン

### (1) 卵母細胞の核成熟における TGF- $\alpha$ および FSH の作用

COCs は、10 ng/ml TGF- $\alpha$  を添加あるいは無添加の POM に、1 mM dbcAMP と 0, 0.01, 0.02, 0.05, および 0.1 IU/ml リコンビナントヒト FSH (Cat. No. IP-26-253P, RayBiotech Inc., Norcross, GA, USA) を添加して 44 時間成熟培養した後、卵母細胞の核相を調べた。

### (2) 卵成熟における TGF- $\alpha$ および FSH が受精および胚発生に及ぼす作用

COCs は、dbcAMP と TGF- $\alpha$  を添加した POM に、0, 0.01, 0.05, および 0.1 IU/ml FSH を添加して 44 時間成熟培養した後、媒精を行い、一部の卵母細胞は受精状況を調べるとともに、残りは PZM-5 で培養し、胚盤胞への発生率および胚盤胞の細胞数を検討した。

### (3) TGF- $\alpha$ および FSH による卵母細胞の核成熟に及ぼす卵丘細胞の作用

COCs、または COCs の卵丘細胞をガラスキャピラリーピペットで除去した DOs を、dbcAMP および、TGF- $\alpha$ 、0.05 IU/ml FSH の一方あるいは両方を添加した POM で 44 時間成熟培養した後、卵母細胞の核相を調べた。

(4) EGF 受容体阻害剤 (AG1478) 添加による卵母細胞の核成熟への影響

COCs は、dbcAMP および、TGF- $\alpha$ 、0.05 IU/ml FSH の一方あるいは両方を含む POM に、EGF レセプター阻害剤 (AG1478; Calbiochem, San Diego, CA, USA) を 10  $\mu$ M の濃度で添加して 44 時間成熟培養した後、卵母細胞の核相を調べた。

(5) TGF- $\alpha$  および FSH による卵母細胞の核成熟の経時的変化

COCs は、dbcAMP および TGF- $\alpha$  を添加した POM に、0.05 IU/ml FSH を添加あるいは無添加で 48 時間成熟培養した。培養開始後 20~48 時間目まで、4 時間間隔で卵母細胞の核相を調べた。

(6) COCs の卵丘膨化と関連遺伝子の発現における TGF- $\alpha$  および FSH の作用

COCs は、dbcAMP および TGF- $\alpha$  を添加した POM に、0.05 IU/ml FSH を添加あるいは無添加で成熟培養し、培養開始後 0, 20, および 44 時間目に卵丘膨化の面積を測定した。また、各培地で 0, 20, および 44 時間培養した COCs における *HAS2*, *TNFAIP6*, *HAPLN1*, および *VCAN* の mRNA 量は、定量 RT-PCR を用いて解析した。

(7) 成熟培養時の卵胞液の添加が卵成熟、受精、および胚発生に及ぼす作用

COCs は、dbcAMP、TGF- $\alpha$ 、および 0.05 IU/ml FSH を添加した POM に、10 % (v/v) ブタ卵胞液を添加あるいは無添加で培養した。卵胞液は胞状卵胞から吸引採取し、4°C で 1710 × g、30 分間遠心して上清を回収し、実験に使用するまで -30°C で保存した。COCs は成熟培養あるいは体外受精後に、卵母細胞の核相および受精状況を調べるとともに、残りは PZM-5 で培養し、胚盤胞への発生率および胚盤胞の細胞数を検討した。

## 6) 統計処理

統計処理には、Statistical Analysis System (SAS Institute, Cary NC, USA)を使用した。多重比較検定としてTukey-KramerのHSD検定を行った。パーセント値および胚盤胞の総細胞数については、アークサイン変換および対数変換後、検定を行った。危険率5%未満の場合に、統計学的に有意な差があると判定した。

### 3. 結果

#### 1) 卵母細胞の核成熟における TGF- $\alpha$ および FSH の作用

卵成熟に対する TGF- $\alpha$ と FSH の作用を調べるため、種々の濃度の FSH を単独あるいは TGF- $\alpha$ と同時に添加して COCs を成熟培養し、卵母細胞の核相を調べた。TGF- $\alpha$ 無添加の場合、GVBD および MII 卵の割合は、0.01~0.1 IU/ml FSH を添加すると、FSH 無添加に比べて有意に高かった( $P < 0.05$ ; 表 3-2)。TGF- $\alpha$ を 0.01~0.1 IU/ml FSH と共に添加すると、GVBD および MII 卵の割合は、TGF- $\alpha$ を添加しなかった場合、または TGF- $\alpha$ と FSH の両方を添加しなかった場合に比べて高かった( $P < 0.05$ )。

#### 2) 卵成熟における TGF- $\alpha$ および FSH が受精および胚発生に及ぼす作用

成熟時の TGF- $\alpha$ と FSH は卵母細胞の核成熟を相乗的に促進したが、受精および胚発生にも影響する可能性が考えられた。そこで、TGF- $\alpha$ と種々の濃度の FSH を添加して成熟培養した COCs を媒精して発生培養した。精子侵入率は、0.05 または 0.1 IU/ml FSH を添加して COCs を成熟培養すると、FSH 無添加の場合に比べて有意に高かった( $P < 0.05$ ; 表 3-3)。また、卵割率は、0.01~0.1 IU/ml FSH を添加して成熟培養すると、FSH 無添加の場合に比べて有意に高かった( $P < 0.05$ ; 表 3-4)。胚盤胞の発生率は、0.05 および 0.1 IU/ml FSH を添加して COCs を成熟培養すると、FSH 無添加の場合に比べて有意に高かった( $P < 0.05$ )。したがって、以降の試験では FSH を 0.05 IU/ml の濃度で使用した。

#### 3) TGF- $\alpha$ および FSH による卵母細胞の核成熟に及ぼす卵丘細胞の作用

TGF- $\alpha$ と FSH は COCs の卵母細胞の核成熟を促進したが、これらの作用には卵丘細胞が関与している可能性が考えられた。そこで、TGF- $\alpha$ および 0.05 IU/ml FSH を添加して COCs あるいは DOs を成熟培養し、卵母細胞の核相を調べた。TGF- $\alpha$ あるいは FSH を添加して COCs を成熟培養すると、MII 卵の割合は、無添加の場合に比べて有意に高かった( $P < 0.05$ ; 図 3-1)。また、TGF- $\alpha$ と FSH の両方を添加して COCs を成熟培養すると、MII 卵の割合は、全ての処理区の中で

最も高かった( $P < 0.05$ )。しかし、DOs を成熟培養すると、TGF- $\alpha$ および FSH は GVBD および MII 卵の割合に影響を及ぼさなかった。

#### 4) AG1478 添加による卵母細胞の核成熟への影響

TGF- $\alpha$ と FSH は卵丘細胞を介して卵母細胞の核成熟を促進することを示したが、卵成熟における FSH の作用は、FSH によって発現が誘導される EGF ファミリー分子を介している可能性が考えられた。そこで、EGF レセプター阻害剤である AG1478 を添加して COCs を成熟培養した。AG1478 は、TGF- $\alpha$ のみ、FSH のみ、または TGF- $\alpha$ と FSH の両方を添加して成熟培養した COCs の MII 卵の割合を低下させた( $P < 0.05$ ; 図 3-2)。しかし、FSH のみ、または TGF- $\alpha$ と FSH の両方を添加して成熟培養した COCs の MII 卵の割合は、TGF- $\alpha$ のみを添加して培養した場合に比べて高かった( $P < 0.05$ )。

#### 5) TGF- $\alpha$ および FSH による卵母細胞の核成熟の経時的変化

AG1478 を添加すると、TGF- $\alpha$ による卵母細胞の核成熟促進作用は完全に阻害されたが、FSH による核成熟促進作用は完全には阻害されず、TGF- $\alpha$ と FSH が一部は異なる経路で作用し、減数分裂の進行速度が異なる可能性が考えられた。そこで、TGF- $\alpha$ および FSH により誘導される卵母細胞の核相の変化を、20~48 時間まで 4 時間毎に観察した。成熟培養後 24~48 時間の GVBD 卵の割合、および 36~48 時間の MII 卵の割合は、TGF- $\alpha$ と FSH の両方を添加して培養すると、TGF- $\alpha$ のみを添加した場合に比べて高かった( $P < 0.05$ ; 図 3-3)。

#### 6) COCs の卵丘膨化と関連遺伝子の発現における TGF- $\alpha$ および FSH の作用

TGF- $\alpha$ と FSH は、卵丘細胞を介して卵母細胞に作用することを示したが、卵丘細胞の膨化にも作用する可能性が考えられた。そこで、COCs の面積を計測するとともに、ヒアルロン酸やその結合タンパク質の mRNA 発現量の解析を行った。TGF- $\alpha$ と FSH の添加は、成熟培養後 20 時間、および 44 時間では無添加で成熟培養した COCs に比べて、面積がそれぞれ 283%、および 916%に増加し、有意に卵丘膨化を促進した( $P < 0.05$ ; 図 3-4)。COCs における HAS2 mRNA の発現量は、

成熟培養後 20 時間で FSH、TGF- $\alpha$ 、あるいはその両方の添加により増加したが、培養 44 時間では低下した ( $P < 0.05$ ; 図 3-5a)。TNFAIP6 mRNA の発現量は、変化は認められなかった (図 3-5b)。COCs における HAPLN1 mRNA の発現量は、成熟培養後 20 時間で FSH と TGF- $\alpha$  の両方を添加すると無添加に比べて増加し、培養 44 時間では 20 時間に比べてさらに増加した ( $P < 0.05$ ; 図 3-5c)。VCAN mRNA の発現は、成熟培養後 20 時間および 44 時間において、FSH を添加すると TGF- $\alpha$  のみ添加した場合に比べて高かった ( $P < 0.05$ ; 図 3-5d)。

#### 7) 成熟培養時の卵胞液の添加が卵成熟、受精、および胚発生に及ぼす作用

成分既知成熟培地への TGF- $\alpha$  と FSH の添加が、卵母細胞の核成熟、卵丘膨化、および胚発生の促進に有効であることを示したが、この培地への卵胞液添加の必要性を調べるため、成熟培地に卵胞液を添加して COCs を培養し、卵成熟、受精、および胚発生に及ぼす作用を検討した。成熟培養時のブタ卵胞液の添加は、GVBD 卵および MII 卵の割合に影響を及ぼさなかった (図 3-6a)。しかし、卵胞液を添加して成熟培養した卵母細胞では、卵胞液無添加に比べて正常受精率が低く、多精子受精率が高かった ( $P < 0.05$ ; 図 3-6b)。また、卵胞液を添加して成熟培養した COCs 由来の胚では、卵胞液無添加で成熟培養した COCs 由来の胚と比較して、卵割率および胚盤胞の細胞数に差は認められなかったが、胚盤胞の発生率が減少した ( $P < 0.05$ ; 図 3-6c)。

#### 4. 考察

本章において、TGF- $\alpha$ と FSH はブタ卵母細胞の核成熟および胚盤胞への発生を相乗的に促進することを明らかにした。TGF- $\alpha$ と FSH による卵母細胞の核成熟促進作用は COCs に限られ、DOs では認められなかった。TGF- $\alpha$ または FSH を添加して成熟培養した COCs では、AG1478 による卵母細胞の核成熟阻害作用、および卵丘膨化関連遺伝子の発現動態が異なることが判明した。

第2章において、eCG と hCG が存在しない場合、POM に TGF- $\alpha$ を添加すると卵母細胞の核成熟を促進したが、eCG と hCG が存在する場合、卵母細胞の核成熟において TGF- $\alpha$ 添加による相加的あるいは相乗的な促進作用は認められなかったことから、TGF- $\alpha$ は eCG と hCG と共通した機構で卵母細胞の核成熟を促進する可能性が推察された。そこで、TGF- $\alpha$ と生殖腺刺激ホルモンの作用の関連性を明確にするため、卵母細胞の核成熟に対する TGF- $\alpha$ と FSH の作用を調べたところ、FSH は COCs の卵成熟を促進し、この効果は TGF- $\alpha$ を添加するとさらに促進された(表 3-2)。Uhm *et al.*(2010)は、ブタ卵母細胞の核成熟に関しては EGF と FSH の相乗効果は認められず、EGF と FSH の作用は機能的に類似していると報告している。一方、Ye *et al.*(2005)は、性成熟ブタ由来の卵母細胞では EGF あるいは FSH を単独で添加すると MII 卵の割合が約 80~90%であり、EGF と FSH による核成熟への相乗作用は認められないのに対し、春機発動前のブタ由来の卵母細胞では EGF あるいは FSH の単独の添加で MII 卵の割合は約 50%程度であり、EGF と FSH の両方を添加すると 90%以上が MII 期に達し、EGF と FSH が核成熟を相乗的に促進したと報告している。これは、春機発動前のブタ由来の卵母細胞は、性成熟ブタ由来の卵母細胞に比べて卵細胞質が発育途上で未熟であり(Ikeda and Takahashi, 2003)、核成熟に関しては FSH 等に対する反応性が低いためである可能性がある(Marchal *et al.*, 2001)。本研究においても、春機発動前のブタ由来の卵母細胞を使用しており、TGF- $\alpha$ と FSH は相乗的に卵母細胞の核成熟を促進した。したがって、ブタの卵母細胞の核成熟における TGF- $\alpha$ と FSH の作用は完全に同じではないことが示された。

TGF- $\alpha$ およびFSHは、COCsの卵母細胞の核成熟を促進したが、DOsの核成熟を促進しなかつ

た(図3-1)。この結果は、TGF- $\alpha$ (Coskun and Lin, 1994)およびFSH(Uhm *et al.*, 2010)がCOCsにおいてのみ卵母細胞の核成熟を促進するという報告と一致していた。ブタでは、EGFレセプターは卵丘細胞に発現しており、卵母細胞には発現していない(Chen *et al.*, 2008)ことから、EGFファミリー分子による卵母細胞の核成熟の促進には卵丘細胞が必須であると考えられた。一方、FSHレセプターは顆粒膜細胞と卵母細胞の両方に存在する(Méduri *et al.*, 2002)。生殖腺刺激ホルモンは、主に卵丘細胞におけるcAMP産生量の増加(Downs *et al.*, 1988)と、それに続いて起こるMAPKの活性化(Su *et al.*, 2002; Liang *et al.*, 2005)によって卵成熟を誘起する。MAPKキナーゼ阻害剤は、COCsとDOsの卵母細胞のMAPKを阻害するが、COCsにおいてのみGVBDを阻害する(Fan *et al.*, 2003)ことから、GVBDには卵母細胞ではなく卵丘細胞のMAPK活性が必要であると考えられている。これらの結果から、TGF- $\alpha$ とFSHは卵丘細胞を介して卵母細胞の核成熟を促進することを明らかにした。

TGF- $\alpha$ による卵母細胞の核成熟促進作用は、EGFレセプターのチロシンキナーゼ阻害剤であるAG1478により完全に阻害された(図3-2)。この結果から、TGF- $\alpha$ も他のEGFファミリー分子と同様に、EGFレセプターのチロシンキナーゼを活性化させることにより卵母細胞の核成熟を促進することが確認できた。マウスやラットのCOCsにおいて、amphiregulin、epiregulin、およびbetacellulinを含むEGFファミリー分子の発現はLHの刺激により誘導され(Park *et al.*, 2004; Ashkenazi *et al.*, 2005; Sekiguchi *et al.*, 2004)、LHの作用はAG1478によって阻害されることから、これらのEGFファミリー分子はLHが誘起する卵成熟の仲介物質として作用すると考えられている(Park *et al.*, 2004; Conti *et al.*, 2006)。一方、FSHも卵丘・顆粒膜細胞でepiregulin(Sekiguchi *et al.*, 2002)やamphiregulin(Shimada *et al.*, 2006)の発現を誘導すると報告されており、これらのEGFファミリー分子はFSHが誘起する卵成熟の仲介物質としても作用する可能性が示されている(Chen *et al.*, 2008; Downs and Chen, 2008)。Uhm *et al.*(2010)とChen *et al.*(2008)は、ブタのCOCsにおいて、AG1478がFSHにより誘起されるGVBDや卵丘膨化を完全に阻害することから、FSHが誘起する卵成熟にはEGFファミリー分子によるEGFレセプターの活性化が関与すると報告している。しかし本研究において、AG1478はFSHによる卵成熟促進作用を抑制したものの、完全には阻害しなかった。この結果から、FSHはEGFレセプターのシグナル伝

達経路とは別の経路にも作用することが示唆された。

成熟培地に TGF- $\alpha$  と 0.05~0.1 IU/ml FSH を添加すると、TGF- $\alpha$  のみを添加した場合に比べて、精子侵入率、胚盤胞形成率、および胚盤胞の総細胞数が増加した(表 3-3, 3-4)。また、成熟培地に TGF- $\alpha$  と FSH を両方添加すると、TGF- $\alpha$  のみを添加した場合に比べて、卵母細胞の減数分裂の進行は速かった(図 3-3)。卵母細胞が MII 期に達する時間は、媒精後の胚発生にも影響する。ブタにおいて、MII 期に達した直後の卵母細胞は、さらに 8 時間培養した卵母細胞に比べて、体外受精後の胚発生能が低い(Gruppen *et al.*, 1997a)と報告されている。これは、MII 期に達した直後の卵母細胞では、紡錘体が未熟であり、細胞質成熟も不十分であるためと考えられる(Dominko and First, 1997)。FSH と EGF ファミリー分子が卵成熟を促進する細胞内メカニズムの関係は完全には明らかになっていない。たとえば、FSH および EGF は両方とも、結合したレセプターの下流の MAPK 経路を活性化する(Su *et al.*, 2002; Conti *et al.*, 2006)が、これらの経路が重複しているのか並行しているのかは特定されていない。FSH は卵丘細胞中の cAMP 量の増加により PKA I と PKA II の両方を活性化する(Farin *et al.*, 2007)。PKA I の活性化は卵母細胞の減数分裂の再開を抑制するが、卵丘細胞における PKA II の活性化は卵母細胞の GVBD を誘起するため、卵丘細胞における PKA II の活性化が FSH による卵母細胞の減数分裂再開の要因となる主要なサブタイプであると報告されている(Downs and Hunzicker-Dunn, 1995; Rodriguez *et al.*, 2002; Newhall *et al.*, 2006)。また、PKC の活性化も FSH が誘導する MAPK の活性化と卵成熟に関与している(Su *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2001)。PKA および PKC は、EGF レセプターのシグナル伝達経路を活性化することにより FSH の作用を調節している可能性がある(Zhang *et al.*, 2009; Procházka *et al.*, 2012)。一方、転写阻害剤は FSH による作用を阻害するが、EGF による作用は阻害しないことから、EGF ファミリー分子と FSH による MAPK 経路は直接相互接続していない可能性も示唆されている(Farin *et al.*, 2007)。さらに、cAMP とは別のセカンドメッセンジャーであるサイクリックグアノシン 5'-リン酸(cGMP)もまた、生殖腺刺激ホルモンが誘起する哺乳類の卵成熟の調整に重要な役割を果たす(Lapolt *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2007)。FSH は cGMP 依存性のプロテインキナーゼ(PKG)経路に関与し、MAPK 活性と卵成熟を調整している可能性もある。これらの結果から、TGF- $\alpha$  と FSH は部分的に異なるシグナル伝達経路を介して作用し、相乗的に減数分裂の進行速

度を速めて卵母細胞の成熟を促進することで、胚盤胞への発生や胚盤胞の総細胞数を向上させた可能性が示唆された。

TGF- $\alpha$ とFSHは卵丘膨化を相乗的に促進した(図3-4)。生体内においてCOCsの卵丘膨化はLHサーージにより誘起されるが、培養下のブタCOCsにおいてはLHよりもFSHの方が卵丘膨化の促進効果が高いと報告されている(Singh *et al.*, 1993)。卵丘に蓄積される細胞外マトリックスの主成分はヒアルロン酸であり(Eppig, 1979)、FSHによる卵丘膨化は、卵丘細胞におけるcAMPの上昇と、HAS2の発現量の増加によるヒアルロン酸合成の増加により起こる(Salustri, 2000)。また、amphiregulinやepiregulinなどのEGFファミリー分子も卵丘膨化促進作用を示し、HAS2の発現を誘導する(Procházka *et al.*, 2011; 2012)。本研究においても、TGF- $\alpha$ あるいはFSHを添加するとHAS2の発現量が増加したが、TGF- $\alpha$ とFSHによる相乗的な増加は認められなかった(図3-5a)。卵丘膨化において細胞外マトリックスを組織化するためには、ヒアルロン酸がHAPLN1(Neame and Barry, 1993)、TNFAIP6(Fülöp *et al.*, 1997)、あるいはVCAN(Russell *et al.*, 2003)等のヒアルロン酸結合タンパク質と結合する必要がある。本研究では、HAPLN1の発現量はTGF- $\alpha$ とFSHを両方添加すると相乗的に増加した(図3-5c)。一方、VCANの発現量はFSHが存在すると増加したが、TGF- $\alpha$ の添加による増加は認められず(図3-5d)、TGF- $\alpha$ とFSHによるVCANの発現動態は異なっていた。VCANは、N末端にリンクモジュールというヒアルロン酸結合ドメイン(LeBaron *et al.*, 1992)を、C末端に細胞表面あるいはマトリックス分子に結合するレクチンリンクドメインを持つ(Miura *et al.*, 1999; Olin *et al.*, 2001)。HAPLN1とTNFAIP6は、ヒアルロン酸と、aggrecan(Neame and Barry, 1993; Parkar *et al.*, 1998)、VCAN(Shi *et al.*, 2004)、およびheavy chains of inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor(I $\alpha$ I)(Hirashima *et al.*, 1997; Mukhopadhyay *et al.*, 2001)のようなプロテオグリカンの球状ドメインと相互作用し、細胞外マトリックスにおいて安定した三成分複合体を形成する。HAPLN1を成熟培地に添加すると、卵丘細胞外マトリックスにおいて、架橋結合したヒアルロン酸-I $\alpha$ I複合体を形成することによりCOCsの卵丘膨化を促進し、HAPLN1がCOCsのマトリックスの安定剤として重要な働きをすることが示唆されている(Sun *et al.*, 2002)。これらの結果から、TGF- $\alpha$ とFSHはどちらもヒアルロン酸の合成を促進するが、TGF- $\alpha$ とFSHにより発現が誘導されたヒアルロン酸結合タンパク質とヒアルロン酸が結合することにより、細胞外マトリックスが組織化およ

び安定化し、卵丘膨化が促進されたと推察される。

TGF- $\alpha$ とFSHを含むPOMへの卵胞液を添加すると、多精子受精が増加し、胚盤胞への発生率が低下した(図 3-6)。ブタ卵母細胞の成熟培養においては、卵胞液を添加すると、核成熟、媒精後の正常受精率、および雄性前核形成(Naito *et al.*, 1988; Yoshida *et al.*, 1992)が促進されると報告されており、卵胞液は現行の体外成熟システムで一般に使用されている。卵胞液には細胞成長因子(Hammond, 1985; Hsu *et al.*, 1987)、ステロイドホルモンおよび生殖腺刺激ホルモン(Ainsworth *et al.*, 1980)のほか、様々な未知成分が含まれている。これらの濃度は卵胞の発育段階によって変化する(Ainsworth *et al.*, 1980; Bridges *et al.*, 2002)ため、採取した卵胞のサイズによって卵成熟や胚発生における卵胞液の効果も変化する(Vatzias and Hagen, 1999; Algriany *et al.*, 2004; Ito *et al.*, 2008)。このように、卵胞液の使用は実験の再現性の低下を招くだけでなく、卵母細胞の栄養要求性の解明を困難にする(Petters and Wells, 1993)。本研究においては、TGF- $\alpha$ とFSHを含む成熟培地に卵胞液を添加すると、媒精後の胚発生においてむしろ悪影響を及ぼすことが明らかになり、細胞成長因子やホルモン濃度が過剰になった可能性も考えられた。この結果から、新たに開発した成熟培地には卵胞液添加が必要ないことを示した。

本章では、成熟培地にTGF- $\alpha$ とFSHを添加すると、COCsにおける卵母細胞の核成熟、卵丘膨化、および胚発生が相乗的に促進されることを明らかにした。一方、TGF- $\alpha$ とFSHの核成熟促進効果は、裸化卵子では認められなかった。また、COCsにおけるAG1478の影響とヒアルロン酸結合タンパク質のmRNA発現動態の違いから、FSHの卵成熟への作用はTGF- $\alpha$ と異なることを明らかにした。したがって、TGF- $\alpha$ とFSHは一部異なる作用機構により、卵丘細胞を介してブタ卵母細胞の成熟を促進することが示唆された。

## 5. 小括

本章では、成分既知の成熟培地を用いて、TGF- $\alpha$ および FSH がブタの卵成熟と胚発生に及ぼす影響とそれぞれの作用機構の関連性について検討した。

TGF- $\alpha$ と FSH は、卵母細胞の核成熟、卵丘膨化、および胚発生を相乗的に促進した。一方、TGF- $\alpha$ と FSH は、裸化卵母細胞の核成熟を促進しなかった。EGF レセプター阻害剤である AG1478 は、TGF- $\alpha$ による卵母細胞の核成熟促進作用を完全に阻害したが、FSH による作用を完全には阻害しなかった。さらに、TGF- $\alpha$ と FSH が誘導する卵丘膨化の関連遺伝子の発現動態は異なっていた。

以上の結果から、TGF- $\alpha$ と FSH は卵丘細胞を介して、一部は異なる経路により卵母細胞の核成熟を促進することが示唆された。また、TGF- $\alpha$ と FSH は卵母細胞の成熟および胚発生を相乗的に促進することを明らかにした。

表 3-1 定量 RT-PCR で用いられたプライマーの配列

遺伝子	プライマーの配列(5'-3')	増幅産物のサイズ (bp)	GenBank アセション番号
<i>HAS2</i>	F: ACCCAACTGGTCTTGTCCAA R: ACACTGCTGAGGAAGGAGAT	260	AB050389
<i>TNFAIP6</i>	F: TACGACAGTTACGACGACGT R: CACGGAAGCATCACTTAGGA	120	NM_001159607
<i>HAPLN1</i>	F: AGACCTTACCCTGGAGGATT R: ACAAGCCTGCTGTGCTTCAT	163	NM_001004028
<i>VCAN</i>	F: CTGCTACCCTACTGAAACGT R: AAGTGCACCTACATAGCTCG	175	AB558520.1
<i>UBB</i>	F: TGTTGGCGGTTTCGCTGTTG R: AGTGCGGCCATCCTCCAGCT	248	NM_001105309

表 3-2 成熟培地への TGF- $\alpha$ および FSH 添加が卵母細胞の核成熟に及ぼす影響

FSH (IU/ml)	TGF- $\alpha$ (ng/ml)	卵母細胞数	GVBD (%)	MII (%)
0	0	93	32 (34.4 $\pm$ 5.6) <sup>a</sup>	21 (22.5 $\pm$ 5.5) <sup>a</sup>
0.01	0	91	69 (75.5 $\pm$ 3.3) <sup>b</sup>	46 (50.4 $\pm$ 3.7) <sup>b</sup>
0.02	0	85	72 (84.1 $\pm$ 3.8) <sup>bc</sup>	50 (58.7 $\pm$ 2.6) <sup>b</sup>
0.05	0	89	79 (88.6 $\pm$ 3.5) <sup>bd</sup>	55 (61.5 $\pm$ 6.0) <sup>b</sup>
0.1	0	90	77 (85.5 $\pm$ 3.4) <sup>bc</sup>	56 (62.5 $\pm$ 5.7) <sup>b</sup>
0	10	87	65 (73.2 $\pm$ 5.3) <sup>b</sup>	39 (43.7 $\pm$ 4.0) <sup>ab</sup>
0.01	10	86	82 (95.1 $\pm$ 2.4) <sup>cd</sup>	73 (84.5 $\pm$ 2.5) <sup>c</sup>
0.02	10	90	87 (96.6 $\pm$ 2.4) <sup>cd</sup>	81 (89.9 $\pm$ 1.5) <sup>c</sup>
0.05	10	85	84 (98.8 $\pm$ 1.2) <sup>d</sup>	73 (85.6 $\pm$ 2.7) <sup>c</sup>
0.1	10	87	83 (95.1 $\pm$ 2.7) <sup>cd</sup>	76 (86.6 $\pm$ 3.4) <sup>c</sup>

6回の繰り返し実験による平均値 $\pm$ 標準誤差を示す.

<sup>a-d</sup>同一列間の異なる文字間に有意差あり(P < 0.05).

表 3-3 成熟培地への TGF- $\alpha$ および FSH 添加が受精率に及ぼす影響

FSH (IU/ml)	卵子数	精子侵入 (%)	正常受精 (%) <sup>*</sup>	多精子受精 (%) <sup>*</sup>	雄性前核形成 (%) <sup>*</sup>	受精卵あたりの精子数
0	131	86 (65.4 ± 4.9) <sup>a</sup>	38 (43.5 ± 6.8)	44 (51.8 ± 7.0)	78 (90.6 ± 3.1)	2.1 ± 0.3
0.01	130	106 (81.6 ± 3.4) <sup>ab</sup>	64 (59.1 ± 6.6)	40 (38.7 ± 6.2)	104 (97.8 ± 2.2)	1.6 ± 0.1
0.05	126	113 (89.7 ± 2.8) <sup>bc</sup>	69 (60.5 ± 3.9)	43 (38.4 ± 3.5)	110 (97.1 ± 2.1)	1.5 ± 0.1
0.1	128	121 (94.4 ± 2.4) <sup>c</sup>	74 (60.8 ± 4.9)	47 (39.2 ± 4.9)	119 (98.2 ± 1.2)	1.6 ± 0.1

7回の繰り返し実験による平均値±標準誤差を示す。

<sup>\*</sup>精子侵入卵子数あたりの割合。

<sup>a-c</sup>同一列間の異なる文字間に有意差あり(P < 0.05)。

表 3-4 成熟培地への TGF- $\alpha$ および FSH 添加が胚発生率に及ぼす影響

FSH (IU/ml)	培養胚数	卵割胚数(%)	胚盤胞数(%)	胚盤胞の細胞数
0	175	68 (38.2 $\pm$ 5.0) <sup>a</sup>	12 (6.8 $\pm$ 2.4) <sup>a</sup>	22.9 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>
0.01	171	106 (62.0 $\pm$ 3.4) <sup>b</sup>	28 (16.4 $\pm$ 3.0) <sup>ab</sup>	39.4 $\pm$ 3.2 <sup>b</sup>
0.05	166	111 (66.9 $\pm$ 4.8) <sup>b</sup>	37 (22.5 $\pm$ 3.7) <sup>b</sup>	36.4 $\pm$ 2.4 <sup>b</sup>
0.1	168	115 (68.5 $\pm$ 4.3) <sup>b</sup>	41 (24.4 $\pm$ 2.4) <sup>b</sup>	39.9 $\pm$ 2.5 <sup>b</sup>

7回の繰り返し実験による平均値 $\pm$ 標準誤差を示す。

<sup>a,b</sup>同一列間の異なる文字間に有意差あり(P < 0.05)。

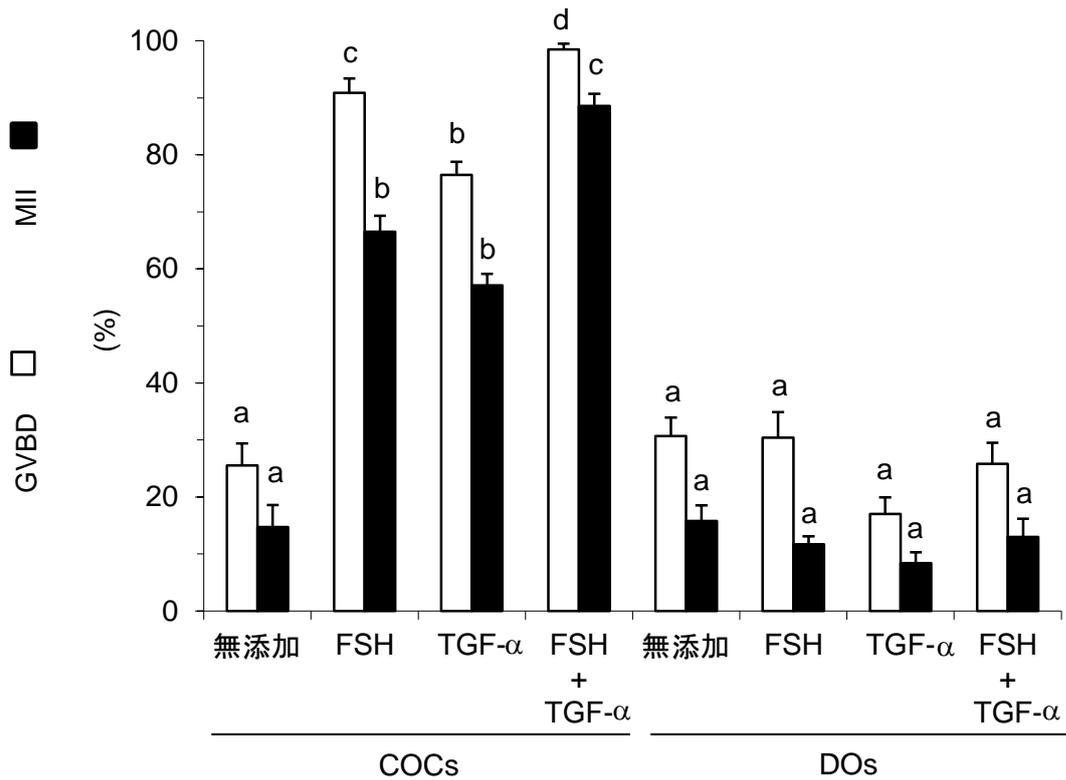


図 3-1 TGF- $\alpha$ および FSH が卵丘-卵母細胞複合体(COCs)と裸化卵母細胞(DOs)の核成熟に及ぼす影響

8回の繰り返し実験による平均値±標準誤差を示す.

<sup>a-d</sup> 同一項目内の異なる文字間に有意差あり(P < 0.05).

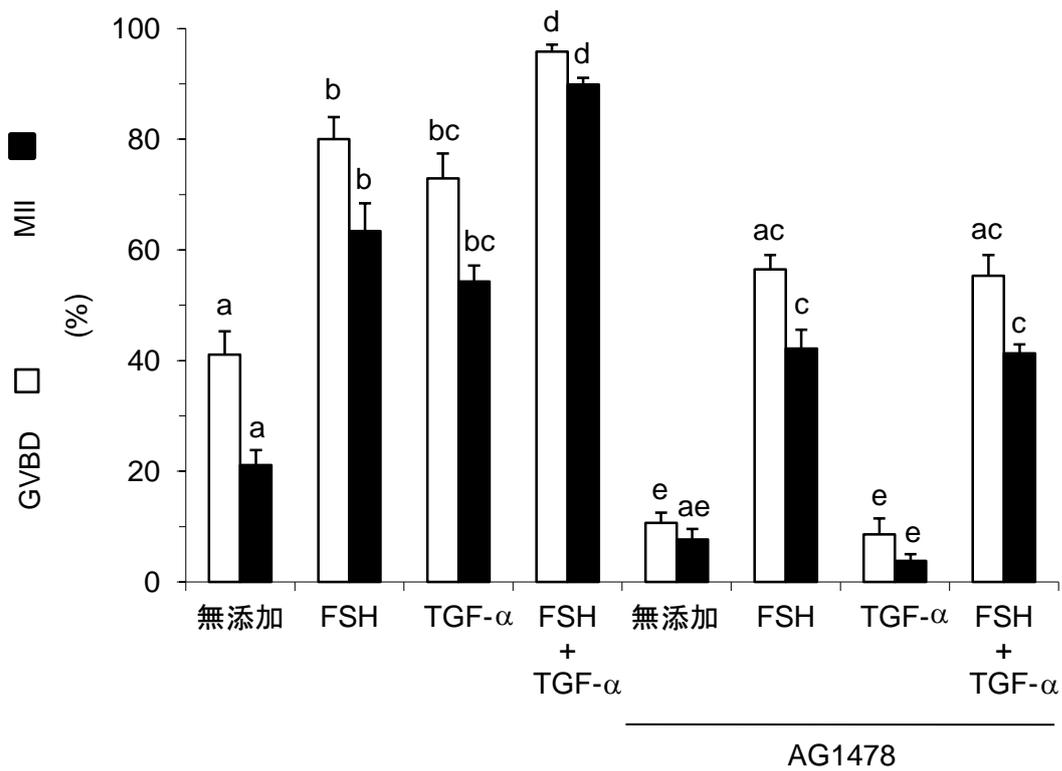


図 3-2 AG1478 の添加が卵母細胞の核成熟に及ぼす影響  
 6回の繰り返し実験による平均値±標準誤差を示す。  
<sup>a-e</sup> 同一項目内の異なる文字間に有意差あり(P < 0.05).

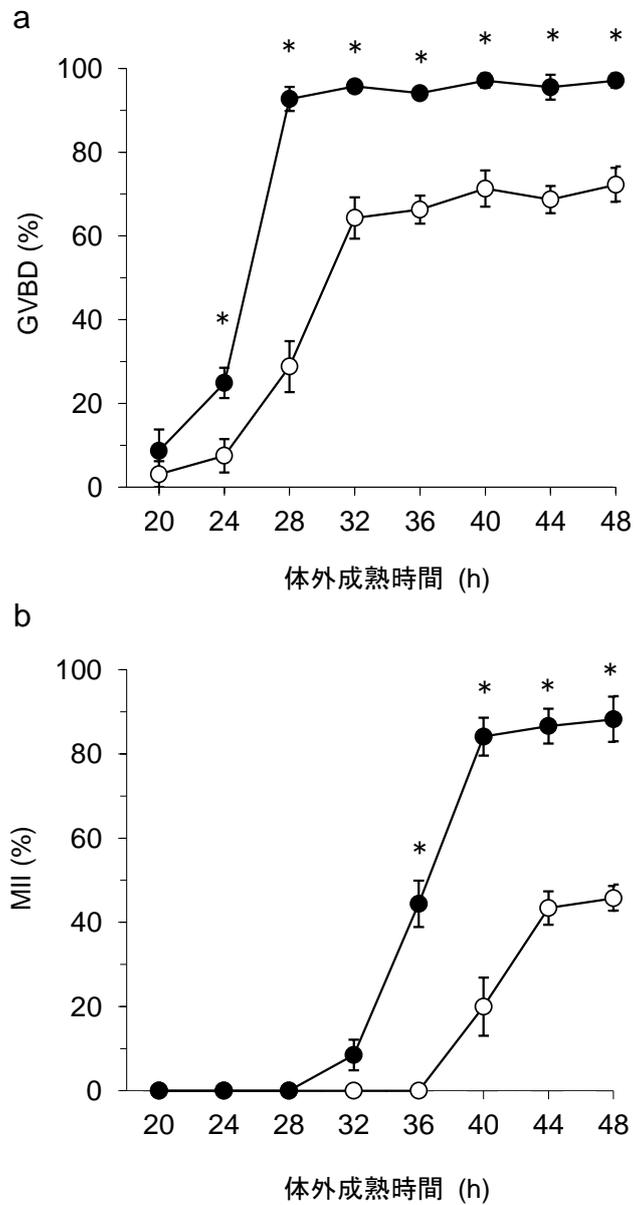


図 3-3 TGF- $\alpha$ を含む POM に FSH を添加(●)あるいは無添加(○)で成熟培養したときの GVBD 卵(a)および MII 卵(b)の割合の経時的変化  
4回の繰り返し実験による平均値 $\pm$ 標準誤差を示す。

\*処理間に有意差あり(P < 0.05).

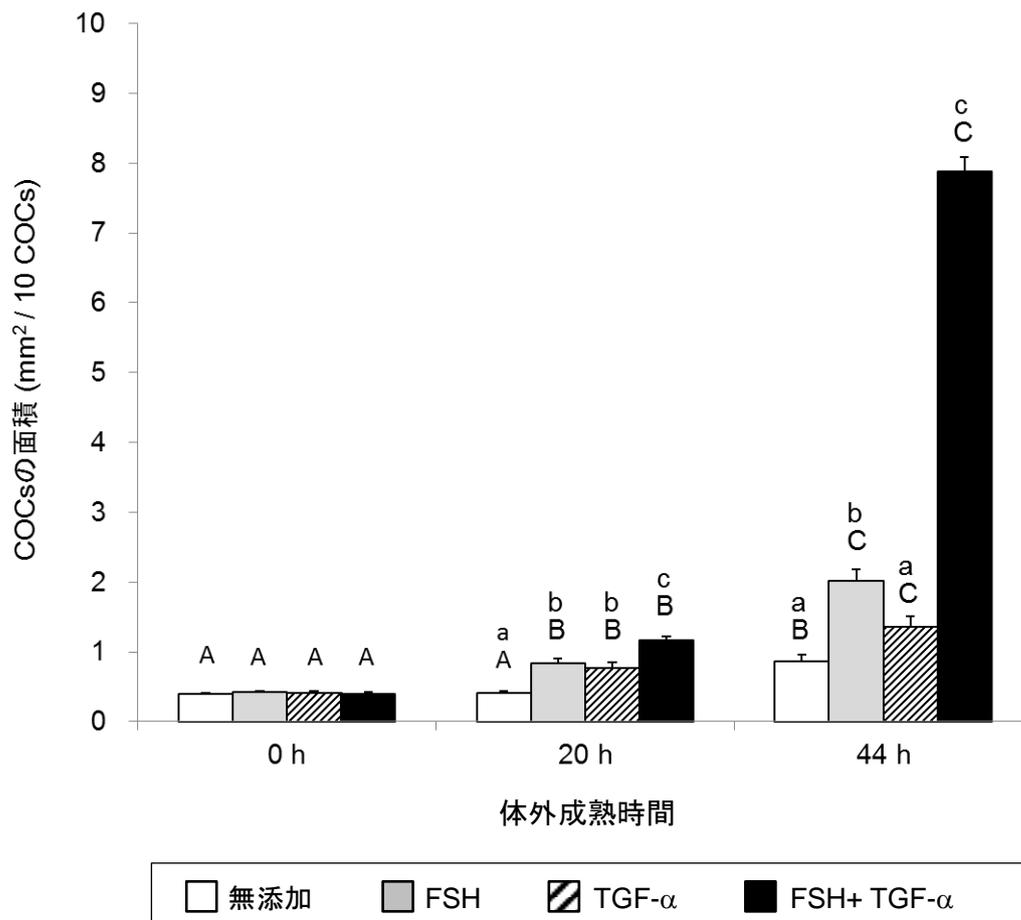


図3-4 6回の繰り返し実験による平均値±標準誤差を示す。  
 同一培養時間内(a-c)あるいは同一処理区内(A-C)の異なる文字間に有意差あり(P < 0.05).

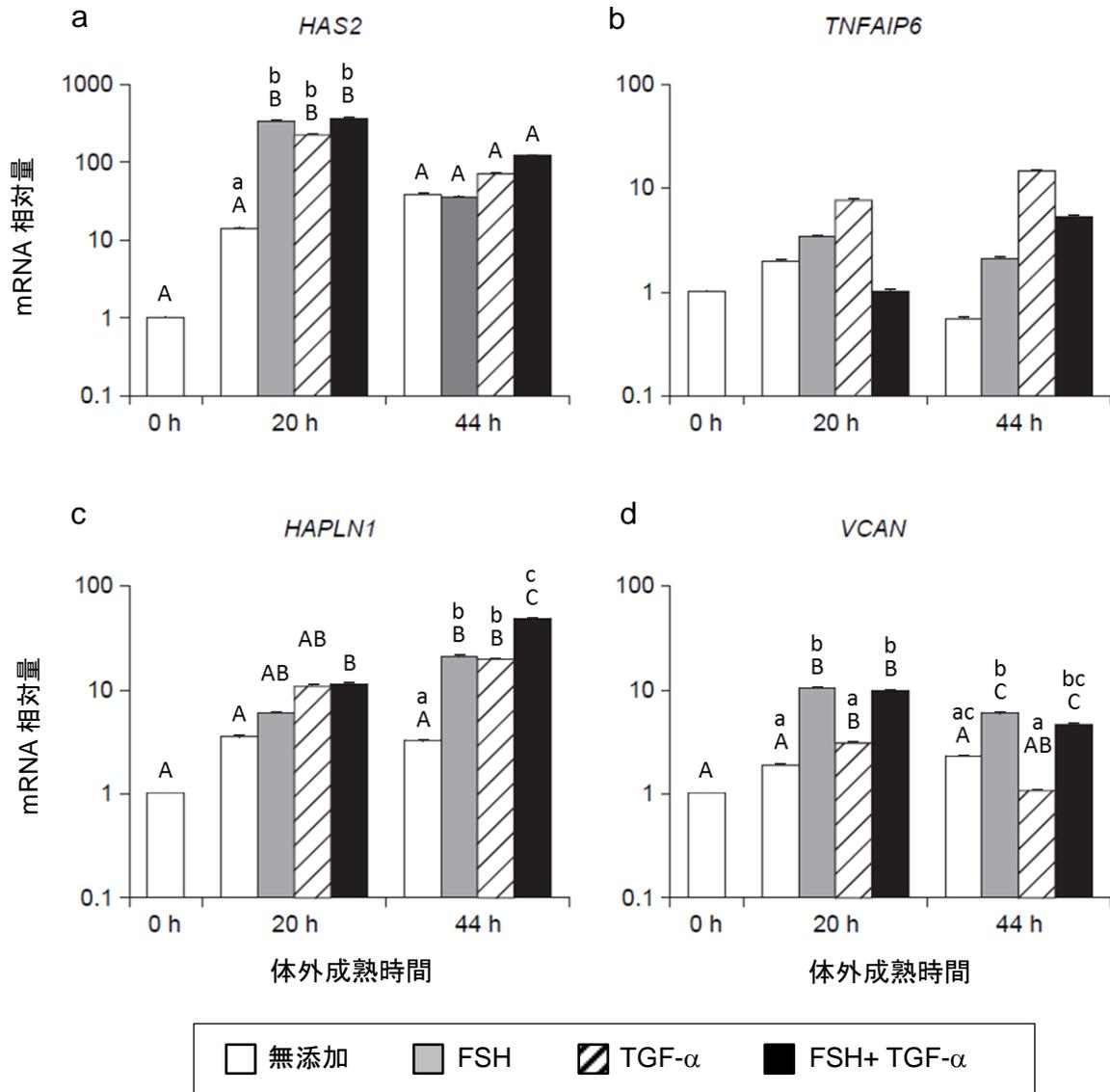


図 3-5 卵丘膨化関連遺伝子(a) *HAS2*, (b) *TNFAIP6*, (c) *HAPLN1*, および(d) *VCAN* の mRNA 発現における TGF- $\alpha$  および FSH の作用  
4回の繰り返し実験による平均値±標準誤差を示す。  
同一培養時間内(a-c)あるいは同一処理区内(A-C)の異なる文字間に有意差あり (P < 0.05).

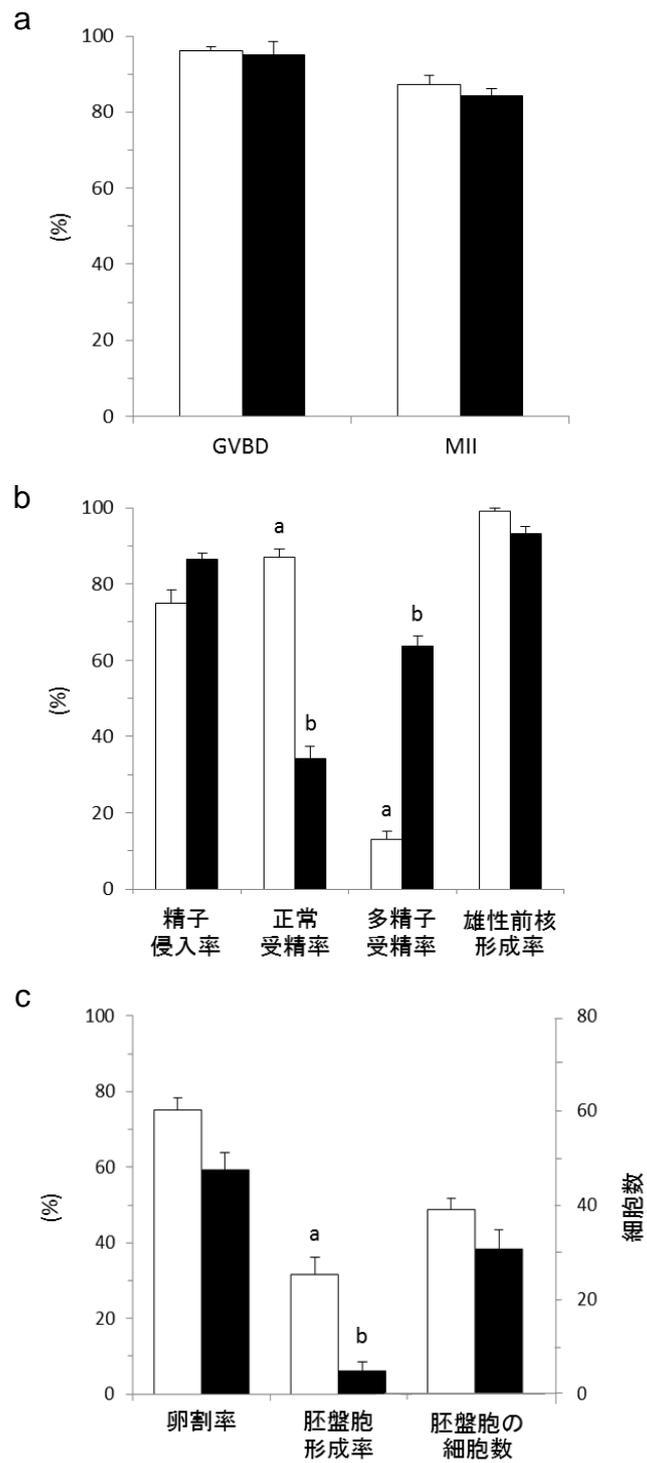


図 3-6 成熟培地へのブタ卵胞液の添加(■)あるいは無添加(□)が卵母細胞の成熟(a)、受精(b)、および胚発生(c)に及ぼす影響  
6回の繰り返し実験による平均値±標準誤差を示す。  
<sup>a,b</sup> 同一項目内の異なる文字間に有意差あり(P < 0.05)。

## 第4章 グルコースおよびグリシンがブタ胚盤胞の発生に及ぼす影響

### 1. 緒言

前章では、効率良く卵成熟を誘起できる成分既知の成熟培地を開発することに成功し、FSH と TGF- $\alpha$ が卵成熟および胚発生に相乗的に作用することを明らかにした。一方、一般に体外生産胚は同時期の体内発育胚に比べて生存能力が低く(Machaty *et al.*, 1998)、胚の生存性を高めて発生を進める未知の因子の存在が示唆されている。そこで、本章では、アミノ酸と糖質に焦点をあてて、この因子の同定を行った。

胚の栄養およびエネルギー要求性の変化は、胚性遺伝子の活性化、桑実胚のコンパクション、胚盤胞の形成および拡張を含む生理学的・形態学的変化に関連している。これまでに、ピルビン酸、乳酸、グルコースが、1 細胞期の受精卵から胚盤胞期に至るまでの着床前胚の必須栄養素、または主要なエネルギー源として同定されている(Brinster, 1974; Brown and Whittingham, 1992)。培養下のブタ胚の卵割初期において、培地へのピルビン酸と乳酸の添加は胚盤胞への発生を促進することが示唆されている(Kikuchi *et al.*, 2002b; Karja *et al.*, 2006)。一方、卵割初期に高濃度のグルコースが存在すると、ハムスター(Schini and Bavister, 1988)、マウス(Chatot *et al.*, 1989)、ヒト(Conaghan *et al.*, 1993)、ウシ(Takahashi and First, 1992)、およびブタ(Flood and Wiebold, 1988)の胚発生に抑制的な影響があり、ブタでは、4 細胞期で胚発生が停止する(Ankrah and Appiah-Opong, 1999; Medvedev *et al.*, 2004)。一方、グルコース代謝は桑実胚期に活性化して胚盤胞期まで活性が上昇し(Sturmey and Leese, 2003)、4 細胞期以降の高濃度のグルコースの存在は、胚盤胞への発生と胚の総細胞数を増加させる(Kikuchi *et al.*, 2002b)。しかし、グルコースが胚盤胞期以降における胚発生や孵化に及ぼす作用については明らかにされていない。

発生培地へのアミノ酸の添加は、様々な動物種の胚発生を促進する(Gardner and Lane, 1993; Bavister and Arlotto, 1990; Lee *et al.*, 2004; Suzuki and Yoshioka, 2006)。アミノ酸は、胚のエネルギー基質(Rieger, 1992; Partridge and Leese, 1996)や、pH 調整媒体(Baltz, 1993; Edwards *et al.*, 1998)、タンパク質やヌクレオチドの前駆物質(Epstein and Smith, 1973)、細胞内浸透圧調

節物質 (Van Winkle and Campione, 1996; Dawson *et al.*, 1998; Steeves *et al.*, 2003; Tartia *et al.*, 2009) として作用する。一部のアミノ酸は、血漿に比べて雌性生殖器や胚に大量に存在している (Schultz *et al.*, 1981; Guérin *et al.*, 1995)。特に、グリシンはマウス (Harris *et al.*, 2005)、ウシ (Elhassan *et al.*, 2001)、およびブタ (Iritani *et al.*, 1974; Li *et al.*, 2007) の卵管液と子宮液中に最も豊富に含まれるアミノ酸である。PZM-5 は、ブタ卵管液の無機イオン、エネルギー基質の組成を基にした体外発生用の成分既知培地であり、グルタミン、ハイポタウリン、イーグル基礎培地の 12 種類の必須アミノ酸とイーグル最少必須培地の 7 種類の非必須アミノ酸を含む。しかし、卵管液のアミノ酸濃度は時期によって異なり、発情後 3~5 日のブタの子宮液中のグリシン濃度、3.8~5.4 mM は、PZM-5 のグリシン濃度、0.1 mM に比べて 40~50 倍も高い (Li *et al.*, 2007; Suzuki and Yoshioka, 2006)。このことは、卵管および子宮での高濃度のグリシンの存在が、胚発生において何らかの役割を担う可能性を示している。マウスの胚盤胞では、グリシンは、セリンとアラニンに変換され、タンパク質や核酸のような高分子合成のエネルギー基質や前駆物質として利用される可能性が示されている (Hobbs and Kaye, 1985)。培養下において、ウシでは、グリシンが胚の発生と胚盤胞の細胞数を増加させる (Lee and Fukui, 1996; Takahashi and Kanagawa, 1998)。しかし、ブタの胚発生における高濃度のグリシンの作用は明らかにされていない。

本章では、体外で受精および発生させたブタ胚盤胞の発生に及ぼすグルコースとグリシンの影響について、胚盤胞の生存性と孵化率、ATP 含量、直径、総細胞数およびアポトーシス細胞出現頻度を、成分既知培地である PZM-5 を用いて検討した。

## 2. 材料および方法

### 1) 成熟培養、媒精、および発生培養

第2章1)に準じて採取したCOCsは、10 IU/ml eCG、10 IU/ml hCG、および1 mM dbcAMPを添加したPOMで成熟培養開始20時間目まで培養し、その後24時間はホルモンとdbcAMPを添加しないPOMで培養した。成熟培養後のCOCsは、第3章1)と同様の方法で媒精し、PZM-5で5日間胚を培養した。

### 2) アポトーシス細胞の検出

胚盤胞のアポトーシス細胞は、核染色とTUNEL (terminal deoxyribonucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP–digoxigenin nick end-labelling) 法の同時染色により検出した。TUNEL法には*In Situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche Diagnostic, Indianapolis, IN, USA)を用いた。胚盤胞を、3 mg/ml PVA添加PBS (PBS-PVA)で3回洗浄した後、4% (w/v)パラホルムアルデヒドに浸漬し、4°Cで一晩固定した。固定後の胚はPBS-PVAで3回洗浄し、PBSに希釈した0.1% (v/v) Triton X-100で60分間透過処理を行った後、ブロッキング剤(1% (w/v)ウシ血清アルブミン添加PBS)に浸漬し、4°Cで一晩静置した。50 U/ml デオキシリボヌクレアーゼI (Promega, Madison, WI, USA)で37°C、60分間処理した胚をポジティブコントロールとして用いた。胚をPBS-PVAで洗浄後、TUNEL反応混合液に浸漬し、37°C、遮光下で1時間反応させた。フルオレセイン-dUTPと反応させた胚をネガティブコントロールとした。これらの胚を、10 µg/mlヘキスト33342で20分間対比染色した後、PBS-PVAで洗浄し、スライドグラスに乗せて抗退色剤(Slow Fade Antifade Reagent; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)で封入して、蛍光顕微鏡(BZ-8000; Keyence)で観察した。核の総数とTUNEL法により標識された核の数を計数し、核の総数に対するTUNEL法により標識された核の割合をアポトーシス指数と定義した。

### 3) 胚盤胞の直径の計測

胚盤胞の直径は、画像処理プロセッサ(ARGUS-10; Hamamatsu Photonics, Hamamatsu,

Japan)を装着した倒立顕微鏡(IMT-2; Olympus)を用いて、垂直に交わる2ヶ所を計測した平均値から算出した。

#### 4) ATP 含量の測定

胚盤胞の ATP 含量は、ルシフェリン・ルシフェラーゼ反応を用いた測定キット(ATPlite; PerkinElmer, Groningen, The Netherlands)により測定した。胚盤胞を、POE-CM 中で3回洗浄し、1.5 ml チューブに入れた 50  $\mu$ l PBS 中に1個ずつ移し、測定まで-30°Cで保存した。ATP 含量の測定は、細胞溶解剤をそれぞれのチューブに 25  $\mu$ l ずつ加えて5分間混合した後、試料 30  $\mu$ l と基質液(ルシフェラーゼ/ルシフェリン)10  $\mu$ l を 384 穴プレートのウェルに加えた。プレートを5分間振盪後、室温遮光下で10分間静置した。発光強度をルミノメーター(Wallac 1420 ARVO MX; PerkinElmer)を用いて測定し、0~1000 nM ATP の検量線から ATP 含量を算出した。全ての標準液および試料は2回ずつ測定を行った。

#### 5) 実験デザイン

##### (1) グルコースが胚盤胞の生存性と孵化に及ぼす影響

グルコースを0, 2.5, 5, および 10 mM 添加した PZM-5、50  $\mu$ l で、媒精後5日目の胚盤胞を12~15個ずつ48時間培養した。媒精後7日目に胚を実体顕微鏡下で観察し、生存、部分孵化、または完全孵化した胚盤胞数を計数した。明瞭な胚盤胞腔を有する胚盤胞を生存胚盤胞とし、透明帯から脱出途上、または脱出した胚盤胞をそれぞれ部分孵化、または完全孵化胚盤胞とした。

##### (2) グリシンが胚盤胞の生存性と孵化に及ぼす影響

5mM グルコース添加あるいは無添加の PZM-5 に、グリシンを0, 5, 10, および 20 mM 添加した PZM-5、50  $\mu$ l で、媒精後5日目の胚盤胞を12~15個ずつ48時間培養した。媒精後7日目に胚を実体顕微鏡下で観察し、生存、部分孵化、または完全孵化した胚盤胞数を計数した。

##### (3) 胚盤胞の生存性と孵化に及ぼすグルコースおよびグリシンの相乗作用

PZM-5 および 5 mM グルコース、10 mM グリシンの一方あるいは両方を添加した PZM-5 で、媒精後 5 日目の胚盤胞を 3 日間培養した。媒精後 6~8 日目に胚を実体顕微鏡下で観察し、生存、部分孵化、または完全孵化した胚盤胞数を計数した。また、媒精後 8 日目の生存胚盤胞の総細胞数を、第 2 章 5) に記述した方法で計数した。

#### (4) 胚盤胞の直径と ATP 含量に及ぼすグルコースおよびグリシンの影響

PZM-5 および 5 mM グルコース、10 mM グリシンの一方あるいは両方を添加した PZM-5 で、媒精後 5 日目の胚盤胞を 24 時間培養した。媒精後 6 日目の胚盤胞は、直径を測定後、ATP 含量の測定に使用した。

#### (5) 胚盤胞の細胞数とアポトーシス指数に及ぼすグルコースおよびグリシンの影響

PZM-5 および 5 mM グルコース、10 mM グリシンの一方あるいは両方を添加した PZM-5 で、媒精後 5 日目の胚盤胞を 24 時間培養した。媒精後 6 日目の胚盤胞は、TUNEL 法を用いた同時染色により総細胞数とアポトーシス細胞数を測定した。

### 6) 統計処理

統計処理には StatView ver. 5.0 (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA) を使用した。多重比較検定として Tukey-Kramer の HSD 検定を行った。パーセント値および胚盤胞の総細胞数は、アークサイン変換および対数変換して検定を行った。危険率 5% 未満の場合は、統計学的に有意な差があると判定した。

### 3. 結果

#### 1) 受精率および胚発生率

本章における受精率は 60.6%であり、正常受精率は 44.8%、多精子受精率は 14.0%だった。計 11169 個の胚を PZM-5 で培養したところ、媒精後 2 日目に卵割した胚数は 6029 個(54.0%)で、媒精後 5 日目に胚盤胞に達した胚数は、2294 個(20.5%)であった。

#### 2) グルコースの濃度が胚盤胞の生存性と孵化に及ぼす影響

グルコース 2.5~10 mM を添加した PZM-5 で 2 日間培養した胚盤胞の生存率は、無添加で培養した胚盤胞に比べて有意に高かった(図 4-1)。特に、グルコースを 5 mM の濃度で添加した時に、胚盤胞の生存率が最も高くなった。しかし、部分孵化および完全孵化胚盤胞の割合(孵化率)にグルコース無添加で発生培養した胚盤胞との差は認められなかった。この結果から、胚盤胞の生存に有効なグルコースの濃度は 5 mM であると判断し、以降の試験でのグルコース添加濃度は 5 mM を用いた。

#### 3) グリシンの濃度が胚盤胞の生存性と孵化に及ぼす影響

グルコース無添加の PZM-5 で発生培養した胚盤胞では、添加したグリシンの濃度によらず生存率および孵化率に差は認められなかった(図 4-2a)。グルコースを添加した場合、5 mM または 10 mM グリシンを添加して発生培養した胚盤胞の孵化率は、グリシン無添加の場合に比べて有意に高かった( $P < 0.05$ ; 図 4-2b)。特に、グリシンを 10 mM の濃度で添加した時に、胚盤胞の孵化率が最も高くなり、胚盤胞の孵化に有効なグリシンの濃度は 10 mM であると判断し、以降の試験でのグリシン添加濃度は 10 mM を用いた。

#### 4) 胚盤胞の生存性と孵化におけるグルコースおよびグリシンの相乗作用

グルコースとグリシンの両方を添加した PZM-5 で培養した胚盤胞の孵化率は、無添加またはどちらか一方だけを添加した場合と比べて有意に高く( $P < 0.05$ ; 図 4-3)、媒精後 7 日目および 8 日目の胚盤胞の完全孵化率が有意に高かった( $P < 0.05$ )。媒精後 8 日目の胚盤胞の生存率は、グルコースを添

加して培養すると、無添加に比べて有意に高かった( $P < 0.05$ ; 図 4-3d)が、グルコースとグリシンの相乗作用は認められなかった。媒精後8日目の生存胚盤胞の総細胞数は、グルコースとグリシンの両方を添加して培養すると、無添加あるいはグリシンのみ添加して培養した胚盤胞に比べて有意に多かった( $P < 0.05$ )。

#### 5) 胚盤胞の直径と ATP 含量に及ぼすグルコースおよびグリシンの影響

グルコースとグリシンの両方を添加した PZM-5 で 1 日間発生培養した胚盤胞の直径は、無添加で培養した胚盤胞に比べて有意に大きかった( $P < 0.05$ ; 表 4-1)。グルコースを添加して培養した胚盤胞の ATP 含量は、グリシンの有無に関わらず、グルコース無添加で培養した胚盤胞に比べて有意に多かった( $P < 0.05$ )。

#### 6) 胚盤胞の細胞数とアポトーシス指数に及ぼすグルコースおよびグリシンの影響

グルコースとグリシンの両方を添加した PZM-5 で 1 日間発生培養した胚盤胞の総細胞数は、無添加あるいはグリシンのみ添加して培養した胚盤胞に比べて有意に多かった( $P < 0.05$ ; 表 4-2)。また、グルコースとグリシンの両方を添加して培養した胚盤胞のアポトーシス指数は、無添加あるいはグリシンのみの添加に比べて有意に低かった( $P < 0.05$ )。

#### 4. 考察

本章では、PZM-5 にグルコースを添加すると、胚盤胞の生存性が向上することを明らかにした。さらに、グルコースとグリシンは相乗的に胚盤胞の孵化を促進するとともに、胚盤胞の直径および総細胞数を増加させ、アポトーシス指数により評価される胚盤胞の品質を改善することを明らかにした。

PZM-5 にグルコースを添加して胚盤胞を培養すると胚盤胞の生存率および ATP 含量が増加したが、グリシンを添加して胚盤胞を培養しても胚盤胞の生存率および ATP 含量に変化は見られなかった(図 4-1, 4-2, 表 4-1)。PZM-5 にはエネルギー基質としてピルビン酸と乳酸が含まれており、グルコースは含まれていない(Yoshioka *et al.*, 2008)。ピルビン酸と乳酸はブタの卵割初期胚において重要なエネルギー源であり(Wright, 1977; Davis and Day, 1978)、受精後の胚を PZM-5 で培養することで胚盤胞まで発生させることができる。しかし、ピルビン酸と乳酸を含む発生培地で終始ブタ胚を培養した場合に比べて、媒精後 2 日(4 細胞期)以降にグルコースを含む培地で培養すると、胚盤胞への発生および胚盤胞の総細胞数が増加する(Kikuchi *et al.*, 2002b; Karja *et al.*, 2004)。逆に、媒精後 2 日まで発生培地中にグルコースが存在すると胚盤胞への発生が阻害され、胚盤胞の総細胞数が減少する(Karja *et al.*, 2006)。ブタ胚では、グルコース代謝の最初の増加は、発生制御が母性因子から胚性遺伝子の活性化へと切り替わる 4 細胞期に起こるとされている(Telford *et al.*, 1990; Rieger, 1992)。一方、ブタ胚におけるグルコースの代謝量は、卵割初期では低く、桑実胚期で増加し、胚盤胞期にピークに達する(Flood and Wiebold, 1988; Sturmey and Leese, 2003)。8 細胞期から胚盤胞期のブタ胚におけるグルコース代謝は主に解糖系を通して行われる(Flood and Wiebold, 1988)。胚盤胞の内部細胞塊では、細胞内へグルコースを輸送するグルコーストランスポーター、Glut1 および Glut3 の発現が高いため、グルコースの取り込み能が高く、解糖系の代謝流束が高い(Leese and Barton, 1984; Pantaleon and Kaye, 1998)。また、胚盤胞では解糖系だけでなく、酸素消費量が増加し、ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化の活性が高まる(Brinster, 1974)。解糖系と酸化的リン酸化では、1 分子のグルコースからそれぞれ 2 分子と 36 分子の ATP が生成される。ATP は活発に代謝を行っている細胞に存在し、その濃度は細胞がネクロ

ーシスまたはアポトーシスを起こした時に急速に減少するため、細胞の生存性の目印となる。また、ATP 産生の増加は、エネルギー要求性の増加と一致しており (MacPhee *et al.*, 1994)、胚盤胞形成とその後の胚発生では、タンパク質合成量が増加し (Thompson *et al.*, 1998)、胚盤胞腔を形成する  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase 活性が増加する (Watson, 1992) ため、多量のエネルギーを必要とすると考えられる。胚盤胞期においてグルコースの要求性および代謝能が高まったため、グルコースを添加して培養することで胚盤胞の生存性と ATP 含量が増加したと考えられる。一方、グリシンはグルタチオンの前駆体であり、酸化還元電位の維持やエネルギー代謝に関与するが、本研究においてグリシンの添加は ATP 含量には影響しなかった。したがって、ブタ胚盤胞の主要なエネルギー源はグルコースであることが示された。

本研究では、PZM-5 にグルコースとグリシンを添加して胚盤胞を培養すると、無添加の場合と比較して、胚盤胞の直径、総細胞数、および孵化率が増加することを明らかにした (図 4-2, 4-3, 表 4-1, 4-2)。グリシンは、ブタの卵管液と子宮液中のアミノ酸で最も多く含まれており、発情後 3~5 日のブタの子宮液中には 3.8~5.4 mM の濃度で含まれている (Li *et al.*, 2007)。ブタ胚を卵管細胞と共培養した場合、1 mM または 5 mM のグリシンを添加すると、卵割率および 8~16 細胞期への発生が向上する (Xia *et al.*, 1995)。また、ウシでは、発生培地に 10 mM のグリシンを添加して胚を培養すると胚盤胞への発生を促進し (Moore and Bondioli, 1993; Lee and Fukui, 1996)、胚盤胞あたりの総細胞数が増加する (Takahashi and Kanagawa, 1998) と報告されている。本研究で使用した PZM-5 には、グルタミンの他、Eagle (1959) が考案した濃度の 12 種類の必須アミノ酸と 7 種類の非必須アミノ酸の全 20 種類の  $\alpha$ -アミノ酸が含まれているが、これらのアミノ酸濃度は線維芽細胞の培養に適した濃度であり、胚に適した濃度ではないと考えられる。実際に、PZM-5 中のグリシン濃度は 0.1 mM (Suzuki and Yoshioka, 2006) と子宮液の濃度に比べて低い。これらの結果から、高濃度 (10 mM) のグリシンを添加することによって、正常な胚発生や孵化に適したグリシン濃度になったと推察された。また、マウスの胚盤胞において、グリシンはセリン (5%) とアラニン (17%) に変換され、タンパク質や核酸といった高分子合成の前駆物質として利用される可能性が示されている (Hobbs and Kaye, 1985)。したがって、グリシンを添加することで、グリシン以外のアミノ酸濃度が適正化されるとともに、タンパク質や核酸などの合成に利用され、胚盤胞の細胞数が増加し、孵化

が促進された可能性が考えられた。

本研究では、PZM-5 にグルコースとグリシンを添加して胚盤胞を培養すると、無添加と比較して、胚盤胞の総細胞数が増加し、アポトーシス細胞の出現頻度が減少することを明らかにした(表 4-2)。アポトーシス細胞の出現頻度は、胚の品質の指標として役立つ(Opiela, 2009)。アポトーシスは、正常な胚発生の過程において自然に起こり、損傷細胞や異常細胞あるいは発生不能な細胞を除去することによって胚盤胞における細胞の品質を維持している。生体内で発生した胚盤胞におけるアポトーシス細胞の出現頻度は、体外生産胚より有意に少ないと報告されている(Long *et al.*, 1998; Bryla *et al.*, 2009)。グリシンは、類洞内皮細胞においてアポトーシスによる細胞死から防御する働きをする(Zhang *et al.*, 2000)ことから、本研究においてもグリシンが胚盤胞のアポトーシスを抑制した可能性がある。また、活性酸素種は脂質の過酸化による細胞膜への障害(Aitken *et al.*, 1989)や DNA の損傷(Halliwell and Aruoma, 1991)を引き起こし、胚発生を阻害する(Nasr-Esfahani *et al.*, 1990)が、グルタチオンが抗酸化作用により活性酸素種から細胞を保護する役割を担う(Kosower and Kosower, 1978)。グリシンはグルタチオンの前駆物質であり、グルタチオンの産生に関与する(Griffith, 1999)ことから、グリシンを添加することにより酸化ストレスから胚が保護された可能性も考えられた。

一方、グルコースが存在しない場合、グリシンはアポトーシス細胞の出現頻度を抑制せず、胚盤胞の発生も促進しなかった(図 4-2, 4-3, 表 4-2)。エネルギー源であるグルコースが培地中に存在する場合のみ、グリシンの効果が発揮された可能性がある。また、PZM-5 にグルコースとグリシンを添加すると、培地の浸透圧は約 300 mOsm となり、元の PZM-5 の浸透圧 283~284 mOsm(表 2-1, Yoshioka *et al.*, 2008)に比べて高くなった。培地の浸透圧は、胚発生において重要な要因の一つである。ブタ卵管液および子宮液の浸透圧は 293~321 mOsm(Li *et al.*, 2007)で、PZM-5 と比較して高い。生体内において高浸透圧でも胚が生存できる理由として、グリシンやグルタミンのようなアミノ酸が浸透圧調節物質として作用し、胚を保護していると考えられている(Dawson and Baltz, 1997; Biggers *et al.*, 1993)。マウスでは、1 細胞期および 2 細胞期胚をグリシン添加培地で培養すると、グリシンが外部の高浸透圧から胚を保護し、正常な細胞体積の維持に寄与する(Dawson *et al.*, 1998; Steeves *et al.*, 2003; Tartia *et al.*, 2009)。これらの結果から、グルコース

存在下の高濃度のグリシンは、胚盤胞の細胞内浸透圧調節物質として機能し、細胞の収縮を妨げるとともに、培地の高浸透圧ストレスから胚を保護している可能性が考えられた。

本章では、媒精後 5 日目以降、グルコースとグリシンを添加した PZM-5 で胚盤胞を培養すると、胚盤胞の発生および生存細胞数を指標とした胚の品質が相乗的に向上することを明らかにした。PZM-5 に 5 mM グルコースと 10 mM グリシンを添加した発生培地は、porcine blastocyst medium (PBM) と命名した。

## 5. 小括

本章では、グルコースとグリシンがブタ胚盤胞の生存性と孵化、ATP 含量、直径、総細胞数、およびアポトーシス細胞の出現頻度に及ぼす影響を検討した。

成分既知の発生培地である PZM-5 にグルコースを添加して媒精後 5 日目の胚盤胞を培養したところ、胚盤胞の生存率および ATP 含量は、無添加に比べて増加した。また、PZM-5 にグルコースとグリシンを添加して胚盤胞を培養したところ、無添加で培養した胚盤胞に比べて、胚盤胞の孵化率、直径および総細胞数が増加し、アポトーシス出現頻度は低下した。

以上の結果から、グルコースとグリシンは相乗的にブタ胚盤胞の発生を促進し、胚盤胞における生存細胞数を指標とした胚の品質を改善することが示唆された。

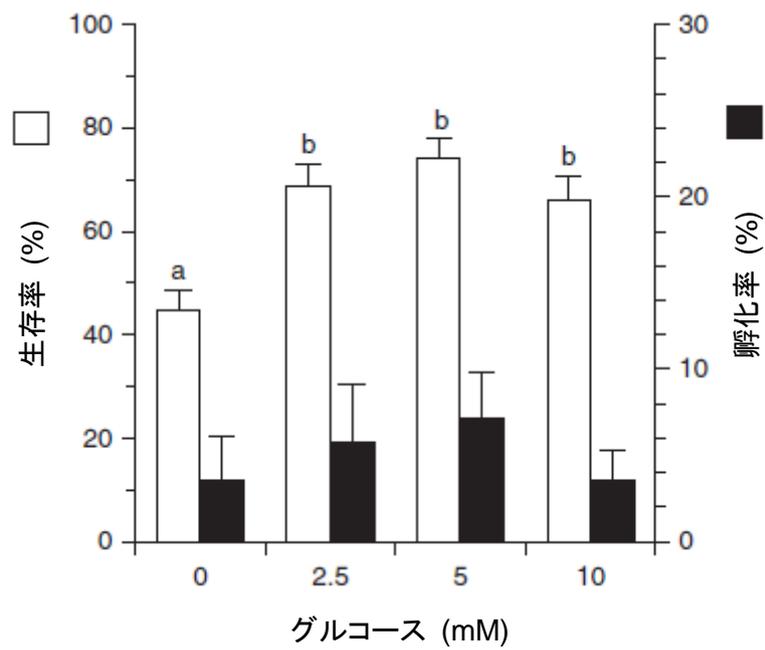


図 4-1 胚盤胞の生存率および孵化率におけるグルコースの作用  
 データは 6 回の繰り返し実験による平均値と標準誤差を示す。  
 同一項目内の異なる文字間に有意差あり ( $P < 0.05$ )。

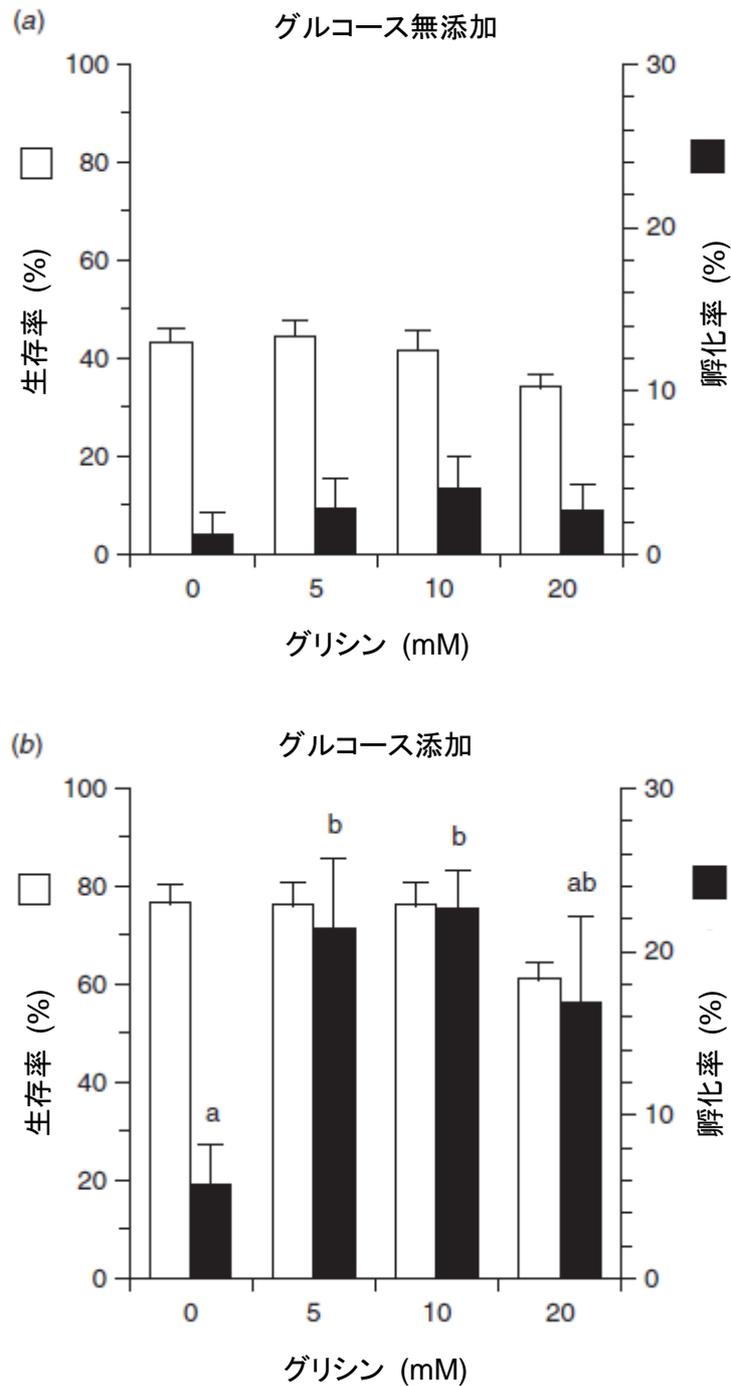


図 4-2 胚盤胞の生存率および孵化率におけるグリシンの作用  
 (a) グルコース無添加, (b) グルコース添加 PZM-5  
 データは 6~7 回の繰り返し実験による平均値と標準誤差を示す。  
 同一項目内の異なる文字間に有意差あり ( $P < 0.05$ ).

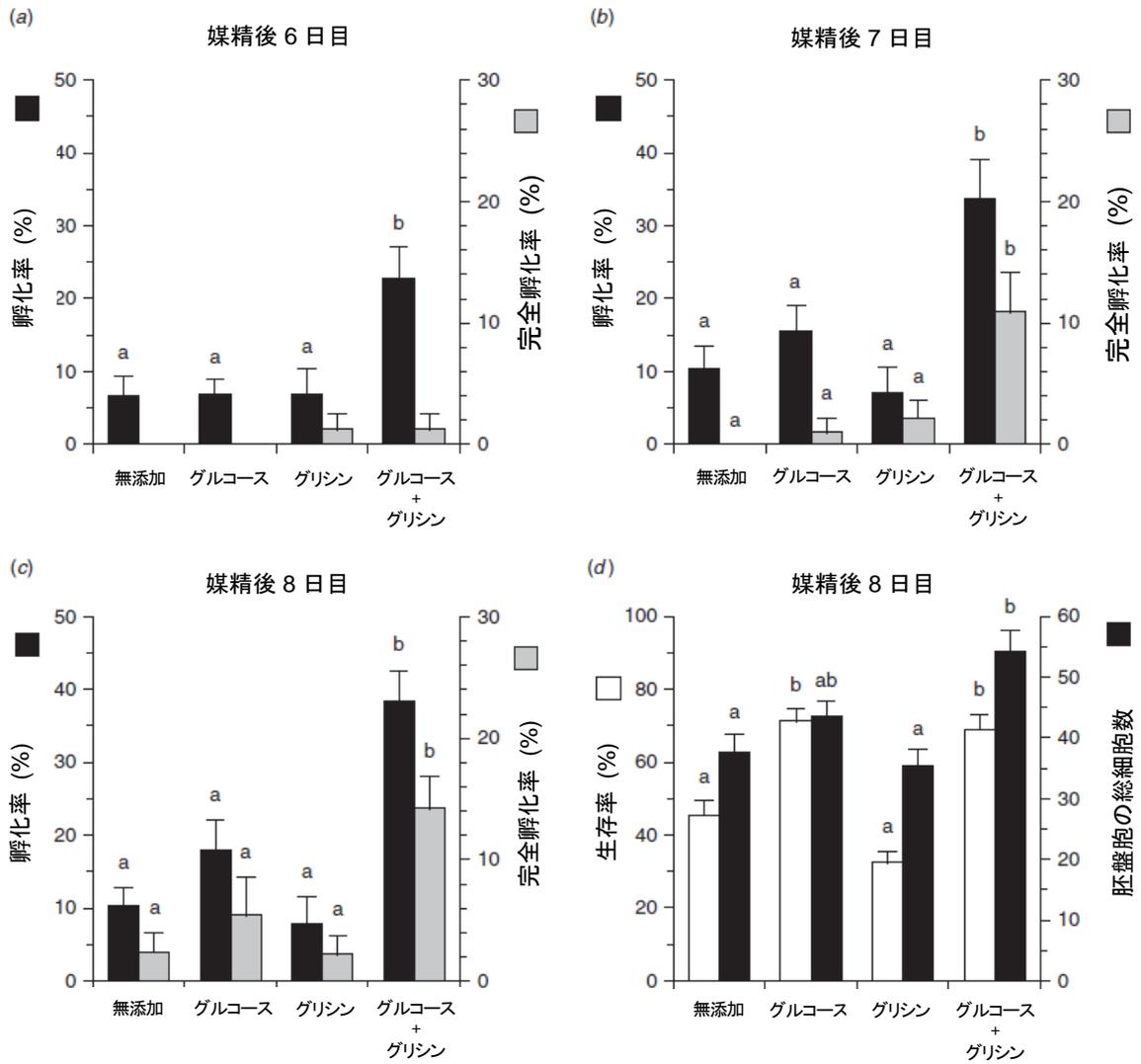


図 4-3 胚盤胞の生存率および孵化率におけるグルコースおよびグリシンの作用  
 データは 7 回の繰り返し実験による平均値と標準誤差を示す。  
 同一項目内の異なる文字間に有意差あり ( $P < 0.05$ )。

表 4-1 胚盤胞の直径と ATP 含量におけるグルコースおよびグリシンの作用

処理区	供試胚数	胚盤胞の直径( $\mu\text{m}$ )	胚盤胞の ATP 含量 ( $\text{pmol/embryo}$ )
無添加	60	$167.9 \pm 32.2^{\text{a}}$	$0.273 \pm 0.260^{\text{a}}$
グルコース	60	$171.6 \pm 33.7^{\text{ab}}$	$0.635 \pm 0.375^{\text{b}}$
グリシン	60	$180.6 \pm 34.5^{\text{ab}}$	$0.251 \pm 0.185^{\text{a}}$
グルコース+グリシン	60	$187.7 \pm 41.5^{\text{b}}$	$0.680 \pm 0.437^{\text{b}}$

4回の繰り返し実験による平均値 $\pm$ 標準誤差を示す.

<sup>a,b</sup>同一列間の異なる文字間に有意差あり( $P < 0.05$ ).

表 4-2 胚盤胞の総細胞数とアポトーシス指数におけるグルコースおよびグリシンの作用

処理区	供試胚数	胚盤胞の細胞数	アポトーシス指数(%)
無添加	20	39.8 ± 19.0 <sup>a</sup>	15.7 ± 8.4 <sup>a</sup>
グルコース	20	48.0 ± 20.2 <sup>ab</sup>	12.4 ± 9.2 <sup>ab</sup>
グリシン	20	37.9 ± 18.6 <sup>a</sup>	16.8 ± 10.4 <sup>a</sup>
グルコース+グリシン	20	58.6 ± 21.2 <sup>b</sup>	7.0 ± 4.2 <sup>b</sup>

2回の繰り返し実験による平均値±標準誤差を示す.

<sup>a,b</sup>同一列間の異なる文字間に有意差あり(P < 0.05).

## 第5章 成分既知ガラス化保存液を用いたブタ胚のガラス化保存

### 1. 緒言

ブタ胚の有効利用には、胚移植における時間的・地理的制約を無くすことができる超低温保存技術が重要である。ブタ胚の超低温保存技術は、畜産現場への胚移植の普及に貢献し、種豚更新にかかる費用を大幅に削減できるうえ、感染症防止および清浄化に貢献するほか、優良な遺伝子資源の長期保存が可能となる。一方、体外生産胚の超低温保存は、体内発育胚に比べると難しく (Greve and Callesen, 2004)、これは培養条件が不適切であることが要因であると考えられる。超低温保存後のブタ胚の生存性には、胚の発生ステージ (Nagashima *et al.*, 1989; 1992; Dobrinsky, 2001)、胚日齢 (Dobrinsky and Johnson, 1994)、培養培地 (Men *et al.*, 2005)、凍結保存液の組成 (Berthelot *et al.*, 2000; Dobrinsky, 1997)をはじめ、様々な要因が影響する。たとえば、発生培地に血清を添加してブタ胚を培養すると、胚盤胞の細胞数が増加し、ガラス化保存後の生存性が向上したと報告されている (Men *et al.*, 2005)。また、孵化直前または孵化後の胚盤胞は耐凍性が比較的高く、緩慢凍結法による保存が可能である (Berthelot *et al.*, 2003)が、桑実胚や初期胚盤胞は緩慢凍結では生存できない (Dobrinsky, 1997)。そこで現在、ブタ胚の有効な超低温保存法として高濃度の凍結保護物質とともに急速に凍結するガラス化保存法が利用されているが、依然として体外生産胚の耐凍性は低く、耐凍性を向上させる培養条件は明らかにされていない。

また、ブタ胚のガラス化保存および加温に用いる基本液は、一般に高濃度の血清あるいは血清成分を含んでおり、これらは凍結時の細胞膜を保護している可能性がある (Leibo, 1988)。しかし、総説でも述べたように、未知の因子を多く含み、病気の伝染を媒介する可能性が指摘されている (Thibier and Nibart, 1987; Wrathall, 1995; Guérin *et al.*, 1997)。したがって、成分既知のガラス化保存液の使用は、これらの問題を軽減し、さらには結果の信頼性と再現性を改善するものと期待されている (Sanchez-Osorio *et al.*, 2010)。Misumi *et al.* (2013)は最近、PZM-5を基本液とした凍結液を用いて胚をガラス化保存し、子豚の作出に初めて成功した。しかし、Misumi *et al.* (2013)は、体内発育胚を用いており、体外生産胚を成分既知のガラス化液で保存後に子豚を得たという

報告はない。

本章では、第 4 章で開発した成分既知の発生培地 PBM をガラス化保存および加温に用いる基本液とし、胚の発生培地 (PZM-5 または PBM)、胚の発生ステージ (胚盤胞または拡張胚盤胞)、および培養日数 (媒精後 5 日または 6 日の発生培養) の違いが、胚のガラス化保存後の生存性に及ぼす影響について検討した。さらに、成分既知のガラス化保存液と加温液を用いて作製したガラス化保存・加温胚の正常性を調べるため、胚移植を行い、産子への発育能を調べた。

## 2. 材料および方法

### 1) 成熟培養、媒精および発生培養

第2章1)に準じて採取したCOCsは、10 IU/ml eCG、10 IU/ml hCG、10 ng/ml TGF- $\alpha$ 、および1 mM dbcAMPを添加したPOMで成熟培養開始20時間目まで培養し、その後24時間はホルモンとdbcAMPを添加しない培地で培養した。成熟培養後のCOCsは、第3章1)と同様の方法で媒精し、PZM-5で4~5日間培養した。

### 2) 胚のガラス化保存および融解

胚のガラス化は、クライオトップ法(Kuwayama *et al.*, 2005)を用いて行った。ガラス化および加温の基本液には、20 mM HEPES 緩衝PBM(pH 7.3)を使用した。平衡液とガラス化液は38°Cで使用した。胚盤胞を7~11個ずつ、1次平衡液(1.8 Mエチレングリコール(EG; Amresco, Solon, OH, USA))および2次平衡液(1.8 M EG、0.3 Mトレハロース(Tre; Hayashibara, Okayama, Japan)、1% (w/v)ポリエチレングリコール(PEG; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan))で各5分間処理した後、1分以内にガラス化液(6 M EG、0.6 M Tre、2% (w/v) PEG)で処理し、クライオトップ(Kitazato BioPharma, Shizuoka, Japan)に乗せて液体窒素に浸漬しガラス化保存した。

ガラス化胚の融解は、38°Cの加温・希釈液(1.8 M EG、0.3 M Tre)にクライオトップの先端を直接投入し、胚を遊離させて3分間処理することで行った。融解後の胚は、10% (v/v)ウシ胎児血清(Asahi Techno Glass, Shizuoka, Japan)を添加したPBMの50  $\mu$ lドロップ中で48時間培養し、生存率および孵化率を実体顕微鏡下で観察し調べた。培養後、胚盤胞腔を再形成したものを生存胚とした。

### 3) 実験デザイン

#### (1) 媒精後5日目胚の耐凍性における発生ステージおよび培地の影響

媒精後4日目から1日間PZM-5あるいはPBM(表5-1)で培養した、媒精後5日目の胚盤胞あるいは拡張胚盤胞をガラス化保存した。ガラス化保存胚は融解後、培養24時間後と48時間後に

生存率および孵化率を調べた。

#### (2) 媒精後 6 日目胚の耐凍性における発生ステージおよび培地の影響

媒精後 5 日目から 1 日間 PZM-5 あるいは PBM で培養した、媒精後 6 日目の胚盤胞あるいは拡張胚盤胞をガラス化保存した。ガラス化保存胚は融解後、培養 24 時間後と 48 時間後に生存率および孵化率を調べた。

#### (3) 胚の耐凍性に対する胚日齢の影響

媒精後 4 日目あるいは 5 日目から 1 日または 2 日間 PBM で培養した、媒精後 5 日目あるいは 6 日目の胚盤胞と拡張胚盤胞をガラス化保存した。ガラス化保存胚は融解後、培養 24 時間後と 48 時間後に生存率および孵化率を調べた。

#### (4) 成分既知ガラス化保存液を用いてガラス化保存した胚の産子への発生能

受胚豚は、ランドレース種 6 頭(6.5 ヶ月齢、体重 113~130 kg)を使用した。受胚豚の黄体退行および排卵の誘起は、第 2 章 7) の方法に準じて行った。媒精後 4 日目あるいは 5 日目から 1 日間 PBM で培養した、媒精後 5 日目あるいは 6 日目の拡張胚盤胞をガラス化保存した。ガラス化保存胚は融解後、1 頭あたり 30 個ずつ、hCG 投与後 5 日目あるいは 6 日目に、各 3 頭の受胚豚の子宮へ外科的に移植した。

#### 4) 統計処理

統計処理には、Statistical Analysis System (SAS Institute, Cary NC, USA) の一般化線形モデル (GLM) を使用した。ガラス化融解胚の生存率および孵化率に対する胚の発生培地、発生ステージおよび両要因の交互作用の影響は、二元配置分散分析により検定を行った。胚の耐凍性に対する胚日齢の影響は、一元配置分散分析により検定を行った。分散分析により有意な効果が認められた場合には、多重比較検定として Tukey-Kramer の HSD 検定を行った。ガラス化融解胚の生存率および孵化率は、アークサイン変換して検定を行った。移植胚数に対する産子数の割合 (子豚生

産率)と妊娠率における差の解析は、Fisherの正確確率検定によって行った。子豚の生時体重の統計的比較は、等分散検定の後にStudentのt検定により行った。危険率5%未満の場合は、統計学的に有意な差があると判定した。

### 3. 結果

#### 1) 受精率および胚発生率

本章における受精率は 86.5%であり、正常受精率は 54.7%、多精子受精率は 30.9%だった。計 8828 個の胚を PZM-5 で培養したところ、媒精後 2 日目に卵割した胚数は 5408 個(64.9%)で、媒精後 5 日目および 6 日目に胚盤胞あるいは拡張胚盤胞に達した胚(図 5-1a)の数は、それぞれ 868 個(20.2%)および 1189 個(25.7%)であった。

#### 2) 媒精後 5 日目胚の耐凍性における発生ステージおよび培地の影響

ガラス化胚は融解直後に収縮したが(図 5-1b)、48 時間培養後には再拡張して発育した(図 5-1c)。媒精後 5 日目に拡張胚盤胞をガラス化したところ、融解後 48 時間培養後の生存率( $P < 0.01$ )および孵化率( $P < 0.001$ )は、胚盤胞をガラス化した場合に比べて高かった(表 5-2)。媒精後 4 日目から 1 日間 PZM-5 あるいは PBM で培養した胚盤胞と拡張胚盤胞をガラス化したところ、融解後 48 時間培養後の生存率および孵化率は、培地間で差を認めなかった。

#### 3) 媒精後 6 日目胚の耐凍性における発生ステージおよび培地の影響

媒精後 6 日目に拡張胚盤胞をガラス化したところ、融解後 48 時間培養後の生存率および孵化率は、胚盤胞をガラス化した場合に比べて高かった( $P < 0.001$ ; 表 5-3)。媒精後 5 日目から PZM-5 あるいは PBM で 1 日間培養した胚盤胞と拡張胚盤胞をガラス化したところ、融解後 48 時間培養後の生存率および孵化率は、PBM で培養すると PZM-5 で培養した胚に比べて有意に高かった( $P < 0.001$ )。

#### 4) 胚の耐凍性に対する胚日齢の影響

胚の耐凍性における培養日数の影響を明らかにするため、媒精後 4 日目から 1 日および 2 日間、あるいは 5 日目から 1 日間 PBM で培養した胚盤胞と拡張胚盤胞をガラス化したところ、融解後 48 時間培養後の生存率および孵化率は、培養日数と PBM での培養期間による差を認めなかった(表

5-4)。

5) 成分既知ガラス化保存液を用いてガラス化保存した胚の産子への発生能

媒精後 5 日目の拡張胚盤胞をガラス化・融解し 3 頭の受胚豚へ移植したところ、全頭が妊娠・分娩し、合計 14 頭の子豚を得た(表 5-5)。一方、媒精後 6 日目の拡張胚盤胞をガラス化・融解し 3 頭の受胚豚へ移植したところ、3 頭中 1 頭が妊娠・分娩し、4 頭の子豚を得た。媒精後 5 日目胚の移植による子豚生産率は、6 日目胚を移植した場合に比べて高かった( $P < 0.05$ )。妊娠期間および産子の生時体重はいずれも正常範囲内であり、全ての子豚は正常に成長した。

#### 4. 考察

本章の結果から、体外生産したブタの拡張胚盤胞の耐凍性は胚盤胞より高いことを明らかにした。また、媒精後 5 日目から 1 日間 PBM で培養すると、胚の耐凍性が向上した。さらに、体外生産した拡張胚盤胞を、成分既知の平衡液、ガラス化液、および加温液を用いてガラス化・融解し、受胚豚の子宮に移植することにより、正常な子豚を得ることに成功した。

体外生産胚において、拡張胚盤胞のガラス化・融解後の生存率および孵化率は、胚盤胞に比べて高かった(表 5-2, 5-3)。同様の結果はブタの体内発育胚でも得られており、孵化前後の胚が最も高い耐凍性を示し(Nagashima *et al.*, 1989; 1992)、桑実胚や初期胚盤胞は拡張胚盤胞に比べて耐凍性が低いと報告されている(Nagashima *et al.*, 1992; Cuello *et al.*, 2004)。ブタ胚は低温感受性がかかなり高い(Wilmot, 1974; Polge *et al.*, 1974)。Nagashima *et al.*(1994, 1995)は、遠心と顕微操作によって胚の脂肪顆粒を除去し脂質含量を減少させると、胚の低温感受性が低下し、凍結保存後の生存性が改善すると報告した。ブタの胚は他の哺乳動物種の胚に比べて細胞質に多量の脂質を含んでいる(McEvoy *et al.*, 2000; Sturmey and Leese, 2003)。初期胚に存在する脂肪滴は多量で大きい、胚盤胞期以降の胚は発生が進むのに伴い、脂肪滴の数とサイズは徐々に減少する(Norberg, 1973; Kikuchi *et al.*, 2002a)。したがって、胚発生に伴って脂質含量が減少したため、胚盤胞に比べて拡張胚盤胞の耐凍性が高かったと考えられる。

媒精後 5 日目から 1 日間 PBM で胚を培養すると、胚の耐凍性が向上した(表 5-3)。一般に、体外生産胚は同時期の体内発育胚に比べて耐凍性が低いことが知られている(Pollard and Leibo, 1994)。体外生産胚は体内発育胚と比較して、アクチンフィラメントの分布が異なることや、フラグメンテーションを起こしている割球の割合が高いほか、胚盤胞の栄養膜細胞に対する内部細胞塊の割合が低く、胚盤胞の総細胞数が少ないなどの異常が認められ(Wang *et al.*, 1999)、このような胚の異常が発生能だけでなく耐凍性にも影響している可能性が示唆されている(Men *et al.*, 2005)。体外生産胚の異常は、卵母細胞や胚の不適切な培養条件が原因の一つであると考えられている(Wang *et al.*, 1999)。発生培地に血清を添加してブタ胚を培養すると、胚盤胞の細胞数が増加し、ガラス化保存後の生存性が向上したと報告されている(Men *et al.*, 2005)。第 4 章において、

PZM-5 にグルコースとグリシンを添加して胚盤胞を培養すると、胚盤胞の生存率、孵化率、直径、および総細胞数が増加し、アポトーシス出現頻度が抑制されることを明らかにした。また、グリシンは細胞内浸透圧調節作用により、ガラス化保存による脱水や融解による復水の浸透圧ストレスから卵子を保護する可能性が示されている(Cao *et al.*, 2016)。したがって、グルコースとグリシンを添加して培養することで、胚盤胞における生存細胞数を指標とした胚の品質が改良されるとともに、グリシンの細胞内浸透圧調節作用により浸透圧ストレスから胚が保護され、耐凍性が向上したと推察される。一方、媒精後 4 日目から 1 日間 PBM で培養しても、胚の耐凍性は改善しなかった(表 5-2)。PZM-5 は、ブタ胚の卵割初期におけるエネルギー基質として重要なピルビン酸と乳酸を含み、胚盤胞への発生を促進する(Suzuki and Yoshioka, 2006; Yoshioka *et al.*, 2002)。ブタ胚のグルコースの消費量は、卵割初期では低く、桑実胚期でわずかに増加し、胚盤胞期にピークに達する(Sturme y and Leese, 2003)。本研究で用いた培養系では、主に媒精後 4 日目で桑実胚期、5 日目に胚盤胞期、6 日目に拡張胚盤胞へと発生する。したがって、媒精後 4 日目から 1 日間 PBM で培養しても、桑実胚におけるグルコースの代謝能が胚盤胞に比べて高くないため、耐凍性を改善しなかったと推察される。

本研究において、体外生産した胚拡張胚盤胞を、成分既知の平衡液、ガラス化液、および加温液を用いてガラス化保存・融解し、受胚豚の子宮に移植することで正常な産子が得られた(表 5-5)。既往研究でも、体外生産胚をガラス化保存し移植することで、子豚が誕生したことが報告されている(Nagashima *et al.*, 2007; Maehara *et al.*, 2012; Men *et al.*, 2011)。しかし、これらの既往研究では、平衡液、ガラス化液、および加温液に高濃度(20%(v/v))の血清が含まれている。したがって、体外生産胚において、成分既知のガラス化液および加温液を用いてガラス化保存・融解後に移植することにより、初めて子豚を得ることに成功した。胚のガラス化保存に成分既知液を使用することで、血清中の未知成分による影響を除外し、結果の信頼性と再現性を高めるうえ、疾病伝播のリスクを軽減させることができる(Sanchez-Osorio *et al.*, 2010)。Misumi *et al.*(2013)は、ガラス化液の基本液として成分既知培地である PZM-5 を使用してガラス化保存した体内発育胚を移植した時の子豚生産率は、12.5~13.6 %であったと報告した。本章において、媒精後 5 日目の拡張胚盤胞をガラス化保存して移植した時の子豚生産率は 15.6 %で、Misumi *et al.*(2013)の報告と同等であ

った。一方、媒精後 6 日目の拡張胚盤胞をガラス化保存して移植した時の子豚生産率は 4.4 %で、媒精後 5 日目の胚を移植した場合よりも低かった。ガラス化・融解後の胚の体外培養での生存性には、媒精後 4 日目から PBM で培養した 5 日目胚と媒精後 5 日目から PBM で培養した 6 日目胚の間に有意差はなかった(表 5-4)。しかし、産子作出の検討は培養胚の正常性を調べるための最も明白な試験である(Bavister, 1995)。これらの結果から、媒精後 4~5 日目に PZM-5 で胚を培養した場合に比べて、PBM で培養すると胚の品質と産子までの生存性が高まると示唆された。さらに、胚の長期間の体外培養は、膜を構成する脂質の酸化のため、膜の流動性および透過性が妨げられる(Johnson and Nasr-Esfahani, 1994)。このような胚の生理的な変化により、凍結・融解後の生存性や移植後の胚発生能が低下すると考えられている(Kashiwazaki *et al.*, 2001; Esaki *et al.*, 2004)。したがって、媒精後 5 日目胚は 6 日目胚よりも培養期間が短く、胚の生理的な変化が少ないため、産子への発生率が高かった可能性も考えられた。

本章では、胚の発生ステージおよび発生培地が耐凍性に影響することを明らかにした。胚を PBM で培養することで、胚盤胞における生存細胞数を指標とする胚品質が向上し、耐凍性を改善すると推察された。

## 5. 小括

本章では、ブタ胚の発生ステージ、発生培地、および培養日数の違いが、ガラス化・融解後の胚生存性に及ぼす影響を検討した。

拡張胚盤胞のガラス化・融解後の生存率および孵化率は、胚日齢や培養培地の違いに関わらず、胚盤胞に比べて有意に高かった。媒精後5日目から1日間PBMで培養すると、胚のガラス化・融解後の生存率および孵化率は、PZM-5で培養した胚に比べて高かった。また、媒精後4日目ないしは5日目からPBMで培養した胚を、5日目あるいは6日目にガラス化保存したところ、培養期間および胚日齢間でガラス化・融解後の胚の生存性に差は認められなかった。さらに、媒精後5日目の拡張胚盤胞をガラス化・融解し3頭の受胚豚の子宮へ外科的に移植したところ全頭が妊娠したが、媒精後6日目の拡張胚盤胞をガラス化・融解し3頭の受胚豚へ移植すると3頭中1頭のみが妊娠した。

以上の結果から、ブタ胚では胚盤胞に比べて拡張胚盤胞で耐凍性が高く、PBMで培養すると胚の耐凍性が向上し、発生ステージや発生培地が胚の生存性に大きく影響することが示唆された。

表 5-1 PBM の組成

組成	濃度
NaCl	108.00 mM
KCl	10.00 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.35 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.40 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25.00 mM
Glucose	5.00 mM
Na-pyruvate	0.20 mM
Ca-(lactate) <sub>2</sub> ·5H <sub>2</sub> O	2.00 mM
L-glutamine	2.00 mM
Hypotaurine	5.00 mM
L-Arginine·HCl	0.10 mM
L-Cystine	0.05 mM
L-Histidine	0.05 mM
L-Isoleucine	0.20 mM
L-Leucine	0.20 mM
L-Lysine·HCl	0.20 mM
L-Methionine	0.05 mM
L-Phenylalanine	0.10 mM
L-Threonine	0.20 mM
L-Tryptophan	0.02 mM
L-Tyrosine	0.10 mM
L-Valine	0.20 mM
L-Alanine	0.10 mM
L-Asparagine·H <sub>2</sub> O	0.10 mM
L-Aspartic Acid	0.10 mM
L-Glutamic Acid	0.10 mM
Glycine	10.10 mM
L-Proline	0.10 mM
L-Serine	0.10 mM
Gentamicin	0.01 mg/ml
Polyvinyl alcohol	3.00 mg/ml
浸透圧 (mOsm) <sup>*</sup>	300 ± 1

\*平均値±標準誤差を示す.

pH 7.3 に調整.

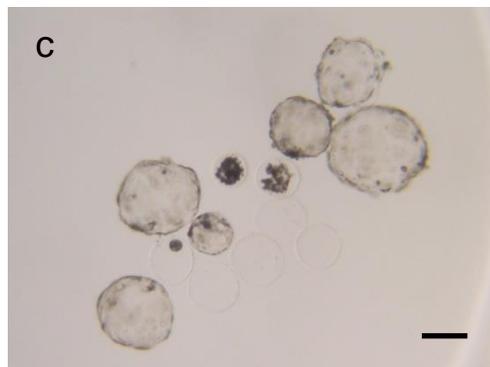
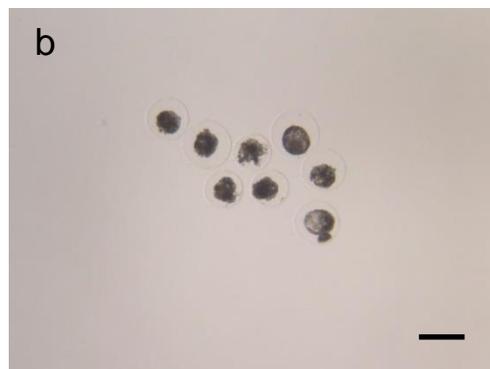
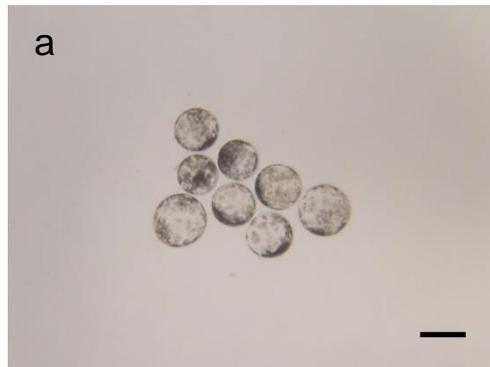


図 5-1 ガラス化保存前後のブタ胚  
(a) ガラス化前の拡張胚盤胞  
(b) 融解直後の胚  
(c) 融解後 48 時間培養した胚  
スケールバー= 200  $\mu\text{m}$ .

表 5-2 媒精後 5 日目胚の耐凍性に対する発生ステージと培養培地の影響

媒精後 1~4 日	媒精後 4~5 日	発生ステージ	ガラス化胚数	生存胚数(%)		48 時間後 孵化胚数(%)	48 時間後 完全孵化胚数(%)
				24 時間後	48 時間後		
PZM-5	PZM-5	胚盤胞	52	44 (84.5±6.9)	27 (51.6±6.5)	10 (19.4±7.0)	5 (9.7±4.7)
		拡張胚盤胞	48	44 (91.1±2.8)	39 (80.1±7.5)	23 (46.9±7.0)	8 (17.1±3.1)
PZM-5	PBM	胚盤胞	55	48 (87.2±5.3)	36 (65.6±7.7)	15 (27.2±6.8)	3 (5.4±2.4)
		拡張胚盤胞	43	38 (88.1±5.7)	35 (81.0±7.1)	24 (55.4±7.1)	7 (16.4±4.4)
培地				NS	NS	NS	NS
発生ステージ				NS	P<0.01	P<0.001	P<0.05
培地 * 発生ステージ				NS	NS	NS	NS

6 回の繰り返し実験による平均値 ± 標準誤差を示す。

表 5-3 媒精後 6 日目胚の耐凍性に対する発生ステージと培養培地の影響

媒精後 1~5 日	媒精後 5~6 日	発生ステージ	ガラス化胚数	生存胚数(%)		48 時間後 孵化胚数(%)	48 時間後 完全孵化胚数(%)
				24 時間後	48 時間後		
PZM-5	PZM-5	胚盤胞	47	21 (44.6±5.2)	13 (27.7±6.0)	2 (4.2±2.6)	1 (2.1±2.1)
		拡張胚盤胞	48	35 (71.6±4.2)	26 (53.5±5.4)	5 (9.3±3.4)	3 (5.8±3.9)
PZM-5	PBM	胚盤胞	59	43 (74.8±5.2)	26 (46.1±7.1)	6 (11.0±3.8)	2 (4.4±2.9)
		拡張胚盤胞	54	50 (91.3±4.7)	45 (82.7±4.5)	28 (52.0±8.2)	12 (22.8±6.0)
培地				P<0.001	P<0.001	P<0.001	P<0.05
発生ステージ				P<0.001	P<0.001	P<0.001	P<0.05
培地 * 発生ステージ				NS	NS	NS	P<0.01

6 回の繰り返し実験による平均値 ± 標準誤差を示す。

表 5-4 ガラス化胚の耐凍性に対する胚日齢の影響

PZM-5	PBM	ガラス化時の胚日齢	ガラス化胚数 (胚盤胞:拡張胚盤胞)	生存胚数(%)		48 時間後 完全孵化胚数(%)
				24 時間後	48 時間後	
媒精後 1~4 日	媒精後 4~5 日	5 日	59 (42:17)	45 (75.8±7.2)	27 (45.6±7.7)	4 (6.7±3.4)
媒精後 1~4 日	媒精後 4~6 日	6 日	72 (30:42)	52 (72.4±2.0)	38 (53.0±3.2)	13 (18.8±5.8)
媒精後 1~5 日	媒精後 5~6 日	6 日	59 (20:39)	48 (82.1±4.9)	33 (56.8±7.6)	11 (18.8±7.1)

6 回または 7 回の繰り返し実験による平均値±標準誤差を示す。

表 5-5 成分既知のガラス化液でガラス化保存した胚の移植成績

胚日齢	媒精後 5 日目胚	媒精後 6 日目胚
受胚豚	3	3
移植胚数(1 頭あたり)	30	30
妊娠頭数 (%)	3 (100)	1 (33.3)
妊娠期間(日)	115, 118, 119	116
産子数(一腹あたり)	14 (6, 1, 7)	4 (4)
性比(雄:雌)	6:8	3:1
子豚生産率 <sup>§</sup> (%)	15.6 <sup>a</sup>	4.4 <sup>b</sup>
生時体重 (kg) <sup>*</sup>	1.4±0.1	1.4±0.0

<sup>§</sup> 移植胚数に対する産子数の割合を示す.

<sup>\*</sup> 平均値±標準誤差を示す.

## 第6章 総合考察

本研究では、ブタ卵母細胞と胚の発生能および品質向上を図り、成分既知培地を用いた培養技術を確立するため、卵母細胞の成熟培養および胚の発生培養について検討を行った。

第2章では、ブタ卵母細胞の成熟におけるTGF- $\alpha$ の効果を調べたところ、eCGとhCGの存在下で、TGF- $\alpha$ は体外受精後の胚盤胞への発生を促進することを明らかにした。ウシにおいても、成熟培地へのTGF- $\alpha$ の添加が胚盤胞への発生を促進する(Kobayashi *et al.*, 1994)。また、ブタでは、eCGとhCGを含む成熟培地にEGFを10 ng/mlの濃度で添加して卵母細胞を培養すると、胚盤胞への発生を促進すると報告されている(Abeydeera *et al.*, 1998)。EGFは体外成熟した卵母細胞や卵丘細胞のタンパク質合成のパターンを変え、細胞質成熟の調節に生理的な役割を果たすことが示されている(Singh *et al.*, 1997; Uhm *et al.*, 2010)。本研究では、TGF- $\alpha$ が卵母細胞や胚における脂肪滴や小胞体、ミトコンドリアなどの細胞小器官の微細構造に影響することを明らかにした。細胞質成熟には細胞内小器官の局在や構造の変化も関与する(Ferreira *et al.*, 2009; Cran, 1985)ことから、TGF- $\alpha$ は卵母細胞の細胞内微細構造を変化させることで細胞質成熟を改善し、胚発生能を促進する可能性が示唆された。

第2章において、eCGとhCGが存在しない場合、TGF- $\alpha$ は卵母細胞の核成熟を促進したが、eCGとhCGが存在すると、TGF- $\alpha$ による促進効果は認められなかった。そこで、TGF- $\alpha$ と生殖腺刺激ホルモンの作用の関連性を明確にするとともに、動物由来成分を使用せずに効率良く卵成熟を誘起できる成分既知培地を開発するため、第3章では、卵母細胞の成熟に対するTGF- $\alpha$ の作用を、FSHの作用と比較した。その結果、TGF- $\alpha$ とFSHは相乗的に卵母細胞の核成熟を促進し、TGF- $\alpha$ とFSHが核成熟を促進する作用機構は完全に同じではないことを明らかにした。FSHはラットの顆粒膜細胞やマウスの卵丘細胞でepiregulinあるいはamphiregulinの発現を誘導し(Sekiguchi *et al.*, 2002; Shimada *et al.*, 2006)、FSHが誘起するGVBDはEGFレセプターのチロシンキナーゼ阻害剤であるAG1478により阻害されることから、これらのEGFファミリー分子はFSHが誘起する卵成熟の仲介物質として作用する可能性が示されている(Chen *et al.*, 2008; Downs and Chen, 2008)。しかし、本研究において、AG1478はTGF- $\alpha$ が誘起する卵母細胞の核

成熟を完全に阻害したが、FSH が誘起する核成熟を完全には阻害しなかった。また、成熟培地に TGF- $\alpha$ と FSH を両方添加すると、TGF- $\alpha$ のみを添加した場合に比べて、卵母細胞の減数分裂の進行が速かった。これらの結果から、FSH は EGF レセプターを介したシグナル伝達経路以外にも関与し、TGF- $\alpha$ と FSH は一部異なる作用機構により卵成熟を促進すると推察された。Tsafriri *et al.* (1989)は、ラットの排卵前の卵胞において TGF- $\alpha$ が卵母細胞の核成熟を誘起し、プロジェステロン産生を促進することから、TGF- $\alpha$ は LH の作用に類似していると報告している。また、amphiregulin、epiregulin、betacellulin を含む EGF ファミリー分子は、LH が誘起する卵成熟の仲介物質としても作用する可能性がある(Park *et al.*, 2004; Conti *et al.*, 2006)。本研究で成熟培地に添加した TGF- $\alpha$ は、体内における他の EGF ファミリー分子の代わりに、LH のシグナル伝達物質として作用している可能性も考えられた。本研究により、成熟培地に TGF- $\alpha$ と FSH を添加すると、卵母細胞の核成熟、卵丘膨化、および胚発生を相乗的に促進することを明らかにし、動物由来成分を使用せずに効率良く卵成熟を誘起できる成熟培地を開発することに成功した。

第 4 章では、PZM-5 に 5 mM グルコースと 10 mM グリシンを添加すると、相乗的に胚盤胞の孵化を促進し、胚盤胞の総細胞数を増加させるとともに、アポトーシス細胞の出現頻度を低下させることを明らかにした。グルコースは 4 細胞期以降の胚発生のエネルギー基質として重要であることが示されており(Kikuchi *et al.*, 2002b; Karja *et al.*, 2004)、本研究でもグルコースを添加すると胚盤胞の生存率および ATP 含量が増加し、胚盤胞においても重要なエネルギー源であることが示された。ウシ胚において、グリシンは胚盤胞への発生と胚盤胞の細胞数を増加させる(Lee and Fukui, 1996; Takahashi and Kanagawa, 1998)と報告されている。一方、本研究において、グリシンのみの添加ではブタ胚の発生促進効果は認められず、グルコースとグリシンを両方添加すると胚盤胞の孵化率や細胞数が増加した。グリシンは浸透圧調節物質(Dawson and Baltz, 1997)や GSH の合成(Griffith, 1999)に関与している可能性もあるが、エネルギー源としてグルコースが存在する場合に効果が発揮されると推察された。また、第 5 章では、PZM-5 にグルコースとグリシンを添加した発生培地(PBM)で媒精後 5 日目の胚盤胞を 1 日間培養すると、ガラス化・融解後の胚の生存率や孵化率も増加することを明らかにした。一般に、体外で発生した胚は、体内で発生した胚に比べて胚盤胞の栄養膜細胞に対する内部細胞塊の割合が低く、胚盤胞の総細胞数が少ないな

どの異常が認められ(Wang *et al.*, 1999)、このような胚の異常が耐凍性にも影響している可能性が示唆されている(Men *et al.*, 2005)。これらのことから、生存細胞数を指標とした胚品質の向上が耐凍性を改善したと推察される。本研究では、発生培地にグルコースとグリシンを添加して胚盤胞を培養すると胚発生が促進されるとともに胚品質が向上することを明らかにし、胚盤胞期以降の発生に適した成分既知発生培地を開発することに成功した。また、作出した胚をガラス化保存後に移植すると正常な子豚が得られることを明らかにした。

農林水産省畜産統計(2016)によると、日本国内におけるブタの飼養戸数は、1996年の16,000戸から2016年の4,830戸まで減少している。一方、ブタの飼養頭数は1996年の990万頭に対し、2016年の931.3万頭とほぼ横ばいで推移しており、一戸あたりの飼養頭数が増加し、年々大規模化が進んでいる。そのため、郡単位での繁殖管理や生産性の向上、感染症の伝播防止が必要になっている。現在、交配に用いる種豚は主に他の養豚場から生体で導入するため、種豚価格のほかに運搬費などの経済的負担が大きいうえ、病気が侵入するリスクがある。そこで、畜産現場では、疾病を伝播する可能性が極めて低い胚移植技術が注目されている。特に、開腹せず経腔的に胚を移植する非外科的移植は、低コストかつ省労力で新たな遺伝形質を持つブタを導入することが可能になると考えられる。胚移植は疾病伝播リスクを極力低減することが可能であり、種豚の導入だけでなく、品種改良や優良家畜の増産にも有用であると期待される。本研究で開発した成分既知の成熟培地と発生培地を用いた培養系により、屠畜由来の卵母細胞から低コストで効率良く、安定して高品質の移植胚を作出することが可能になると考えられる。

以上のように、本研究において開発した成分既知の卵母細胞成熟培地および胚発生培地を用いた培養技術は、養豚業に貢献するだけでなく、卵成熟や胚発生機構の解明といった生物学や、クローン動物あるいはトランスジェニック動物作出など医学の基盤技術としても役立つと思われる。また、成分既知のガラス化保存液を用いた胚のガラス化保存技術は、胚移植における時間的・地理的制約を無くすことができるため利便性が向上し、畜産現場への胚移植の普及に貢献するほか、病原体混入の可能性が極めて低い胚を半永久的に保存できるため、希少品種や優良血統のブタの遺伝子資源の保存にも大きく寄与するものと期待される。

## 引用文献

- Abe H, Yamashita S, Itoh T, Satoh T & Hoshi H** 1999 Ultrastructure of bovine embryos developed from in vitro matured and -fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. *Molecular Reproduction and Development* **53** 325–335.
- Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Rieke A, Murphy CN, Prather RS & Day BN** 2000 Development and viability of pig oocytes matured in a protein-free medium containing epidermal growth factor. *Theriogenology* **54** 787–797.
- Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Rieke A, Prather RS & Day BN** 1998 Presence of epidermal growth factor during in vitro maturation of pig oocytes and embryo culture can modulate blastocyst development after in vitro fertilization. *Molecular Reproduction and Development* **51** 395–401.
- Ainsworth L, Tsang BK, Downey BR, Marcus GJ & Armstrong DT** 1980 Interrelationships between follicular fluid steroid levels, gonadotropic stimuli, and oocyte maturation during preovulatory development of porcine follicles. *Biology of Reproduction* **23** 621–627.
- Aitken RJ, Clarkson JS & Fishel S** 1989 Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biology of Reproduction* **40** 183–197.
- Akaki Y, Yoshioka K, Noguchi M, Hoshi H & Funahashi H** 2009 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. *Journal of Reproduction and Development* **55** 446–453.
- Algriany O, Bevers M, Schoevers E, Colenbrander B & Dieleman S** 2004 Follicle size-dependent effects of sow follicular fluid on in vitro cumulus expansion, nuclear maturation and blastocyst formation of sow cumulus oocytes complexes. *Theriogenology*

62 1483–1497.

**Amsterdam A, Koch Y, Lieberman ME & Lindner HR** 1975 Distribution of binding sites for human chorion gonadotropin in the preovulatory follicle of the rat. *Journal of Cell Biology* **67** 874–900.

**Ankrah NA & Appiah-Opong R** 1999 Toxicity of low levels of methylglyoxal: depletion of blood glutathione and adverse effect on glucose tolerance in mice. *Toxicology Letters* **20** 61–67.

**Ashkenazi H, Cao X, Motola S, Popliker M, Conti M & Tsafiriri A** 2005 Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. *Endocrinology* **146** 77–84.

**Baltz JM** 1993 Intracellular pH regulation in the early embryo. *BioEssays* **15** 523–530.

**Barrandon Y & Green H** 1987 Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies: the roles of transforming growth factor- $\alpha$  and epidermal growth factor. *Cell* **50** 1131–1137.

**Bavister BD** 1995 Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Human Reproduction Update* **1** 91–148.

**Bavister BD & Arlotto T** 1990 Influence of single amino acids on the development of hamster one-cell embryos *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development* **25** 45–51.

**Berthelot F, Martinat-Botte F, Vajta G & Terqui M** 2003 Cryopreservation of porcine embryos: state of the art. *Livestock Production Science* **83** 73–83.

**Berthelot F, Martinat-Botte F, Locatelli A, Perreau C & Terqui M** 2000 Piglets born after vitrification of embryos using the Open Pulled Straw method. *Cryobiology* **41** 116–24.

**Biggers JD, Lawitts JA & Lechene CP** 1993 The protective effect of betaine on the deleterious effects of NaCl on preimplantation mouse embryos *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development* **34** 380–390.

**Bijttebier J, Soom AV, Meyer E, Mateusen B & Maes D** 2008 Preovulatory follicular fluid

during in vitro maturation decreases polyspermic fertilization of cumulus-intact porcine oocytes in vitro maturation of porcine oocytes. *Theriogenology* **70** 715–724.

**Bridges TS, Davidson TR, Chamberlain CS, Geisert RD & Spicer LJ** 2002 Changes in follicular fluid steroids, insulin-like growth factors (IGF) and IGF-binding protein concentration, and proteolytic activity during equine follicular development. *Journal of Animal Science* **80** 179–190.

**Brinster RL** 1974 Embryo development. *Journal of Animal Science* **38** 1003–1012.

**Brown DA** 2001 Lipid droplets: Proteins floating on a pool of fat. *Current Biology* **11** 446–449.

**Brown JJG & Whittingham DG** 1992 The dynamic provision of different energy substrates improves development of one-cell random-bred mouse embryos *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility* **95** 503–511.

**Brucker C, Alexander NJ, Hodgen GD & Sandow BA** 1991 Transforming growth factor-alpha augments meiotic maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development* **28** 94–98.

**Bryla M, Trzcinska M & Wieczorec J** 2009 Analysis of *in vivo*- and *in vitro*-derived pig expanded blastocysts based on DNA fragmentation. *Animal Science Papers and Reports* **27** 59–68.

**Byskov AG, Andersen CY, Nordholm L, Thogersen H, Xia G, Wassmann O, Andersen JV, Guddal E & Roed T** 1995 Chemical structure of sterols that activate oocyte meiosis. *Nature* **374** 559–562.

**Cao XY, Rose J, Wang SY, Liu Y, Zhao M, Xing MJ, Chang T & Xu B** 2016 Glycine increases preimplantation development of mouse oocytes following vitrification at the germinal vesicle stage. *Scientific Reports* **6** 1–12.

**Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL & Torres I** 1989 An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility* **86** 679–688.

- Chen L, Russell PT & Larsen WJ** 1993 Functional significance of cumulus expansion in the mouse: roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. *Molecular Reproduction and Development* **34** 87–93.
- Chen X, Zhou B, Yan J, Xu B, Tai P, Li J, Peng S, Zhang M & Xia G** 2008 Epidermal growth factor receptor activation by protein kinase C is necessary for FSH-induced meiotic resumption in porcine cumulus-oocyte complexes. *Journal of Endocrinology* **197** 409–419.
- Choi YH, Carnevale EM, Seidel Jr. GE & Squire EL** 2001 Effects of gonadotropins on bovine oocytes matured in TCM-199. *Theriogenology* **56** 661–670.
- Conaghan J, Handyside AH, Winston RM & Leese HJ** 1993 Effects of pyruvate and glucose on the development of human preimplantation embryos in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility* **99** 87–95.
- Conti M, Hsieh M, Park JY & Su YQ** 2006 Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. *Molecular Endocrinology* **20** 715–723.
- Coskun S & Lin YC** 1995 Mechanism of action of epidermal growth factor induced porcine oocyte maturation. *Molecular Reproduction and Development* **42** 311–317.
- Coskun S & Lin YC** 1994 Effect of transforming growth factors and activin-A on in vitro porcine oocyte maturation. *Molecular Reproduction and Development* **38** 153–159.
- Cran DG** 1985 Qualitative and quantitative structural changes during pig oocyte maturation. *Journal of Reproduction and Fertility* **74** 237–245.
- Cuello C, Gil MA, Parrilla I, Tornel J, Vazquez JM, Roca J, Berthelot F, Martinat-Botte F & Martinez EA** 2004 Vitrification of porcine embryos at various developmental stages using different ultra-rapid cooling procedures. *Theriogenology* **62** 353–361.
- Davis DL & Day BN** 1978 Cleavage and blastocyst formation by pig eggs in vitro. *Journal of Animal Science* **46** 1043–1053.
- Dawson KM & Baltz JM** 1997 Organic osmolytes and embryos: substrates of the Gly and beta transport systems protect mouse zygotes against the effects of raised osmolarity. *Biology of Reproduction* **56** 1550–1558.

- Dawson KM, Collins JL & Baltz JM** 1998 Osmolarity-dependent glycine accumulation indicates a role for glycine as an organic osmolyte in early preimplantation mouse embryos. *Biology of Reproduction* **59** 225–232.
- Day BN** 2000 Reproductive biotechnologies: current status in porcine reproduction. *Animal Reproduction Science* **60–61** 161–172.
- Dekel N, Galiani D & Beers WH** 1988 Induction of maturation in follicle-enclosed oocytes: the response to gonadotropins at different stages of follicular development. *Biology of Reproduction* **38** 517–521.
- Dekel N & Sherizly I** 1985 Epidermal growth factor induces maturation of rat follicle-enclosed oocytes. *Endocrinology* **116** 406–409.
- Devaux A, Soula V, Sifer C, Branger M, Naouri M, Porcher R, Poncelet C, Neuraz A, Alvarez S, Benifla JL, Madelenat P, Brun-Vazinet F & Feldmann G** 2003 Hepatitis C virus detection in follicular fluid and culture media from HCV<sup>+</sup> women, and viral risk during IVF procedures. *Human Reproduction* **18** 2342–2399.
- Ding J & Foxcroft GR** 1994 Epidermal growth factor enhances oocyte maturation in pigs. *Molecular Reproduction and Development* **39** 30–40.
- Dobrinsky JR** 2001 Cryopreservation of pig embryos: adaptation of vitrification technology for embryo transfer. *Reproduction* **58** 325–333.
- Dobrinsky JR** 1997 Cryopreservation of pig embryos. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* **52** 301–312.
- Dobrinsky JR & Johnson LA** 1994 Cryopreservation of porcine embryos by vitrification: a study of *in vitro* development. *Theriogenology* **42** 25–35.
- Dobrinsky JR, Johnson LA & Rath D** 1996 Development of a culture medium (BECM-3) for porcine embryos: Effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on embryo development. *Biology of Reproduction* **55** 1069–1074.
- Dobrinsky JR, Pursel VG, Long CR & Johnson LA** 2000 Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biology of*

*Reproduction* **62** 564–570.

**Dominko T & First NL** 1997 Timing of meiotic progression in bovine oocytes and its effect on early embryo development. *Molecular Reproduction and Development* **47** 456–467.

**Downs SM** 1989 Specificity of epidermal growth factor action on maturation of the murine oocyte and cumulus oophorus in vitro. *Biology of Reproduction* **41** 371–379.

**Downs SM & Chen J** 2008 EGF-like peptides mediate FSH-induced maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development* **75** 105–114.

**Downs SM, Daniel SA & Eppig JJ** 1988 Induction of maturation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes by follicle-stimulating hormone and epidermal growth factor: evidence for a positive stimulus of somatic cell origin. *Journal of Experimental Zoology* **245** 86–96.

**Downs SM & Hunzicker-Dunn M** 1995 Differential regulation of oocyte maturation and cumulus expansion in the mouse oocyte-cumulus cell complex by site-selective analogs of cyclic adenosine monophosphate. *Developmental Biology* **172** 72–85.

**Eagle H** 1959 Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science* **130** 432–437.

**Edwards RG** 1974 Follicular fluid. *Journal of Reproduction and Fertility* **37** 189–219.

**Edwards LJ, Williams DA & Gardner DK** 1998 Intracellular pH of the mouse preimplantation embryo: amino acids act as buffers of intracellular pH. *Human Reproduction* **12** 3441–3448.

**Elhassan YM, Wu G, Leanez AC, Tasca RJ, Watson AJ & Westhusin ME** 2001 Amino acid concentrations in fluid from the bovine oviduct and uterus and in KSOM-based culture media. *Theriogenology* **55** 1907–1918.

**Eppig JJ** 1979 FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. *Nature* **281** 483–484.

**Eppig JJ, Schultz RM, O'Brien M & Chesnel F** 1994 Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. *Developmental Biology* **50** 434–442.

**Epstein CJ & Smith SA** 1973 Amino acid uptake and protein synthesis in preimplantation

mouse embryos. *Developmental Biology* **33** 171–184.

- Esaki R, Ueda H, Kurome M, Hirakawa K, Tomii R, Yoshioka H, Ushijima H, Kuwayama M & Nagashima H** 2004 Cryopreservation of porcine embryos derived from *in vitro*-matured oocytes. *Biology of Reproduction* **71** 432–437.
- Fan HY, Tong C, Lian L, Li SW, Gao WX, Cheng Y, Chen DY, Schatten H & Sun QY** 2003 Characterization of ribosomal S6 protein kinase p90rsk during meiotic maturation and fertilization in pig oocytes: mitogen-activated protein kinase-associated activation and localization. *Biology of Reproduction* **68** 968–977.
- Farin CE, Rodriguez KF, Alexander JE, Hockney JE, Herick JL & Kennedy-Stoskopf S** 2007 The role of transcription in EGF- and FSH-mediated oocyte maturation *in vitro*. *Animal Reproduction Science* **98** 97–112.
- Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA & Navarro PAAS** 2009 Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* **71** 836–848.
- Flood MR & Wiebold JL** 1988 Glucose metabolism by preimplantation pig embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* **84** 7–12.
- Fuente RDL, J.O'Brien M & Eppig JJ** 1999 Epidermal growth factor enhances preimplantation developmental competence of maturing mouse oocytes. *Human Reproduction* **14** 3060–3068.
- Funahashi H & Day BN** 1993 Effects of the duration of exposure to hormone supplements on cytoplasmic maturation of pig oocytes *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility* **98** 179–185.
- Funahashi H & Day BN** 1997 Advances in *in vitro* production of pig embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* **52**(Supplement) 271–283.
- Fülöp C, Kamath RV, Li Y, Otto JM, Salustri A, Olsen BR, Glant TT & Hascall VC** 1997 Coding sequence, exon-intron structure and chromosomal localization of murine TNF-stimulated gene 6 that is specifically expressed by expanding cumulus cell-oocyte complexes. *Gene* **202** 95–102.

- Galik PK, Givens MD, Stringfellow DA, Crichton EG, Bishop MD & Eilertsen KJ** 2002 Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and anti-BVDV antibodies in pooled samples of follicular fluid. *Theriogenology* **57** 1219–1227.
- Gardner DK & Lane M** 1993 Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Biology of Reproduction* **48** 377–385.
- Goud PT, Goud AP, Qian C, Laverge H, Elst JVD, Sutter PD & Dhont M** 1998 In-vitro maturation of human germinal vesicle stage oocytes: role of cumulus cells and growth factor in the culture medium. *Human Reproduction* **13** 1638–1644.
- Greve T & Callesen H** 2004 Integrating new technologies with embryology and animal production. *Reproduction Fertility and Development* **16** 113–122.
- Griffith OW** 1999 Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radical Biology and Medicine* **27** 922–935.
- Gruppen CG, Nagashima H & Nottle MB** 1997a Asynchronous meiotic progression in porcine oocytes matured in vitro. *Reproduction Fertility and Development* **9** 187–191.
- Gruppen CG, Nagashima H & Nottle MB** 1997b Role of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on porcine oocyte maturation and embryonic development in vitro. *Reproduction Fertility and Development* **9** 571–575.
- Guérin B, Nibart M, Marquant-Le Guienne B & Humblot P** 1997 Sanitary risks related to embryo transfer in domestic species. *Theriogenology* **47** 33–42.
- Guérin P, Gallois E, Croteau S, Revol N, Maurin F, Guillaud J & Ménézo Y** 1995 Collection and aminoacid composition of oviduct and follicular secretions in domestic animals. *Revue de Médecine Vétérinaire* **146** 805–814.
- Guler A, Poulin N, Mermillod P, Terqui M & Cognie Y** 2000 Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on in vitro maturation of sheep oocytes. *Theriogenology* **54** 209–218.
- Halliwell B & Aruoma OI** 1991 DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and

measurement in mammalian systems. *FEBS Letters* **281** 9–19.

**Hammond JM, Baranao JLS, Skaleris D, Knight AB, Romanus JA & Rechler MM** 1985

Production of insulin-like growth factors by ovarian granulosa cells. *Endocrinology* **117** 2553–2555.

**Harris SE, Gopichandran N, Picton HM, Leese HJ & Orsi NM** 2005 Nutrient concentrations

in murine follicular fluid and the female reproductive tract. *Theriogenology* **64** 992–1006.

**Hirashima Y, Kobayashi H, Gotoh J & Terao T** 1997 Inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor is concentrated

in the pericellular environment of mouse granulosa cells through hyaluronan-binding.

*European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* **73** 79–84.

**Hobbs JG & Kaye PL** 1985 Glycine transport in mouse eggs and preimplantation embryos.

*Journal of Reproduction and Fertility* **74** 77–86.

**Hsieh M, Lee D, Panigone S, Horner K, Chen R, Theologis A, Lee DC, Threadgill DW &**

**Conti M** 2007 Luteinizing hormone-dependent activation of the epidermal growth factor network is essential for ovulation. *Molecular and Cellular Biology* **27** 1914–1924.

**Hsieh M, Zamah AM & Conti M** 2009 Epidermal growth factor-like growth factors in the

follicular fluid: role in oocyte development and maturation. *Seminars in Reproductive*

*Medicine* **27** 52–61.

**Hsu CJ, Holmes SD & Hammond JM** 1987 Ovarian epidermal growth factor-like activity.

Concentrations in porcine follicular fluid during follicular enlargement. *Biochemical and*

*Biophysical Research Communications* **147** 242–247.

**Hyttel P, Fair T, Callesen H & Greve T** 1997 Oocyte growth, capacitation and final

maturation in cattle. *Theriogenology* **47** 23–32.

**Hyttel P & Niemann H** 1990 Ultrastructure of porcine embryos following development in vitro

versus in vivo. *Molecular Reproduction and Development* **27** 136–144.

**Ikeda K & Takahashi Y** 2003 Comparison of maturational and developmental parameters of

oocytes recovered from prepubertal and adult pigs. *Reproduction Fertility and*

*Development* **15** 215–221.

**Iritani A, Sato E & Nishikawa Y** 1974 Secretion rates and chemical composition of oviduct and uterine fluids in sows. *Journal of Animal Science* **39** 582–588.

**Ito M, Iwata H, Kitagawa M, Kon Y, Kuwayama T & Monji Y** 2008 Effect of follicular fluid collected from various diameter follicles on the progression of nuclear maturation and developmental competence of pig oocytes. *Animal Reproduction Science* **106** 421–430.

**Jamnongjit M, Gill A & Hammes SR** 2005 Epidermal growth factor receptor signaling is required for normal ovarian steroidogenesis and oocyte maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102** 16257–16262.

**Johnson MH & Nasr-Esfahani MH** 1994 Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos *in vitro*? *Bioessays* **16** 31–38.

**Karja NWK, Kikuchi K, Fahrudin M, Ozawa M, Somfai T, Ohnum K, Noguchi J, Kaneko H & Nagai T** 2006 Development to the blastocyst stage, the oxidative state, and the quality of early developmental stage of porcine embryos cultured in alteration of glucose concentrations *in vitro* under different oxygen tensions. *Reproductive Biology and Endocrinology* **54** 1–12.

**Karja NWK, Medvedev S, Onishi A, Fuchimoto D, Iwamoto M, Otoi T & Nagai T** 2004 Effect of replacement of pyruvate/lactate in culture medium with glucose on preimplantation development of porcine embryos *in vitro*. *Journal of Reproduction and Development* **50** 587–592.

**Kashiwazaki N, Kikuchi K, Suzuki K, Noguchi J, Nagai T, Kaneko H & Shino M** 2001 Development *in vivo* and *in vitro* to blastocysts of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Journal of Reproduction and Development* **47** 303–310.

**Kikuchi K, Ekwall H, Tienthai P, Kawai Y, Noguchi J, Kaneko H & Rodriguez-Martinez H** 2002a Morphological features of lipid droplet transition during porcine oocyte fertilisation

- and early embryonic development to blastocyst *in vivo* and *in vitro*. *Zygote* **10** 355–366.
- Kikuchi K, Onishi A, Kashiwazaki N, Iwamoto M, Noguchi J, Kaneko H, Akita T & Nagai T** 2002b Successful piglet production after transfer of blastocysts produced by a modified *in vitro* system. *Biology of Reproduction* **66** 1033–1041.
- Kobayashi S, Takei M, Kano M, Tomita M & Leibo SP** 1998 Piglets produced by transfer of vitrified porcine embryos after stepwise dilution of cryoprotectants. *Cryobiology* **36** 20–31.
- Kobayashi K, Yamashita S & Hoshi H** 1994 Influence of epidermal growth factor and transforming growth factor- $\alpha$  on *in vitro* maturation of cumulus cell-enclosed bovine oocytes in a defined medium. *Journal of Reproduction and Fertility* **100** 439–446.
- Kosower NS & Kosower EM** 1978 The glutathione status of cells. *International Review of Cytology* **54** 109–160.
- Kuwayama M, Vajta G, Kato O & Leibo S** 2005 Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reproductive BioMedicine Online* **11** 300–308.
- Lapolt PS, Leung K, Ishimaru R, Tafoya MA & Chen JY** 2002 Roles of cyclic GMP in modulating ovarian functions. *Reproductive BioMedicine Online* **6** 15–23.
- LeBaron RG, Zimmermann DR & Ruoslahti E** 1992 Hyaluronate binding properties of versican. *The Journal of Biological Chemistry* **267** 10003–10010.
- Lee ES & Fukui Y** 1996 Synergistic effect of alanine and glycine on bovine embryos cultured in a chemically defined medium and amino acid uptake by *in vitro*-produced bovine morulae and blastocysts. *Biology of Reproduction* **55** 1383–1389.
- Lee ES, Fukui Y, Lee BC, Lim JM & Hwang WS** 2004 Promoting effect of amino acids added to a chemically defined medium on blastocyst formation and blastomere proliferation of bovine embryos cultured *in vitro*. *Animal Reproduction Science* **84** 257–67.
- Leese HJ & Barton AM** 1984 Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* **72** 9–13.
- Leibo SP** 1988 Cryopreservation of embryos. *XI International Congress on Animal*

*Reproduction and Artificial Insemination* **5** 370–377.

- Li R, Whitworth K, Lai L, Wax D, Spate L, Murphy CN, Rieke A, Isom C, Hao Y, Zhong Z, Katayama M, Schatten H & Prather RS** 2007 Concentration and composition of free amino acids and osmolalities of porcine oviductal and uterine fluid and their effects on development of porcine IVF embryos. *Molecular Reproduction and Development* **74** 1228–1235.
- Li YH, Liu RH, Jiao LH & Wang WH** 2002 Synergetic effects of epidermal growth factor and estradiol on cytoplasmic maturation of porcine oocyte. *Zygote* **10** 349–354.
- Liang CG, Huo LJ, Zhong ZS, Chen DY, Schatten H & Sun QY** 2005 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* **146** 4437–4444.
- Liang CG, Su YQ, Fan HY, Schatten H & Sun QY** 2007 Mechanism regulating oocyte meiotic resumption: roles of mitogen-activated protein kinase. *Molecular Endocrinology* **21** 2037–2055.
- Lonergan P, Carolam C, Langendonck AV, Donnay I, Khatir H & Mermillod P** 1996 Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development *in vitro*. *Biology of Reproduction* **54** 1420-1429.
- Long C, Dobrinsky J, Garrett W & Johnson L** 1998 Dual labeling of the cytoskeleton and DNA strand breaks in porcine embryos produced *in vivo* and *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development* **51** 59–65.
- Lu Z, Xia G & Zhang J** 2001 Protein kinase C, rather than protein kinase A is involved in follicle-stimulating hormone-mediated meiotic resumption of mouse cumulus cell-enclosed oocytes in hypoxanthine-supplemented medium. *Molecular and Cellular Endocrinology* **182** 225–232.
- Machaty Z, Day BN & Prather RS** 1998 Development of early porcine embryos *in vitro* and *in vivo*. *Biology of Reproduction* **59** 451–455.

- MacPhee DJ, Barr KJ, De Sousa PA, Todd SD & Kidder GM** 1994 Regulation of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$  subunit gene expression during mouse preimplantation development. *Developmental Biology* **162** 259–266.
- Maehara M, Matsunari H, Honda K, Nakano K, Takeuchi Y, Kanai T, Matsuda T, Matsumura Y, Hagiwara Y, Sasayama N, Shirasu A, Takahashi M, Watanabe M, Umeyama K, Hanazono Y & Nagashima H** 2012 Hollow fiber vitrification provides a novel method for cryopreserving *in vitro* maturation/fertilization-derived porcine embryos. *Biology of Reproduction* **87** 1–8.
- Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Fortini D, Aicardi G & Montanaro N** 1998 Rescue of implantation potential in embryos with poor prognosis by assisted zona hatching. *Human Reproduction* **13** 1331–1335.
- Marchal R, Feugang JM, Perreau C, Venturi E, Terqui M & Mermillod P** 2001 Meiotic and developmental competence of prepubertal and adult swine oocytes. *Theriogenology* **56** 17–29.
- Marquardt H, Hunkapiller MW, Hood LE, Twardzik DR, DeLarco JE, Stephenson JR & Todoro GT** 1983 Transforming growth factors produced by retro virus-transformed rodent fibroblast and human melanoma cells: Amino acid sequence homology with epidermal growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80** 4684–4688.
- Massague J** 1983 Epidermal growth factor-like transforming growth factor II. Interaction with epidermal growth factor receptors in human placenta membranes and A431 cells. *The Journal of Biological Chemistry* **258** 13614–13620.
- Mattioli M, Bacci ML, Galeati G & Seren R** 1991 Effects of LH and FSH on the maturation of pig oocytes *in vitro*. *Theriogenology* **36** 95–105.
- Mattioli M, Galeati G, Barboni B & Seren E** 1994 Concentration of cyclic AMP during the maturation of pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility* **100**

403–409.

- McEvoy TG, Coull GD, Broadbent PJ, Hutchinson JS & Speake BK** 2000 Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *Journal of Reproduction and Fertility* **118** 163–170.
- Méduri G, Charnaux N, Driancourt MA, Combettes L, Granet P, Vannier B, Loosfelt H & Milgrom E** 2002 Follicle-stimulating hormone receptors in oocytes? *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **87** 2266–2276.
- Medvedev S, Onishi A, Fuchimoto D, Iwamoto M & Nagai T** 2004 Advanced in vitro production of pig blastocysts obtained through determining the time for glucose supplementation. *Journal of Reproduction and Development* **50** 71–76.
- Men H, Agca Y, Critser ES & Critser JK** 2005 Beneficial effects of serum supplementation during *in vitro* production of porcine embryos on their ability to survive cryopreservation by open pulled straw vitrification. *Theriogenology* **64** 1340–1349.
- Men H, Zhao C, Si W, Murphy CN, Spate L, Liu Y, Walters EM, Samuel MS, Prather RS & Critser JK** 2011 Birth of piglets from in vitro-produced, zona-intact porcine embryos vitrified in a closed system. *Theriogenology* **76** 280–289.
- Merlo B, Iacono E, Zambelli D, Prati F & Belluzzi S** 2005 Effect of EGF on in vitro maturation of domestic cat oocytes. *Theriogenology* **63** 2032–2039.
- Michle DC, Caveney AN, Smith LC & Watson AJ** 2003 Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology* **1** 14–26.
- Minato Y & Toyoda Y** 1982 Induction of cumulus expansion and maturation division of porcine oocyte-cumulus complexes in vitro. *The Japanese Journal of Zootechnical Science* **53** 480–487.
- Misumi K, Hirayama Y, Egawa S, Yamashita S, Hoshi H & Imai K** 2013 Successful

production of piglets derived from expanded blastocysts vitrified using a micro volume air cooling method without direct exposure to liquid nitrogen. *Journal of Reproduction and Development* **59** 520–524.

**Miura R, Aspberg A, Ethell IM, Hagihara K, Schnaar RL, Ruoslahti E & Yamaguchi Y** 1999 The proteoglycan lectin domain binds sulfated cell surface glycolipids and promotes cell adhesion. *The Journal of Biological Chemistry* **274** 11431–11438.

**Moore K & Bondioli KR** 1993 Glycine and alanine supplementation of culture medium enhances development of *in vitro* matured and fertilized cattle embryos. *Biology of Reproduction* **48** 833–840.

**Motta PM, Nottola SA, Makabe S & Heyn R** 2000 Mitochondrial morphology in human fetal and adult female germ cells. *Human Reproduction* **15** (Suppl 2) 129–147.

**Mukhopadhyay D, Hascall VC, Day AJ, Salustri A & Fülöp C** 2001 Two distinct populations of tumor necrosis factor-stimulated gene-6 protein in the extracellular matrix of expanded mouse cumulus cell-oocyte complexes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **394** 173–181.

**Nagai T & Moor RM** 1990 Effect of oviduct cells on the incidence of polyspermy in pig eggs fertilized *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development* **26** 377–381.

**Nagano M, Takahashi Y & Katagiri S** 1999 *In vitro* fertilization and cortical granule distribution of bovine oocytes having heterogeneous ooplasm with dark clusters. *The Journal of Veterinary Medical Science* **61** 531–535.

**Nagashima H, Hiruma K, Saito H, Tomii R, Ueno S, Nakayama N, Matsunari H & Kurome M** 2007 Production of live piglets following cryopreservation of embryos derived from *in vitro*-matured oocytes. *Biology of Reproduction* **76** 900–905.

**Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Grupen CG & Nottle MB** 1995 Cryopreservation of porcine embryos. *Nature* **374** 416.

**Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Grupen CG, Seamark RF & Nottle MB** 1994

- Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. *Biology of Reproduction* **51** 618–622.
- Nagashima H, Kato Y, Yamakawa H, Matsumoto T & Ogawa S** 1989 Changes in freezing tolerance of pig blastocysts in peri-hatching stage. *The Japanese journal of animal reproduction* **35** 130–134.
- Nagashima H, Yamakawa H & Niemann H** 1992 Freezability of porcine blastocysts at different peri-hatching stages. *Theriogenology* **37** 839–850.
- Naito K, Fukuda Y & Toyoda Y** 1988 Effects of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured in vitro. *Molecular Reproduction and Development* **21** 289–295.
- Nasr-Esfahani MH, Aitken JR & Johnson MH** 1990 Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed in vitro or in vivo. *Development* **109** 501–507.
- Neame PJ & Barry FP** 1993 The link proteins. *Experientia* **49** 393–402.
- Newhall KJ, Criniti AR, Cheah CS, Smith KC, Kafer KE, Burkart AD & McKnight GS** 2006 Dynamic anchoring of PKA is essential during oocyte maturation. *Current Biology* **16** 321–327.
- Niwa K** 1993 Effectiveness of in vitro maturation and in vitro fertilization techniques in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility* **48**(Supplement) 49–59.
- Norberg HS** 1973 Ultrastructural aspects of the preattached pig embryo: cleavage and early blastocyst stages. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte* **143** 95–114.
- Olin AI, Morgelin M, Sasaki T, Timpl R, Heinegard D & Aspberg A** 2001 The proteoglycans aggrecan and Versican form networks with fibulin-2 through their lectin domain binding. *The Journal of Biological Chemistry* **276** 1253–1261.
- Opiela J** 2009 Apoptosis in preimplantation bovine embryos and methods used for its detection. *Annals of Animal Science* **9** 3–16.
- Pantaleon M & Kaye PL** 1998 Glucose transporters in preimplantation development.

- Reviews of Reproduction* **3** 77–81.
- Park JY, Su TQ, Ariga M, Law E, Jin SL & Conti M** 2004 EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science* **303** 682–684.
- Parkar AA, Kahmann JD, Howat SL, Bayliss MT & Day AJ** 1998 TSG-6 interacts with hyaluronan and aggrecan in a pH-dependent manner via a common functional element: implications for its regulation in inflamed cartilage. *FEBS Letters* **428** 171–176.
- Partridge RJ & Leese HJ** 1996 Consumption of amino acids by bovine preimplantation embryos. *Reproduction, Fertility and Development* **8** 945–950.
- Peng XR, Hsueh AJ, LaPolk PS, Bjersing L & Ny T** 1991 Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. *Endocrinology* **129** 3200–3207.
- Petters RM & Wells KD** 1993 Culture of pig embryos. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* **48** 61–73.
- Pike LJ, Marquardt H, Todaro GJ, Gallis B, Casnellie JE, Bornstein P & Krebs EG** 1982 Transforming growth factor and epidermal growth factor stimulate the phosphorylation of a synthetic, tyrosine-containing peptide in a similar manner. *The Journal of Biological Chemistry* **257** 14628–14631.
- Polge C, Wilmut I & Rowson LEA** 1974 The low temperature preservation of cow, sheep and pig embryos. *Cryobiology* **11** 560.
- Pollard JW & Leibo SP** 1994 Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology* **41** 101–106.
- Procházka R, Blaha M & Nemcova L** 2012 Signaling pathways regulating FSH- and amphiregulin-induced meiotic resumption and cumulus cell expansion in the pig. *Reproduction* **144** 535–546.
- Procházka R, Petlach M, Eva Nagyová E & Němcová L** 2011 Effect of epidermal growth factor-like peptides on pig cumulus cell expansion, oocyte maturation, and acquisition of

- developmental competence in vitro: comparison with gonadotropins. *Reproduction* **141** 425–435.
- Procházka R, Srsen V, Nagyova E, Miyano T & Flechon JE** 2000 Developmental regulation of effect of epidermal growth factor on porcine oocyte cumulus cell complexes: nuclear maturation, expansion, and F-actin remodeling. *Molecular Reproduction and Development* **56** 63–73.
- Rall WF & Fahy GM** 1985 Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* **313** 573–575.
- Rieger D** 1992 Relationships between energy metabolism and development of early mammalian embryos. *Theriogenology* **37** 75–91.
- Robl JM & Davis DL** 1981 Effects of serum on swine morulae and blastocysts in vitro. *Journal of Animal Science* **52** 1450–1456.
- Rodriguez KF, Petters RM, Crosier AE & Farin CE** 2002 Roles of gene transcription and PKA subtype activation in maturation of murine oocytes. *Reproduction* **123** 799–806.
- Russell DL, Ochsner SA, Hsieh M, Mulders S & Richards JS** 2003 Hormone-regulated expression and localization of versican in the rodent ovary. *Endocrinology* **144** 1020–1031.
- Salustri A** 2000 Paracrine actions of oocytes in the mouse pre-ovulatory follicle. *The International Journal of Developmental Biology* **44** 591–597.
- Salustri A, Yanagishita M & Hascall VC** 1989 Synthesis and accumulation of hyaluronic acid and proteoglycans in the mouse cumulus cell-oocyte complex during follicle-stimulating hormone-induced mucification. *The Journal of Biological Chemistry* **264** 13840–13847.
- Sanchez-Osorio J, Cuello C, Gil MA, Parrilla I, Maside C, Almiñana C, Lucas X, Roca J, Vazquez JM & Martinez EA** 2010 Vitrification and warming of *in vivo*-derived porcine embryos in a chemically defined medium. *Theriogenology* **73** 300–308.
- Schini SA & Bavister BD** 1988 Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. *Biology of Reproduction* **39** 1183–1192.
- Schreiber AB, Winkler ME & Derynck R** 1986 Transforming growth factor- $\alpha$ : a more potent

- angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science* **232** 1250–1253.
- Schultz GA, Kaye PL, Mckay DJ & Johnson MH** 1981 Endogenous amino acid pool sizes in mouse eggs and preimplantation embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* **61** 387–393.
- Sekiguchi T, Mizutani T, Yamada K, Kajitani T, Yazawa T, Yoshino M & Miyamoto K** 2004 Expression of epiregulin and amphiregulin in the rat ovary. *Journal of Molecular Endocrinology* **33** 281–291.
- Sekiguchi T, Mizutani T, Yamada K, Yazawa T, Kawata H, Yoshino M, Kajitani T, Kameda T, Minegishi T & Miyamoto K** 2002 Transcriptional regulation of the epiregulin gene in the rat ovary. *Endocrinology* **143** 4718–4729.
- Shi S, Grothe S, Zhang Y, O'Connor-McCourt MD, Poole AR, Roughley PJ & Mort JS** 2004 Link protein has greater affinity for versican than aggrecan. *The Journal of Biological Chemistry* **279** 12060–12066.
- Shimada M, Hernandez-Gonzalez I, Gonzalez-Robayna I & Richards JS** 2006 Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor. *Molecular Endocrinology* **20** 1352–1365.
- Shimada M, Nishibori M, Isobe N, Kawano N & Terada T** 2003 Luteinizing hormone receptor formation in cumulus cells surrounding porcine oocytes and its role during meiotic maturation of porcine oocytes. *Biology of Reproduction* **68** 1142–1149.
- Singh B & Armstrong DT** 1995a Transforming growth factor  $\alpha$  gene expression and peptide localization in porcine ovarian follicles. *Biology of Reproduction* **53** 1429–1435.
- Singh B, Barbe GJ & Armstrong DT** 1993 Factors influencing resumption of meiotic maturation and cumulus expansion of porcine oocyte-cumulus cell complexes in vitro. *Molecular Reproduction and Development* **36** 113–119.
- Singh B, Meng L, Rutledge JM & Armstrong DT** 1997 Effects of epidermal growth factor and follicle-stimulating hormone during in vitro maturation on cytoplasmic maturation of

- porcine oocytes. *Molecular Reproduction and Development* **46** 401–407.
- Singh B, Rutledge JM & Armstrong DT** 1995b Epidermal growth factor and its receptor gene expression and peptide localization in porcine ovarian follicles. *Molecular Reproduction and Development* **40** 391–399.
- Steeves CL, Hammer MA, Walker GB, Rae D, Stewart NA & Baltz JM** 2003 The glycine neurotransmitter transporter GLYT1 is an organic osmolyte transporter regulating cell volume in cleavage-stage embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100** 13982–13987.
- Sturmey RG & Leese HJ** 2003 Energy metabolism in pig oocytes and early embryos. *Reproduction* **126** 197–204.
- Su YQ, Wigglesworth K, Pendola F, O'Brien MJ & Eppig JJ** 2002 Mitogen activated protein kinase activity in cumulus cells is essential for gonadotropin-induced oocyte meiotic resumption and cumulus expansion in the mouse. *Endocrinology* **143** 2221–2232.
- Su YQ, Xia GL, Byskov AG, Fu GD & Yang CR** 1999 Protein kinase C and intracellular calcium are involved in follicle-stimulating hormone-mediated meiotic resumption of cumulus cell-enclosed porcine oocytes in hypoxanthine-supplemented medium. *Molecular Reproduction and Development* **53** 51–58.
- Sun GW, Kobayashi H, Suzuki M, Kanayama N & Terao T** 2002 Link protein as an enhancer of cumulus cell-oocyte complex expansion. *Molecular Reproduction and Development* **63** 223–231.
- Sun QY, Lai L, Bonk A, Prather RS & Schatten H** 2001 Cytoplasmic changes in relation to nuclear maturation and early embryo developmental potential of porcine oocytes: effects of gonadotropins, cumulus cells, follicular size, and protein synthesis inhibition. *Molecular Reproduction and Development* **59** 192–198.
- Sur JH, Doster AR, Galeota JA & Osorio FA** 2001 Evidence for the Localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigen and RNA in ovarian follicles in gilts. *Veterinary Pathology* **38** 58–66.

**Suzuki C & Yoshioka K** 2006 Effects of amino acid supplements and replacement of polyvinyl alcohol with bovine serum albumin in porcine zygote medium. *Reproduction, Fertility and Development* **18** 789–795.

**Suzuki M, Misumi K, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Ohnuma K, Fuchimoto D, Onishi A, Iwamoto M, Saito N, Nagai T & Kikuchi K** 2006 Successful piglet production by IVF of oocytes matured in vitro using NCSU-37 supplemented with fetal bovine serum. *Theriogenology* **65** 374–86.

**Takahashi Y & First NL** 1992 *In vitro* development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* **37** 963–978.

**Takahashi Y & Kanagawa H** 1998 Effects of glutamine, glycine and taurine on the development of *in vitro* fertilized bovine zygotes in a chemically defined medium. *The Journal of Veterinary Medical Science* **60** 433–437.

**Tartia AP, Rudraraju N, Richards T, Hammer MA, Talbot P & Baltz JM** 2009 Cell volume regulation is initiated in mouse oocytes after ovulation. *Development* **136** 2247–2254.

**Telford NA, Watson AJ & Schultz GA** 1990 Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Molecular Reproduction and Development* **26** 90–100.

**Thibier M & Nibart M** 1987 Disease control and embryo imports. *Theriogenology* **27** 37–47.

**Thompson JG, Sherman ANM, Allen NW, McGowan LT & Tervit HR** 1998 Protein content, synthesis and uptake in pre-elongation stage bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development* **50** 139–145.

畜産統計 2016 農林水産省大臣官房統計部.

**Tirone E, D'Alessandris C, Hascall VC, Siracusa G & Salustri A** 1997 Hyaluronan synthesis by mouse cumulus cells is regulated by interactions between follicle-stimulating hormone (or epidermal growth factor) and a soluble oocyte factor (or transforming growth factor beta 1). *The Journal of Biological Chemistry* **272** 4787–4794.

- Tsafriri A, Vale W & Hsueh AJW** 1989 Effects of transforming growth factors and inhibin-related proteins on rat preovulatory graafian follicles in vitro. *Endocrinology* **125** 1857–1862.
- Uhm SJ, Gupta MK, Yang JH, Chung H-J, Min TS & Lee HT** 2010 Epidermal growth factor can be used in lieu of follicle-stimulating hormone for nuclear maturation of porcine oocytes in vitro. *Theriogenology* **73** 1024–1036.
- Van Winkle LJ & Campione AL** 1996 Amino acid transport regulation in preimplantation mouse embryos: effects of amino acid content and pre- and peri-implantation development. *Theriogenology* **45** 69–90.
- Vatzias G & Hagen DR** 1999 Effects of porcine follicular fluid and oviduct-conditioned media on maturation and fertilization of porcine oocytes in vitro. *Biology of Reproduction* **60** 42–48.
- Wang WH, Abeydeera LR, Han YM, Prather RS & Day BN** 1999 Morphologic evaluation and actin filament distribution in porcine embryos produced in vitro and in vivo. *Biology of Reproduction* **60** 1020–1028.
- Wang WH, Abeydeera LR, Prather RS & Day BN** 1998 Morphologic comparison of ovulated and *in vitro*-matured porcine oocytes, with particular reference to polyspermy after in vitro fertilization. *Molecular Reproduction and Development* **49** 308–316.
- Watson AJ** 1992 The cell biology of blastocyst development. *Molecular Reproduction and Development* **33** 492–504.
- Watson AJ** 2007 Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *Journal of Animal Science* **85** 1–3.
- Weakley BS** 1976 Variations in mitochondrial size and ultrastructure during germ cell development. *Cell and Tissue Research* **169** 531–550.
- Wilmot I** 1974 The low temperature preservation of mammalian embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* **31** 513–514.

- Wrathall AE** 1995 Embryo transfer and disease transmission in livestock: a review of recent research. *Theriogenology* **43** 81–88.
- Wright RW** 1977 Successful culture in vitro of swine embryos to the blastocyst stage. *Journal of Animal Science* **44** 854–858.
- Wu J, Dent P, Jelinek T, Wolfman A, Weber MJ & Sturgill TW** 1993 Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3', 5'-monophosphate. *Science* **262** 1065–1069.
- Xia P, Rutledge J & Armstrong DT** 1995 Expression of glycine cleavage system and effect of glycine on *in vitro* maturation, fertilization and early embryonic development in pigs. *Animal Reproduction Science* **38** 155–165.
- Yamashita Y, Nishibori M, Terada T, Isobe N & Shimada M** 2005 Gonadotropin-induced delta14-reductase and delta7-reductase gene expression in cumulus cells during meiotic resumption of porcine oocytes. *Endocrinology* **146** 186–194.
- Ye J, Campbell KH, Craigon J & Luck MR** 2005 Dynamic changes in meiotic progression and improvement of developmental competence of pig oocytes in vitro by follicle-stimulating hormone and cycloheximide. *Biology of Reproduction* **72** 399–406.
- Yeh J, Lee GY & Anderson E** 1993 Presence of transforming growth factor-alpha messenger ribonucleic acid (mRNA) and absence of epidermal growth factor mRNA in rat ovarian granulosa cells, and the effects of these factors on steroidogenesis in vitro. *Biology of Reproduction* **48** 1071–1081.
- Yoshida M, Ishizaki Y, Kawagishi H, Bamba K & Kojima Y** 1992 Effects of pig follicular fluid on maturation of pig oocytes in vitro and on their subsequent fertilizing and developmental capacity in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility* **95** 481–488.
- Yoshida Y, Yoshida M & Bamba K** 1998 Detection of growth factor mRNAs in porcine cumulus-oocyte complexes during maturation in vivo and in vitro. *Journal of reproduction and development* **44** 121–128.
- Yoshioka K, Suzuki C, Itoh S, Kikuchi K, Iwamura S & Rodriguez-Martinez H** 2003

- Production of piglets derived from *in vitro*-produced blastocysts fertilized and cultured in chemically defined media: effect of theophylline, adenosine, and cysteine during *in vitro* fertilization. *Biology of Reproduction* **69** 2092–2099.
- Yoshioka K, Suzuki C & Onishi A** 2008 Defined system for *in vitro* production of porcine embryos using a single basic medium. *Journal of Reproduction and Development* **54** 208–213.
- Yoshioka K, Suzuki C, Tanaka A, Anas IMK & Iwamura S** 2002 Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biology of Reproduction* **66** 112–119.
- Yoshioka S, Ochsner S, Russell DL, Ujioka T, Fujii S, Richards JS & Espey LL** 2000 Expression of tumor necrosis factor-stimulated gene-6 in the rat ovary in response to an ovulatory dose of gonadotropin. *Endocrinology* **141** 4114–4119.
- Yuan B, Liang S, Jin YX, Kwon JW, Zhang JB & Kim NH** 2016 Progesterone influences cytoplasmic maturation in porcine oocytes developing *in vitro*. *PeerJ* 2454 1–16.
- Yuan W, Lucy MC & Smith MF** 1996 Messenger ribonucleic acid for insulin-like growth factors-I and -II, insulin-like growth factor-binding protein-2, gonadotropin receptors, and steroidogenic enzymes in porcine follicles. *Biology of Reproduction* **55** 1045–1054.
- Zhang M, Ouyang H & Xia G** 2009 The signal pathway of gonadotrophins-induced mammalian oocyte meiotic resumption. *Molecular Human Reproduction* **15** 399–409.
- Zhang M, Xia G, Zhou B & Wang C** 2007 Gonadotropin-controlled mammal oocyte meiotic resumption. *Frontiers in Bioscience* **12** 282–296.
- Zhang Y, Ikejima K, Honda H, Kitamura T, Takei Y & Sato N** 2000 Glycine prevents apoptosis of rat sinusoidal endothelial cells caused by deprivation of vascular endothelial growth factor. *Hepatology* **32** 542–546.
- Zuelke KA & Brackett BG** 1990 Luteinizing hormone-enhanced *in vitro* maturation of bovine oocytes with and without protein supplementation. *Biology of Reproduction* **43** 784–787.