

卵子成熟が ZP 弾性率および卵子品質に与える影響

村山嘉延¹⁾

1) 日大工・電気電子

1. はじめに

未成熟卵子を体外で排卵状態まで培養する体外成熟 (in vitro maturation: IVM) 技術は、マウスにおいて卵成熟ならびにそれに続く発生のメカニズムの解明に用いられる。加えて本来個体形成に寄与しない未成熟卵からも卵子を得ることが可能となるので、ヒト不妊治療への応用も期待される。しかし、不十分な IVM は、受精能、活性化能、胚発生、妊娠率、胎子の分娩時体重、流産率等様々な影響を及ぼす。卵子が正常に成熟したかを判断するとき、核の成熟はその形態から容易に判断することができるが、細胞質の成熟を顕微鏡下で観察することはできない。卵子成熟の指標となるものの一つに、卵子-卵丘細胞複合体 (cumulus-oocyte complex: COCs) の形態評価があるが、卵操作のために卵丘細胞を剥離した後に IVM を行った卵子は、さらにその成熟を判断することが困難となる。卵子の周りを取り囲んでいる卵丘細胞は、卵子の細胞質成熟をコントロールし、その機能が排卵を誘起し、かつ受精に際しても重要な役割を果たす。しかし、未成熟卵子である GV 卵子に、核置換および精子や遺伝子の細胞質内注入といったマイクロマニピュレーションを行う際には、卵丘細胞が操作の妨げとなるので、卵丘細胞を剥ぐことは避けられない。卵丘細胞を裸化した GV 卵子は、卵成熟や、それに続く胚発生に影響を及ぼす危険性を考慮する必要がある。そこで本実験では、マイクロタクトイルセンサ (MTS) を用い、マウス単為発生卵の発生過程および IVM における成熟過程における硬度変化を明らかにすることを目的とした。

2. 実験方法と結果

【未成熟卵子の採卵および体外成熟】

供試動物は、BDF1 系雌マウス 7~8 週令を用いた。未成熟な卵核期 (germinal vesicle: GV) の卵子は、10IU の妊馬血清性腺刺激ホルモン (pregnant mare's serum gonadotropin: PMSG) を腹腔内投与 46~48 時間後、Hepes 緩衝 α MEM 中で卵巣から卵胞を 27G の注射針でかきさくことにより採取した。実験には、実体顕微鏡下で卵丘細胞が緊密に付着し、卵細胞質の均一な卵丘-卵子複合体 (cumulus-oocyte complexes: COCs) のみを用いた (図 3-2-1)。IVM 過程で MTS 測定を行った未成熟卵子の COCs は、測定の妨げとなるので、採卵直後に 0.1% ヒアルロニ

ダーゼ添加 α MEM により卵丘細胞を裸化し、3mg/ml BSA 添加 α MEM 培地中で 37°C、5% CO₂、95%air の条件下で培養をおこなった。成熟過程で MTS 測定を行わなかった卵子については、COCs のまま同条件下で IVM を行った。

【体内成熟卵子の採取、人為的活性化、体外成熟】

第 2 減数分裂中期 (metaphase II: MII) の卵子は、PMSG 10IU を供試マウスに腹腔内投与 48 時間後にヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (human chorionic gonadotropin: hCG) 5IU を投与することにより得た。hCG 投与 12~18 時間後に卵管膨大部より採卵した COCs (図 9) は M2 で洗浄後、0.1% ヒアルロニダーゼ添加 M2 により卵丘細胞を裸化した。得られた卵子は洗浄後 10mM SrCl₂、5 μ g/ml サイトカラシン B (CB) 添加 Ca²⁺-free KSOM で 2.5 時間、5 μ g/ml CB 添加 KSOM で 3.5 時間、計 6 時間人為的活性化処理を行った。

処理後の卵子は、実体顕微鏡下で前核形成を確認することにより活性化状況を調べた。このとき、2 前核 1 極体 (2PN1PB) が観察された卵子のみを活性化卵とし、KSOM 中で 37°C、5% CO₂、95%air の条件下で発生培養を行った。

【実験 1】人為的活性化と ZP 弾性

塩化ストロンチウムを用いて人為的活性化処理を施したマウス卵子の単為発生における弾性率の変化を調べた。卵子および胚は MII、前核期 (pronuclei: PN)、2 cell、および桑実胚 (compaction morula: CM) の各発生ステージにおいて弾性率を測定した。測定した結果を図 1 に示す。活性化にともない、PN 期には有意に弾性率が増加した。

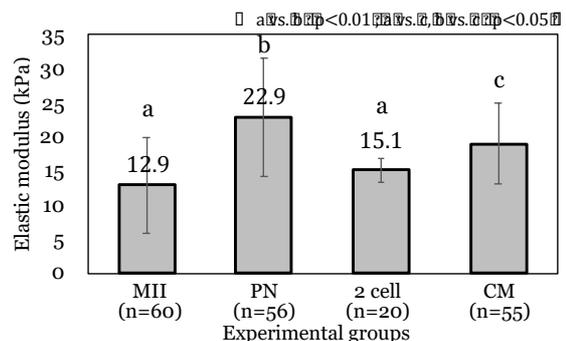


図 1. 人為的活性化と ZP 弾性

【実験 2】 裸化卵子の体外成熟過程における ZP 弾性率変化

マウス裸化卵子の体外成熟およびそれに続く単為発生の各ステージにおいて弾性率を測定した。COCs は、0.1%ヒアルロニダーゼ添加 α MEM により卵丘細胞を裸化し、3mg/ml BSA 添加 α MEM 培地中で 37°C、5% CO₂、95%air の条件下で体外培養 (IVM) をおこなった。GV 期から、卵核胞崩壊 (germinal vesicle breakdown : GVBD)、第 1 減数分裂中期 (metaphase I : M I)、第 1 減数分裂後期 (anaphase I : A I) - 終期 (telophase I : T I)、および MII までの各成熟過程における弾性率の測定は、IVM 過程でそれぞれ行った。ステージが明確ではない卵子は、測定後 Hoechst33342 で核を染色することにより減数分裂のステージを調べた。測定した結果を図 2 に示す。マウス卵子の弾性率は、卵子成熟過程において有意に減少した。

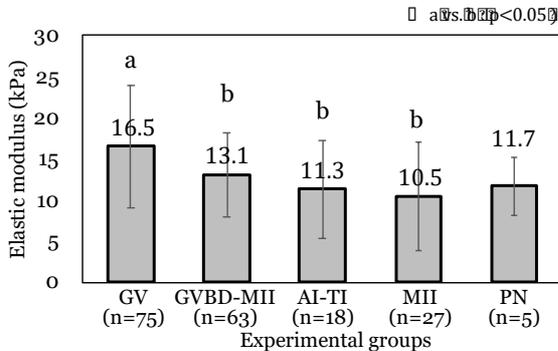


図 2. 裸化卵子の体外成熟過程における ZP 弾性率変化

【実験 3】 卵丘細胞の付着状態と ZP 弾性

マウス卵子の GV 卵子採卵時における卵丘細胞の付着状態が違う卵子の硬さを調べた。未成熟卵子に付着している卵丘細胞の状態に応じて、卵丘細胞が緊密に接着しているもの (+)、卵丘細胞が一部剥離しているもの (\pm)、および卵丘細胞の付着が殆ど見られないもの (-) の 3 区に分けて測定した。測定した結果を図 3 に示す。

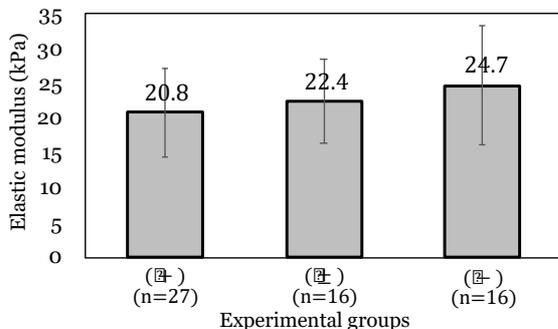


図 3. 卵丘細胞の付着状態と ZP 弾性

採卵時の卵丘細胞付着状態による GV 卵子の硬さによる統計学的な差は見られなかったが、卵

丘細胞の付着が悪い状態であるほど、ZP 弾性率が高い傾向を示した。

【実験 4】 体内および体外成熟卵の ZP 弾性

マウス卵子の成熟の違いによる MII 卵子の硬さの違いを調べた。過剰排卵処理によって得られた体内成熟 (*in vivo*) 由来卵子および GV 期に採卵し、体外成熟 (*in vitro*) 由来卵子を、ヒアルロニダーゼ処理後に硬度測定を行った。測定した結果を図 4 に示す。

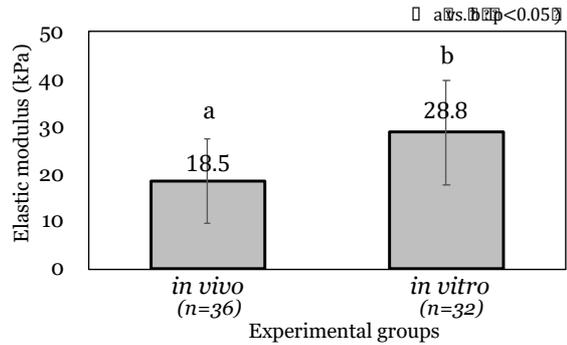


図 4. 体内および体外成熟卵の ZP 弾性

3. まとめ

本実験において、ストロンチウムを用いて活性化処理を施したマウス卵子は、通常受精と同じように透明帯硬化が起きているという結果を得た。しかしながら、卵丘細胞を裸化して IVM を行った卵子は、形態学的に成熟卵と同様であっても、同様に活性化処理をおこなっても透明帯硬化が起こらなかった。このことから、卵丘細胞裸化卵子の IVM では、細胞質ならびに透明帯の成熟が不十分なのではないかと考えられる。実験 2 においては、卵成熟に伴い卵子硬度が軟化するということが力学的に明らかになったが、実験 3 において卵丘細胞の付着が弱い細胞ほど ZP 硬化の傾向がみられたことから、成熟による ZP 軟化が不純分であったか、あるいは表層顆粒の分泌が起こり ZP 硬化した可能性が考えられる。最後に、*in vivo* 成熟した卵子透明帯の弾性率が 18.5kPa まで軟化したのに対し、*in vitro* 成熟した卵子透明帯は 28.8kPa であり有意に高い結果を得た。

本研究の結果から、卵丘細胞を裸化した GV 卵子は、卵成熟や、それに続く胚発生に影響を及ぼす危険性を考慮する必要があると同時に、卵子成熟の過程が受精後の受精卵品質に影響を及ぼす可能性があることが示唆された。

加えて、卵子の成熟度を判断するときに、核の成熟は形態学的に判断できるが、細胞質の成熟を顕微鏡下で観察することはできない。本研究結果は卵操作のために卵丘細胞を剥離した後に IVM を行った卵子の品質を評価できる可能性を示唆している。