

卵胞の初期発達と卵母細胞の発育

宮野 隆

神戸大学農学部応用動物学科

はじめに

雌の哺乳類では、性周期の間に1度だけ決まった数の卵母細胞が卵巣内で成熟し、卵管へと排卵される。一生に排卵される成熟卵の総数は、動物の性周期の長さや生殖可能な期間を考えればそれほど多くはないが、哺乳類の卵巣には、魚やカエルと同じように、成熟卵の素となる小さな卵母細胞が莫大な数存在している。卵巣内にはウシ1頭で約12万個、ヒトでは30万個あまりの卵母細胞が存在している。もっとも小さな原始卵胞中の卵母細胞の直径はウシやブタやヒトでは約30 μm 、マウスやハムスターでは約20 μm である。これらの卵母細胞は、動物の生涯を通して次々と発育を開始していく(図1)。動物が性成熟に達する頃までには、このうちのいくつかのものが最終の大きさに達する。この大きさはウシやブタやヒトでは約120 μm であり、マウスやハムスターでは約75 μm である。性周期が開始すると、性周期毎に発育を完了した卵母細胞が順に成熟して排卵されることになる。

卵巣内の小さな卵母細胞を用いることができれば、体外受精に利用できる卵母細胞数は飛躍的に増加すること

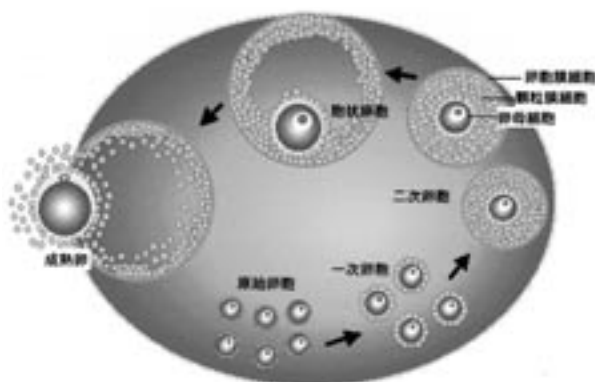


図1 卵巣内での卵母細胞の発育と卵胞の発達

になるが、これらの卵母細胞は体外で培養しても成熟しない。受精・発生能力をもった成熟卵を作り出すためには、これらの小さな卵母細胞を何らかの方法で最終の大きさへと発育させる必要がある。現在、卵巣内の小さな卵母細胞を発育させるには2つの方法がある。1つは卵巣から取り出した卵母細胞を体外で長期間培養することによって発育させる方法であり、もう1つは卵母細胞を免疫不全マウスなどに移植することによって発育させる方法である。

体外発育培養

1996年にジャクソン研究所のEppigらは、卵巣の器官培養法と卵母細胞一細胞膜細胞複合体培養法を組み合わせ、マウス卵巣内の原始卵胞中の直径約20 μm の卵母細胞を体外で最終の大きさへと発育させ、体外成熟、体外受精させたのち、雌のマウスに移植して産仔を得ることに成功した[1]。この方法は現在さらに改良されているが、マウス以外の動物種では、原始卵胞中の卵母細胞を体外培養によって最終の大きさにまで発育させて産仔を得たとの報告はない。大型の哺乳類では、発育のやや進んだ卵母細胞を最終の大きさへと発育させた報告として、ブタ(直径約80 μm) [2]、ウシ(直径90~99 μm) [3] およびヒツジ(直径約80 μm) [4]での報告があるにすぎない。私たちの研究グループは、徳島県の畜産研究所と共同で、直径約0.5 mmの初期の胞状卵胞から取り出した卵母細胞(直径90~99 μm)を体外で2週間培養することによって発育させ、その後、体外成熟、体外受精することによって仔ウシを出産させることに成功した[5]。この結果は、大型の哺乳類としては最初の報告となったが、約300個の卵母細胞を培養して発育したものは100個あまり、体外成熟、体外受精後に胚盤胞へと発生した胚はこのうちの6個であり、効率はきわめて悪い。卵巣内でウシの原始卵胞中の卵母細胞は数ヶ月間をかけてゆっくりと発育することから、ウシの卵母細胞を体外で発育させるには、卵胞や卵母細胞の生存性を維持できる長期培養法が必要である。卵母細胞の体外発育培養は、いずれの種においても現在のところ1

連絡先: 宮野 隆, 神戸大学農学部応用動物学科,
〒657-8501 神戸市灘区六甲台町1-1
TEL: 073-803-5806
FAX: 078-803-5807
E-mail: miyano@kobe-u.ac.jp



図2 SCID マウスの腎臓被膜下に移植されたウシの卵胞の組織像
移植6週間後には、ウシの二次卵胞は胞状卵胞へと発達し、内部には大きく発育した卵母細胞がみられる。写真下方は SCID マウスの腎臓組織。

ヵ月間ぐらいが限度である。

異種移植

長期間の体外培養に替わる方法として、遺伝的に免疫不全なヌードマウスやヌードラット、SCID マウス（スキッドマウス：Severe Combined Immuno-Deficiency mouse）に移植する方法がある。これまで、SCID マウスの腎臓の被膜下に移植されたネコやヒツジの小さな卵胞が数ヵ月後に胞状卵胞へと発達することや [6]、SCID マウスに移植されたヒトの卵胞が17週間生存し続けることが報告されている [7]。私たちのグループも、長期培養が困難な直径 約 $50\mu\text{m}$ のウシの卵母細胞を含む二次卵胞や、さらに小さな原始卵胞を含む卵巣の組織片を SCID マウスに移植し、卵母細胞や卵胞の発達を観察している。二次卵胞中の直径 $50\mu\text{m}$ の卵母細胞は、移植6週間後には直径 $120\mu\text{m}$ へと発育する (図2) [8]。しかし、SCID マウスから回収したウシの卵母細胞は、発育をほぼ完了しているものの、その後の成熟培養によって成熟する割合は低く、未だ受精させるには至っていない。また、これよりさらに小さな原始卵胞中の直径 $30\mu\text{m}$ のウシやブタの卵母細胞を SCID マウスに移植すると、原始卵胞は移植片中で生存し続けるが、まったく発達しない [8]。

私たちは、と畜場で採取した成体（ブタの場合には性成熟直前）の卵巣から発達段階の異なる卵胞を顕微鏡下に採取し、異種移植実験に用いている。二次卵胞以上の発達段階にある卵胞は、体外培養においても異種移植に

おいても生存性を維持さえしてやれば、その後も発達し続け、内部の卵母細胞は発育する。一方、原始卵胞は異種移植片中で生存し続けるが発達せず、内部の卵母細胞も発育しない。このことは、原始卵胞の発達開始あるいは卵母細胞の発育開始にはなんらかの特殊な刺激が必要であり、いったん発達が開始すれば、卵胞は発達が完了するまで自律的に発達し続ける（卵母細胞も発育し続ける）ことを示唆している [9]。培養あるいは異種移植実験によって「原始卵胞は発達する」とするこれまでの報告を注意してみると、材料には原始卵胞やきわめて発達初期の卵胞のみを含む胎児や新生児の卵巣組織が用いられていることに気付く。胎児や新生児の原始卵胞は自発的に発達を開始することができるが、雌の動物が成長する過程で、何らかの刺激を必要とするように原始卵胞（あるいは原始卵胞中の卵母細胞）の性質が変化している可能性が考えられる。

おわりに

卵胞は、卵母細胞と、卵母細胞を直接取り囲む顆粒膜細胞、さらにその外側を取り囲む卵胞膜細胞の3種の細胞から成り立っており、この3者がお互いに種々の因子を出し合い、刺激し合いながら、卵母細胞は最終の大きさへと発育すると考えられている。未だ実験段階ではあるが、卵胞や卵母細胞の体外培養や異種移植によって、これまで組織学的な知見を中心に語られてきた卵胞の初期発達や卵母細胞発育の制御機構を動的に研究することが可能となってきており、今後これらの細胞間の相互作用が解明されていくものと思われる [10]。

卵巣内の卵母細胞の利用を目的とした体外培養法や異種移植法には、未解決の問題が数多く残されているが、将来的には実用化されると思われる。家畜で実用化されれば、優れた形質をもつ成熟卵を大量に供給できることになる。また、凍結保存技術と組み合わせて「Oocyte Banking」が可能となるかも知れない。卵巣内に数多く存在する原始卵胞は体積が小さく、周囲の少量の卵巣組織とともに容易に凍結保存することができる。卵巣内の未発育な卵母細胞を凍結保存し、必要な時に融解して、体外培養や異種移植によって最終の大きさへと発育させ、成熟させることができれば、種の保存やヒトの不妊症の新たな治療法となりうる。しかし、実用化には、卵胞の発達開始/卵母細胞の発育開始の人為的制御が、大きな課題として残されている。

文 献

1. Eppig JJ, O'Brien MJ (1966) Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod* 54, 197-207.
2. Hirao Y, Nagai T, Kubo M, Miyano T, Miyake M, Kato S (1994) In vitro growth and maturation of pig oocytes. *J Reprod Fertil* 100, 333-339.
3. Harada M, Miyano T, Matsumura K, Osaki S, Miyake M, Kato S (1997) Bovine oocytes from early antral follicles grow to meiotic competence in vitro: effect of FSH and hypoxanthine. *Theriogenology* 48, 743-755.
4. Newton H, Picton H, Gosden RG (1999) In vitro growth of oocyte-granulosa cell complexes isolated from cryopreserved ovine tissue. *J Reprod Fertil* 115, 141-150.
5. Yamamoto K, Otoi T, Koyama N, Horikita N, Tachikawa S, Miyano T (1999) Development to live young from bovine small oocytes after growth, maturation and fertilization in vitro. *Theriogenology* 52, 81-89.
6. Gosden RG, Boulton MI, Grant K, Webb R (1994) Follicular development from ovarian xenografts in SCID mice. *J Reprod Fertil* 101, 619-623.
7. Oktay K, Newton H, Mullan J, Gosden RG (1998) Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. *Hum Reprod* 13, 1133-1138.
8. Senbon S, Ota A, Tachibana M, Miyano T (2003) Bovine oocytes in secondary follicles grow and acquire meiotic competence in severe combined immunodeficient mice. *Zygote* 11, 139-149.
9. Miyano T (2003) Bringing up small oocytes to eggs in pigs and cows. *Theriogenology* 59, 61-72.
10. Senbon S, Hirao Y, Miyano T (2003) Interactions between the oocyte and surrounding somatic cells in follicular development : Lessons from in vitro culture. *J Reprod Dev* 49, 259-269.