

= ミニレビュー =

体外で成熟・受精したブタ卵の異常と修復について

Abnormality and recovery of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*

菊地 和弘^{1,†}, ソムファイ タマス², 中井 美智子¹, 永井 卓²

Kazuhiro KIKUCHI^{1, †}, Tamas SOMFAI², Michiko NAKAI¹ and Takashi NAGAI²

¹独立行政法人 農業生物資源研究所 動物科学研究領域, 〒305-8602 茨城県つくば市

²独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所 家畜育種繁殖研究領域,
〒305-0901 茨城県つくば市

[†]責任著者: kiku@affrc.go.jp

要旨

家畜・大動物、特にウシでは、体外胚生産技術いわゆる卵母細胞(以下、卵)を体外成熟・受精し、さらにその受精卵を体外培養して胚を作製する技術が、子畜生産の現場に導入されている。ブタにおいても、この技術が遺伝資源の保存や利用上で重要な技術となっている。いずれにおいても作製された体外生産胚は正常な発生を担保するものであることが求められる。しかしながら、特にブタでは正常な胚を効率的に作製する上で2つの重大な問題点が残っている。1つは多精子受精、もう1つは未成熟卵への精子侵入に起因する体外生産胚の異常な倍数性の問題である。いずれも異常倍体(多倍体)の胚となり、胚発生の過程で発生を停止し死滅してしまうと考えられている。これらの問題点を回避するためには、体外受精の前に成熟卵を慎重に選抜すること、そして受精の過程が正常に進行しているかどうか(多精子侵入でないか、あるいは1個の雄性前核が形成されているか)を確実に確認して正常受精卵を選抜することが重要となる。ところが、私たちの最近の研究では、多精子受精に由来した受精卵(多倍体卵と考えられる)のいくつかは、正常な発生能を有する2倍体胚へ発生することを確認している。しかし、多精子受精卵が正常な2倍体胚へと発生する機構についてはあまりよく知られていない。この機構を解明することにより、ブタに限らず他の動物種も含めて、体外胚生産技術、体外成熟卵を用いた形質転換やクローン動物作製といった技術の効率化、さらにはヒトの生殖補助技術の進展にも貢献するものと期待される。本レビューでは、ブタにおける体外成熟ならびに体外受精においていかに異常倍体胚が生じるかについて解説し、さらに胚発生過程での倍数性修復の可能性について検討を行う。

キーワード: ブタ, 体外胚生産, 染色体異常, 多精子受精, 減数分裂

体外生産ブタ胚の正常性について

ブタ卵を体外成熟(*in vitro* maturation, IVM)・体外受精(*in vitro* fertilization, IVF)後に体外培養(*in vitro* culture, IVC)、すなわち体外胚生産(*in vitro* production, IVP)することにより胚盤胞を作出できることはMattioli *et al.* (1989)[32]により初めて報告された。その後、IVP胚を2–4細胞期でレシピエントに移植し子豚がえられた[11,12,32,55]。さらに、胚盤胞期胚の移植による産子作出例が報告されている[21,31]。その後もIVCの改良が

進んでおり、その効率は向上している。しかしながら、IVMやIVFに関して未だ多くの問題を抱えており、それらが胚の低発生能につながり、胚の作製効率や品質の低下を招いていると考えられる。したがって、結果的に胚をレシピエントに移植しても胚の喪失を招くことになる。この問題の主な原因の一つとして、IVP胚の倍数性の異常があげられる。IVP由来の胚盤胞のうち、45.9%が異常倍体(abnormal ploidy)細胞を含むもので、21.2%が多倍体(polyploidy)であること、さらに多倍体胚では

投稿日: 2011年12月27日

掲載決定日: 2011年12月30日

ウェブサイト事前公開日: 2011年12月30日

細胞数が少ない、サイズが小さい、発生速度が遅いなどの影響があることが報告されている[52]。胚の倍数性の異常の原因として、1) IVF中に生じる多精子侵入、2) 第二減数分裂中期(metaphase-II, M-II)以前の未成熟段階で静止している卵への受精によるものと考えられている(図1)。これらの問題を回避するには、卵の未成熟段階での減数分裂静止を防止すること(成熟卵を確実に得ること)、さらに、IVM-IVFで頻発する多精子侵入を防止することが根本的な対処法となるが、現段階の技術をもってしても困難であると考えられる。一方で、このような一部に異常胚が含まれる条件下で胚を作製し、その中から胎子さらには産子への発生・発育を保証する胚のみを選別するというアプローチも重要である。一般には、M-IIまで成熟した卵に、一つの精子が侵入(単精子侵入)した場合に正常な胚が発生すると考えられている。しかしながら、倍数性に異常のある胚でも発生過程でその問題が解決されれば、それを産子作出に利用することも考慮したい。なぜならば、稀少な遺伝資源の場合、IVPの適用には限られた卵巣や精巣からできるだけ多くの配偶子を回収しそれを利用しなければならないからである。古くから倍数性異常の哺乳動物胚が着床後も生存したとの報告がある [3,14,39]。しかし、その詳細や機序は不明なままである。本ミニレビューでは、ブタのIVPにおいて、多精子受精ならびに成熟に至る前の未成熟段階の卵への精子侵入により引き起こされる倍数性異常胚が作られる過程について、先の報告[23]に基づき考察を深める。さらに、ブタのIVPの効率を上げるために、これらの卵の利用についても検討する。

多精子侵入

多精子侵入の成立と制御

多精子侵入とは2つあるいはそれ以上の精子が卵細胞質内に侵入すること、多精子受精とは多精子侵入より引き起こされる受精現象をさす。ブタIVPにおける多精子受精は他の動物種にくらべて顕著で、長らく課題となっている。通常行われるIVFでは卵の周りにきわめて多数の精子が存在し、精子濃度と媒精時間を制御することが多精子侵入の回避には必須である[38]。私たちの研究室で行っているIVFの系では、通常 1×10^5 精子/mlで3時間の媒精を行う。この条件下では、精子は2時間後から卵細胞質内に侵入し、4時間後に約80%の精子侵入卵が得られ、60%は多精子侵入卵である。つまり、20%は単精子侵入卵となる[21,22]。もちろん、使用する精子のロット、処理法、IVF液等により異なってくる。精子のみならず、通常は卵管内で得られる多精子侵入を防止する機序がIVM卵の透明帯には備わっていないため、精子が侵入しても透明帯反応が起こらず多精子侵

入を許容する要因となる[9]。多精子侵入を人為的に防除するため種々の手法が考案されてきた。多くは、卵管内での受精を体外で再現する試みで、ごく少数の受精能獲得精子を卵にアプライさせるものである。例えば、climbing-over-a-wall (COW)法[13]、ストローIVF法[30]あるいはマイクロ流路を使用したIVF法[4]がある。また、卵管内の糖タンパクで卵そのものを処理して透明帯の特性を改善させることも試みられた[26,33]。さらに、卵管上皮細胞[37]、卵管分泌液[24]、卵管特異的な糖タンパク[26,33]、卵胞液[12]、ヒアルロン酸[49]で精子を処理し、精子の受精能獲得、先体の状態や透明帯との結合を制御した。しかしながら、現在でもIVM卵への多精子侵入を完全に防除できるという状況には至っていない。

多精子受精卵の胚発生

単精子受精と多精子受精を区別する最も信頼できる方法は、侵入精子頭部あるいはそれから派生する雄性前核(male pronucleus, MPN)を観察して識別する方法である。残念ながら、ブタやウシなどの動物では卵細胞質内に多量の脂肪滴を含むために実体顕微鏡等でそれらを観察することができない。Hoechst 33342などの蛍光色素を用いた生体染色により精子頭部やMPNを検出する方法がある。しかし、已然として脂肪滴の存在で不鮮明であること、さらには蛍光を落射するため、その後の発生能に影響を与えるという報告[7,40,51,54]があり、実用的な手法ではないと考えられる。その他、哺乳動物卵を遠心処理し、脂肪滴を卵細胞質の辺縁に寄せて、細胞質の大部分を可視化するという方法もある[5]。この方法は、蛍光観察を伴わないため、比較的安全であると考えられる。ブタ卵では、雌雄両前核はIVF後5時間より観察できるようになり、前核形成率は8時間後にプラトーに達し[22]、その後、雌雄前核融合(syngamy)の直前まで存在する。雌雄前核融合の時期は正確には特定されていないが、第一卵割がIVF後20時間頃より観られることから[6]、その直前であると考えられる。そこで、実際にIVF後の胚にこの方法を適用し、単精子侵入卵と多精子侵入卵を区別することが可能かどうかを調べた。IVF後10時間で、極体が2個放出されている卵(成熟卵が精子侵入により活性化された卵と考えられる)を選別し、 $10,000 \times g$ で20分間の遠心処理をおこなった。前核の数により1個(one pronucleus; 1PN)、2個(two pronuclei; 2PN)ならびに3個以上(multiple pronuclei; PPN)の卵を選別した。これらをそれぞれ固定・染色により観察し比較したところ約80%で選別の結果が一致した[44]。また、遠心処理そのものは発生率に影響を及ぼさなかった[43]。この遠心処理・直接前核を観察する選別手法は効果的であると考えられた。

ブタ卵の異常と修復

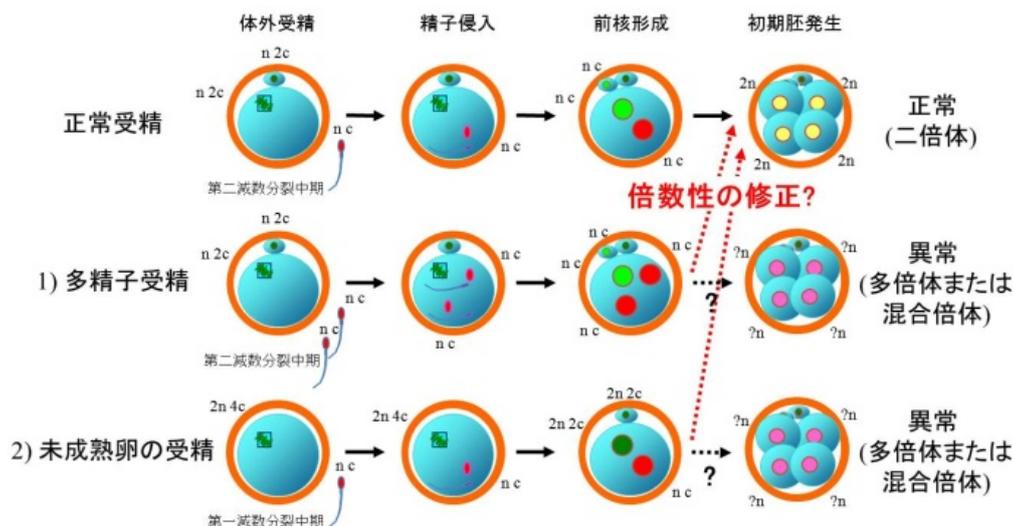


図 1. ブタ卵の体外胚生産において胚に倍索性の異常が生じる機構

正常受精では第二減数分裂中期で精子が 1 個侵入する。成熟卵は第二極体を放出し減数分裂を完了する。卵と精子からは半数体(n)の染色体(あるいはクロマチン)が 1 組(c)ずつ供出される。これらは前核期で DNA 合成がおこる(2n 4c となる)が雌雄前核融合ののち体細胞分裂(卵割)により分けられるため、割球は 2 倍体(2n 2c)となる。1)多精子受精や 2)未成熟卵の受精では、それぞれ精子と卵からのクロマチンを多く含むため正常ではない染色体数となる。そのため前核形成や卵割後の割球に倍索性の異常が生じることが考えられる。

表 1. 2もしくは多前核を有する受精卵を体外培養して得られたブタ胚盤胞の割球数ならびに核数

遠心処理後の 前核の数	卵割した胚 (%) ^a	実体顕微鏡による観察 (%) ^b			固定・核染色による観察			
		2細胞	3細胞	4細胞 ≤	多核割球を有 する胚 (%) ^b	無核割球を有 する胚 (%) ^b	胚あたりの割 球数	胚あたりの核数
2	77.7 ± 6.0 ^c	56.0 ± 6.0 ^c	22.0 ± 6.1	24.9 ± 7.0 ^c	6.9 ± 3.4	34.4 ± 3.1 ^c	2.8 ± 0.1 ^c	2.3 ± 0.1
3 ≤	59.7 ± 6.4 ^d	26.7 ± 4.1 ^d	25.8 ± 3.9	47.7 ± 6.6 ^d	13.9 ± 1.3	57.6 ± 3.8 ^d	3.4 ± 0.1 ^d	2.5 ± 0.1

すべての胚は体外受精後36時間で固定して検査した。平均 ± 標準誤差で表示した。

^a使用した胚に対する割合。^b卵割した胚に対する割合。^{c,d}それぞれの列において異符号間で有意差あり(P < 0.05)。

Somfai *et al.* (2008) [44]より改変。

そこで、前核数により受精卵を分別し別々に培養を行った。1PN卵ならびに2PN卵(それぞれ、単為発生卵ならびに単精子受精卵と考えられる)の卵割率は、PPN卵(多精子受精卵と考えられる)よりも有意に高かった[44]。さらに、2PN卵の胚盤胞への発生率は、前核を有しない卵(未受精卵、0PN卵)あるいはPPN卵よりも高かったが、1PN卵とは差がなかった。ただし、得られた胚盤胞の細胞数に差がなく、胚の品質は同等と思われた。2PN卵とPPN卵の染色体検査を行ったところ、2PN卵から発生した胚盤胞の73.8%は2倍体(diploidy)であり、12.5%は2倍体の細胞を含む混合倍体(mixoploidy)であった。この数値から計算すると、2PN卵から発生した場合、得られた胚盤胞のうち86.3%の胚は2倍体(2n)細胞を含む。ところが、PPN卵の場合は、31.3%が2倍体細胞を含む胚であり、14.5%が2倍体細胞を含む混合倍体であった。同様に計算すると、PPN卵の場合は胚盤胞のうち45.8%が2倍体細胞を含む。これらの結果は、2PN卵だけではなくPPN卵からも2倍体胚が発生でき、正常な胎子や産子を得られる可能性を示している。この私たちのデータ

は、ブタのIVPでは多精子受精に起因すると考えられる染色体異常、多くは多倍体が高率に引き起こされるという報告に一致する[34,41]。また、PPN卵は胚盤胞期まで体外で発生可能である[14]。これらの知見は、IVPで得られる胚盤胞の一部には多精子受精胚が含まれることを示している。さらに、PPN卵をレシピエントに移植した場合、受精後40日で胎子の体細胞を調べるとすべての胎子は2倍体であり、さらに出産した子豚の血液サンプルを調べると2倍体であったとの興味深い報告がある[14]。PPN卵は、体内で発生が進行する間に、侵入精子数が多いという悪影響が中和されることを示している[15]。実際に、IVP胚として2PN卵ならびに前核を3つ有する卵(3PN卵)をレシピエントに移植したところ、産子を得ることに成功した[46]。2PN胚に加え3PN胚も産子へ発生したものと考えられ、多精子受精卵が利用可能であることを示唆している。

多精子受精卵の倍索性修復の機序

多精子受精卵が発生過程で正常な2倍体に修復される機序は未解明な部分が多い。多精子受精卵の倍数

表2. 極体の有無により分別したブタ卵の体外受精後もしくは電気刺激後の活性化

成熟培養 (時間)	極体	処置	活性化卵 (% ^a)	1極体放出卵 (% ^b)	2極体放出卵 (% ^b)
24	-	体外受精	6.2 ± 1.5 ^d	80.0 ± 16.7 ^c	20.0 ± 16.7 ^d
48	-	体外受精	68.6 ± 10.8 ^c	90.0 ± 1.7 ^d	10.0 ± 1.7 ^d
48	+	体外受精	61.8 ± 13.8 ^c	5.2 ± 2.3 ^d	94.9 ± 2.3 ^c
24	-	電気刺激	0 ^f	-	-
48	-	電気刺激	52.9 ± 5.0 ^e	73.0 ± 9.7 ^e	13.5 ± 4.7 ^f
48	+	電気刺激	80.5 ± 4.8 ^e	8.9 ± 2.6 ^f	79.0 ± 6.7 ^e

すべての胚は体外受精後10時間で固定して検査した。平均 ± 標準誤差で表示した。

^a使用した卵に対する割合。b 活性化卵に対する割合。

^{c,d,e,f}それぞれの列において異符号間で有意差あり(P < 0.05)。Kikuchi *et al.* (1999) [20]より改変。

表3. 極体の有無により分別したブタ卵を体外受精し、6日間培養して得られた胚盤胞の染色体解析

極体の 有無	胚盤胞数	解析したM期染色体の数 (胚盤胞あたりの数)	判定されたM期染色体の数(%)				
			総数 ^a	1倍体 ^b	2倍体 ^b	3倍体 ^b	4倍体 ^b
-	66	132 (2.0)	100 (78.8) ^c	16 (16.0)	44 (44.0) ^d	34 (34.0) ^c	6 (6.0)
+	122	241 (2.0)	155 (64.3) ^d	29 (18.7)	108 (69.7) ^c	13 (8.4) ^d	5 (3.2)

^a解析したM期染色体の数に対する割合。^b 判定可能であったM期染色体の総数に対する割合。

^{c,d}それぞれの列において異符号間で有意差あり(P < 0.05)。Somfai *et al.* (2005) [41]より改変。

性は、第一卵割直前の前核の位置により左右されることが報告されている[15]。この現象は、異なった卵割の様式たとえば三極性(tripolar)あるいは四極性(tetrapolar)といった異常な卵割様式が関与すると考えられている。これらの胚では、第一卵割の後にそれぞれの割球の倍数性が、2倍体、多倍体あるいは混合倍体などさまざまな状態となり、それらの割球を持つ胚が卵割を繰り返すと考えられる[9, 15]。初期の胚発生では、これら倍数性に異常がある割球が胎生期に細胞分裂を停止し、一方で正常な2倍体を有する割球のみが発生に関与するものと考えられている。したがって、混合倍体胚でも2倍体細胞を有すれば胎子や産子へと発生すると考えられる[9, 15]。また、別な機序も想定されており、Kola *et al.* (1987) [25]は、ヒトの受精卵が三極性の卵割をすると分裂後の割球の染色体数に異常がおこること、また、多精子受精卵でも2細胞期への移行時すなわち第一卵割時に、余剰な割球一つが突出することにより胚が2倍体化することを報告している。ウシでもIVP胚で同様な報告が得られている[45]。Funahashi (2003) [9]はさらに別な可能性として、多精子侵入した精子のうち余剰な精子では精子頭部が脱凝縮せず、MPN形成をおこなってもこれらは前核融合に関与しないため、その後のM期染色体像の形成や卵割には関与しないと報告している。このような精子由来の余剰な核は、2細胞期胚の一方の割球の中にそのままの形でとどまり、その後ライソゾームが関与する機序で消滅することになる。現時点でのブタのIVP系では、約15-30%のIVM-IVF卵が胚盤胞期にまで発生をするが、その形態的な所見は多様である。部分的な断片化が認められる胚(partially fragmented

embryos)があり、その断片化した部分には核があつたり、なかつたりという特徴を示す[21, 41, 44]。最近の私たちの報告[44]では、IVF後36時間で観察すると、単精子受精卵は多精子受精卵に比べて2細胞期へと高率に卵割する。一方で、4つあるいはそれ以上の割球を持つ胚の割合は、単精子受精卵に比べて多精子受精卵で高い。これらの胚を核染色後に観察すると、2核あるいはそれ以上の多核割球を有する胚の率は、単精子受精卵と多精子受精卵の間で差が無く、無核の割球(断片化の一つの根拠と考えられる)の率は、単精子受精卵に比べ多精子受精卵で高かった。さらに、割球数については、単精子受精卵に比べ多精子受精卵で多く、胚1個あたりの核の平均数は2実験区間で差がなかった(表1)。これらの結果より、多精子受精では部分的な胚の断片化が起こることが示唆された。この現象が倍数性の修復機序に重要な役割を果たしている可能性がある。しかし、この現象と初期の胚発生の段階で倍数性の修復が起こるということに関連づけるためにはさらなる研究が必要である。

卵成熟完了前の受精

“M-I静止”卵の細胞質成熟度

これまで私たちが用いてきているIVM系では、30時間でM-II卵いわゆる成熟卵が初めて出現し、その後成熟卵率は36時間で最大値となり、通常IVFを行う44-46時間にかけて一定値をとる[19]。この間、約35%の卵はM-IIに達せず、約25%の卵は第一極体を放出しないがM期染色体を有し、見た目はM-Iの状

ブタ卵の異常と修復

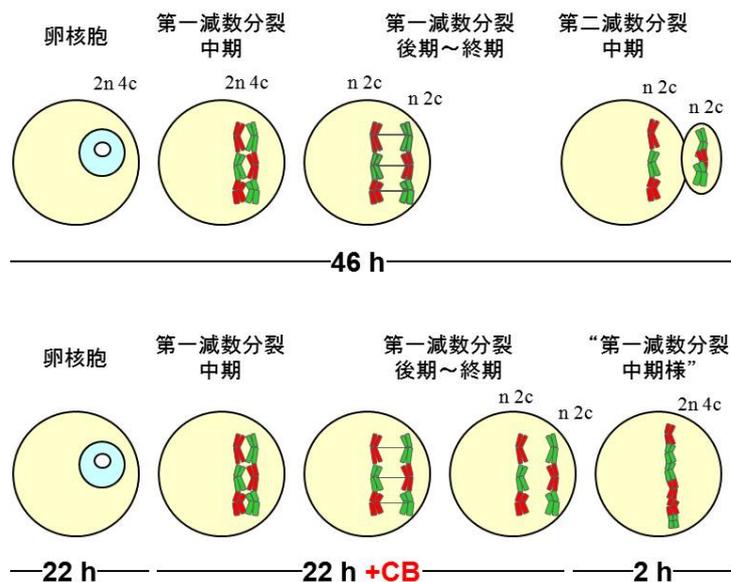


図 2. ブタ卵の成熟培養時のサイトカラジン B(CB)の有無による染色体の挙動の違い

通常の成熟培養では、卵核胞期卵は卵核胞崩壊後、母方ならびに父方由来の相同染色体が並び(第一減数分裂中期)、相同染色体は両極に移動し1組は卵のクロマチンとして卵細胞質内にとどまり、もう1組は極体として放出される。この状態が第二減数分裂中期である。この際の核相ならびに染色体はそれぞれ $n\ 2c$ の構造をとる。一方、CB を添加すると極体が放出されずに両組の染色体が卵細胞質内に止まる。その後、CB を除去するとこれらの染色体が合流する。この場合、第一減数分裂中期で観られる相同染色体が対合した様式をとらず、それぞれの染色体が個別に存在するため、体細胞同様、38 本の染色体がならんだ M 期像を呈する($2n\ 4c$ の構造をとる)。Somfai *et al.* (2006) [42]より改変。

態にとどまっているように見受けられる。私たちは、この状態の卵を“第一減数分裂中期(metaphase-I, M-I) 静止(M-I arrest)”卵と称した[20]。通常、多くの動物種では、減数分裂はM-IIで静止し精子侵入を待つ。一方で、M-I静止卵もいくつかの動物種でたびたび認められ、採卵や排卵時期と卵胞周期が一致しない、あるいは卵の成長不足(結果的に卵の直径が小さい)などさまざまな要因でおこることが知られている[8,35,47,50]。使用する培養液が不適切など培養条件の不正によるストレスによっても引き起こされることがある[1,2,20]。ブタ卵でよく知られている現象であるが、ある種の系統(LT/Sv系やLT関連の系統)のマウスの卵が、高頻度でM-I静止を起こすことが知られている[16,17]。

成熟卵(M-II卵)は、第一極体を直接観察することで、未成熟の卵と区別することができる。ブタ卵では、選別のエラーは極体有りだと判別されたもののうち6%以内である[20]。この手法は、前述のクロマチンを蛍光色素で染色し蛍光観察下でM-II卵を選別する方法と比較し、簡便で蛍光を落射することがないためその後の発生能に影響を与えないと言う点で優れた方法である。この方法で、“M-I静止”卵を選別し、研究を行った。この“M-I静止”卵はM-II卵と同様に細胞質成熟を完了していると考えられる[20]。つまり、“M-I静止”卵においても、電気刺激による単為発生

刺激を加えた場合は極体を1個放出し雌性前核(FPN)を形成する。IVF後もやはり極体を1個放出しFPNならびにMPNを形成する。この前核形成について時間やその様式は、“M-I静止”卵と成熟卵で違いがなかった[41]。さらに、通常、M-II卵は活性化されると第一極体に比べクロマチンが凝縮している第二極体を放出するが、“M-I静止”卵が活性化されて放出される極体もこの特徴を有している。このことから、極体放出前の細胞質の成熟度が極体の形態にも反映されていると考えられている。一方、通常の出現時期である24時間で得られる、いわゆる“新鮮な”M-I卵ではIVFや単為発生を施してもほとんど卵の活性化は誘起されない(表2)。以上の観察結果より、ブタ卵では減数分裂において核の成熟が完了するかどうかにかかわらず、一定時間を経過すると細胞質成熟が完了することが示唆された。卵の活性化を制御する因子として成熟促進因子(maturation promoting factor, MPF)が挙げられる。M-II卵ではMPFが合成され高いまま維持されるためM期に静止するが、精子侵入や電気刺激による卵の活性化によりMPFが分解されるため、間期つまり前核期に移行する。実際にMPFを測定すると、“M-I静止”卵やM-II卵よりも“新鮮な”M-I卵では高い値が測定される。すなわち、“M-I静止”卵やM-II卵では“新鮮な”M-I卵より容易に活性化がおこる。“新鮮な”M-I卵に侵入した精子

頭部は脱凝縮後に再凝縮、場合によってはM期染色体様に変化する[20]。この様に、“M-I静止”卵では、細胞質成熟が進みM-II卵と同様に適度なMPF活性を維持すること、活性化により前核形成をすることが明かになった。しかし、このような受精卵は減数分裂が完了されないため、多精子受精と同様に核相に異常が生じると思われる。そこで、胚発生が進むのかを検討した。また、なぜ第二極体を放出せずに細胞質成熟が進むのかについても検討を行った。

“M-I静止”卵の発生成について

“M-I静止”ブタ卵は通常のM-II卵と同様にIVF後に胚盤胞へと発生する[41]。しかしながら、その発生成能(胚盤胞発生率)は低く、さらには胚盤胞の細胞が少ないという点でM-II卵よりも劣ると考えられる。マウスでも“M-I静止”卵は胚盤胞へと発生することが報告されている[8]。“M-I静止”卵をIVFして得られた胚盤胞の染色体標本を解析すると、染色体数の異常が認められ、特に3倍体細胞の率が増加している[41](表3)。マウスでも同様な報告がなされている[8]。“M-I静止”卵は、二母性(digynic)の3倍体胚を形成すると考えられている。Kaufman *et al.* (1989) [18]は、マウスの二母性3倍体胚は、正常に受精した2倍体胚と比較して形態的に正常であるが大きさはやや小さいことを報告しており、今回のブタの事例が近似するものと考えられる。

このように、ブタ胚の倍数性は胚発生成能と関連することが示唆される。“M-I静止”卵でも発生の過程で倍数性の修復機構があるかどうかについては確認されていない。一方で、この“M-I静止”卵からIVFにより発生した場合も、2倍体胚あるいは多倍体胚でも2倍体細胞が含まれることが確認されていることから[41]、その後の胎子や産子への発生が十分に期待される。詳細な検討が望まれる。

卵成熟が完了する前に“M-I静止”となる機構

私たちは、“M-I静止”卵が出現する機構として、“M-I静止”卵では極体放出がされないという事実から、極体放出に関与する細胞骨格つまりアクチンの制御に何らかの異常があるのではないかと仮定した。そこで、“M-I静止”卵を実験的に作出することにした。“M-I静止”卵の作出には、アクチンの重合阻害剤であるcytochalasin-B (CB)を使用した。この薬物は、哺乳動物の卵をM-Iで静止させるとの報告がある[53]。実験的に作出した“M-I静止”卵(培養時間は計46時間)、IVMを33時間行って回収した“真の”M-I卵、さらに46時間IVMを行ったM-II卵を経時的にサンプリングし染色体の挙動を比較したところ、CB処理卵では、

相同染色体の解離はおこるものの第一極体の放出がおこらず、2組の染色体のセットが卵細胞質内にとどまる。さらに、この2組のセットは後に合流して、 $2n$ $4c$ (2倍体で4つの染色体を有する)のM期染色体を形成する[42](図2)。実際には、“M-I静止”卵の染色体像は38本を有し、“真のM-I”卵ではリング状に相同染色体が対合した状態のものが19本、M-II卵では卵細胞質内の染色体19本と放出された第一極体内にも染色体19本が観察される。また、CBを用いないで48時間培養して得られた“M-I静止”卵もCB処理卵と同様な染色体であったことが確認されている(Somfai *et al.*, 未発表)。Kubiak *et al.* (1991) [27]は、CBと類似な薬物であるcytochalasin-Dを用い、マウスでも同様な報告をしている。このように“M-I静止”卵の染色体構造は、2つの染色分体を有する染色体構造をとっており、相同染色体が2組である、すなわち2倍体である点を除けば、M-II卵のそれに類似する。これらの結果は、Sosnowski *et al.* (2003) [48]やLechniak *et al.* (2007) [29]でのブタ卵の報告と一致している。M-IからM-II移行する際に、いくつかの卵では染色体の分離がおこっても何らかの機構が働き、相同染色体の1組が極体として放出されずに卵細胞質内に残り結果的に2組が合流するためと考えられる。また、この異常は培養時間を延長させると、より頻発することも私たちの報告を裏付けるものである。これらの事から私たちが定義してきた“M-I静止”卵という表現[20, 41]は、“M-I様(M-I-like)”卵と称した方がよいと考えられる。ブタやマウスだけではなく、ヒトにおいても未成熟の状態でとどまりM-II期に達しないことが不妊の一要因となっている[36]。いずれにせよ、成熟過程における紡錘糸形成と極体放出の異常によるものと考えられるので、さらなる研究が必要である。

結論

私たちの研究結果では、ブタのIVPにおいて、胚盤胞に発生可能であることは必ずしも完全な指標とは成り得ないことを示している。なぜなら、多倍体胚も胚盤胞期にまで発生するためである。IVFに供するM-II卵を慎重に選ぶこと、IVF時の多精子侵入を可能な限りモニターすることが重要であると思われる。これらはIVFだけではなく、IVM技術を使ったクローンや遺伝子導入の際にも重要な事項となる。IVP胚の信頼性ならびに効率化をめざすために、これからもIVM-IVF系における核と細胞質成熟の関連について研究するとともに、発生過程で異常が修復される機構についても解明する必要がある。

謝辞

本研究を遂行ならびに本レビューを作成するにあたり、居在家義昭、吉澤緑、柏崎直巳、金子浩之、野口純子、淵本大一郎、伊藤潤哉、M. Fahrudin、N. W. K. Karja、大沼克彦、小沢学、前泊直樹ならびに谷原史倫氏に感謝いたします。

参考文献

1. **Bae IH, Foote RH.** Maturation of rabbit follicular oocytes in a defined medium of varied osmolality. *J. Reprod. Fertil.* 1980; 59: 11–13.
2. **Bagger PV, Byskov AG, Christiansen MD.** Maturation of mouse oocytes *in vitro* is influenced by alkalization during their isolation. *J. Reprod. Fertil.* 1987; 80: 251–255.
3. **Bomsel-Helmreich O.** Fate of heteroploid embryos. *Advanc. Biosci.* 1971; 6: 381–403.
4. **Clark SG, Haubert K, Beebe DJ, Ferguson CE, Wheeler MB.** Reduction of polyspermic penetration using biomimetic microfluidic technology during *in vitro* fertilization. *Lab. Chip.* 2005; 5: 1229–1232.
5. **Cran DG.** The distribution of organelles in mammalian oocytes following centrifugation prior to injection of foreign DNA. *Gamete Res.* 1987; 18: 67–76.
6. **Dang-Nguyen TQ, Kikuchi K, Somfai T, Ozawa M, Nakai M, Maedomari N, Viet-Linh N, Kanai Y, Nguyen BX, Nagai T.** Evaluation of developmental competence of *in vitro*-produced porcine embryos based on the timing, pattern and evenness of the first cleavage and onset of the second cleavage. *J. Reprod. Dev.* 2010; 56:593-600.
7. **Ebert KM, Hammer RE, Papaioannou VE.** A simple method for counting nuclei in the preimplantation mouse embryo. *Experientia* 1985; 41: 1207–1209.
8. **Eppig JJ, Schultz RM, O'Brien M, Chesnel F.** Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. *Dev. Biol.* 1994; 164: 1–9.
9. **Funahashi H.** Polyspermic penetration in porcine IVM-IVF systems. *Reprod. Fertil. Dev.* 2003; 15: 167–177.
10. **Funahashi H, Day BN.** Effects of follicular fluid at fertilization *in vitro* on sperm penetration in pig oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 1993; 99: 97–103.
11. **Funahashi H, Day BN.** Advances in *in vitro* production of pig embryos. *J. Reprod. Fertil. Supp.* 1997; 52: 271–283.
12. **Funahashi H, Kim NH, Stumpf TT, Cantley TC, Day BN.** Presence of organic osmolytes in maturation medium enhances cytoplasmic maturation of porcine oocytes. *Biol. Reprod.* 1996; 54: 1412–1419.
13. **Funahashi H, Nagai, T.** Sperm selection by a climbing-over-a-wall IVF method reduces the incidence of polyspermic penetration of porcine oocytes. *J. Reprod. Dev.* 2000; 46: 319–324.
14. **Han YM, Abeydeera LR, Kim JH, Moon HB, Cabot RA, Day BN, Prather RS.** Growth retardation of inner cell mass cells in polyspermic porcine embryos produced *in vitro*. *Biol. Reprod.* 1999; 60: 1110–1113.
15. **Han YM, Wang WH, Abeydeera LR, Petersen AL, Kim JH, Murphy C, Day BN, Prather RS.** Pronuclear location before the first cell division determines ploidy of polyspermic pig embryos. *Biol. Reprod.* 1999; 61: 1340–1346.
16. **Hirao Y, Eppig JJ.** Analysis of the mechanism(s) of metaphase I arrest in strain LT mouse oocytes: participation of MOS. *Development* 1997; 124: 5107–5113.
17. **Hirao Y, Eppig JJ.** Analysis of the mechanism(s) of metaphase I-arrest in strain LT mouse oocytes: delay in the acquisition of competence to undergo the metaphase I/anaphase transition. *Mol. Reprod. Dev.* 1999; 54: 311–318.
18. **Kaufman MH, Lee KK, Speirs S.** Influence of diandric and digynic triploid genotypes on early mouse embryogenesis. *Development* 1989; 105: 137–145.
19. **Kikuchi K, Naito K, Noguchi J, Shimada A, Kaneko H, Yamashita M, Tojo H, Toyoda Y.** Inactivation of p34^{cdc2} kinase by the accumulation of its phosphorylated forms in porcine oocytes matured and aged *in vitro*. *Zygote* 1999; 7: 173–179.
20. **Kikuchi K, Nagai T, Ding J, Yamauchi N, Noguchi J, Izaike Y.** Cytoplasmic maturation for activation of pig follicular oocytes cultured and arrested at metaphase-I. *J. Reprod. Fertil.* 1999; 116: 143–156.
21. **Kikuchi K, Onishi A, Kashiwazaki N, Iwamoto M, Noguchi J, Kaneko H, Akita T, Nagai T.** Successful piglet production after transfer of blastocysts produced by a modified *in vitro* system. *Biol. Reprod.* 2002; 66: 1033–1041.
22. **Kikuchi K, Nakai M, Shimada A, Kashiwazaki N.** Production of viable porcine embryos by IVF and ICSI. *J. Mamm. Ova Res.* 2006; 23: 96–106.
23. **Kikuchi K, Somfai T, Nakai M, Nagai T.** Appearance, fate and utilization of abnormal porcine embryos produced by *in vitro* maturation and fertilization. *Reproduction Suppl.* 2009; 66: 135-147.
24. **Kim NH, Day BN, Lim JG, Lee HT, Chung KS.** Effects of oviductal fluid and heparin on the fertility and characteristics of porcine spermatozoa. *Zygote* 1997; 5: 61–65.
25. **Kola I, Trounson A, Dawson G, Rogers P.** Trippronuclear human oocytes: altered cleavage patterns and subsequent karyotypic analysis of embryos. *Biol. Reprod.* 1987; 37: 395–401.
26. **Kouba AJ, Abeydeera LR, Alvarez IM, Day BN, Buih WC.** Effects of porcine oviduct-specific glycoprotein on fertilization, polyspermy and embryonic development *in vitro*. *Biol. Reprod.* 2000; 63: 242–250.
27. **Kubiak J, Paldi A, Weber M, Maro B.** Genetically identical parthenogenetic mouse embryos produced by inhibition of the first meiotic cleavage with cytochalasin D. *Development* 1991; 111: 763–769.
28. **Lechniak D, Szczepankiewicz D, Kauss D, Szulc J, Szydlowski M.** IVM media, oocyte diameter and donor genotype at RYR1 locus in relation to the incidence of porcine diploid oocytes after maturation *in vitro*. *Theriogenology* 2005; 64: 202–212.
29. **Lechniak D, Warzych E, Pers-Kamczyc E, Sosnowski J, Antosik P, Rubes J.** Gilts and sows produce similar rate of diploid oocytes *in vitro* whereas the incidence of aneuploidy differs significantly. *Theriogenology* 2007; 68: 755–762.
30. **Li YH, Ma W, Li M, Hou Y, Jiao LH, Wang WH.** Reduced polyspermic penetration in porcine oocytes

- inseminated in a new *in vitro* fertilization (IVF) system: straw IVF. *Biol. Reprod.* 2003; 69: 1580–1585.
31. **Marchal R, Feugang JM, Perreau C, Venturi E, Terqui M, Miemillod P.** Meiotic and developmental competence of prepubertal and adult swine oocytes. *Theriogenology* 2001; 56: 17–29.
 32. **Mattioli M, Bacci ML, Galeati G, Seren E.** Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* 1989; 39: 1201–1207.
 33. **McCauley TC, Bui WC, Wu GM, Mao J, Caamano JN, Didion BA, Day BN.** Oviduct-specific glycoprotein modulates sperm-zona binding and improves efficiency of porcine fertilization *in vitro*. *Biol. Reprod.* 2003; 69: 828–834.
 34. **McCauley TC, Mazza MR, Didion BA, Mao J, Wu G, Coppola G, Coppola GF, Di Bernardino D, Day BN.** Chromosomal abnormalities in Day-6, *in vitro*-produced pig embryos. *Theriogenology* 2003; 60: 1569–1580.
 35. **Motlik J, Fulka J.** Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology* 1986; 25: 87–96.
 36. **Mrazek M, Fulka J.** Failure of oocyte maturation: possible mechanisms for oocyte maturation arrest. *Hum. Reprod.* 2003; 18: 2249–2252.
 37. **Nagai T, Moor RM.** Effect of oviduct cells on the incidence of polyspermy in pig eggs fertilized *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 1990; 26: 377–382.
 38. **Nagai T, Funahashi H, Yoshioka K, Kikuchi K.** Update of *in vitro* production of porcine embryos. *Front. Biosci.* 2006; 11: 2565–2573.
 39. **Piko L, Bomsel-Helmreich O.** Triploid rat embryos and other chromosomal deviants after colchicine treatment and polyspermy. *Nature* 1960; 186: 737–739.
 40. **Smith LC.** Membrane and intracellular effects of ultraviolet irradiation with Hoechst 33342 on bovine secondary oocytes matured *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 1993; 99: 39–44.
 41. **Somfai T, Kikuchi K, Medvedev SU, Onishi A, Iwamoto M, Fuchimoto D, Ozawa M, Noguchi N, Kaneko H, Ohnuma K, Sato E, Nagai T.** Development to the blastocyst stage of immature pig oocytes arrested before the metaphase-II stage and fertilized *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.* 2005; 90: 307–328.
 42. **Somfai T, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Ohnuma K, Karja NWK, Farhudin M, Maedomari N, Dinnyés A, Nagai T, Kikuchi K.** Diploid porcine parthenotes produced by the inhibition of first polar body extrusion during *in vitro* maturation of follicular oocytes. *Reproduction* 2006; 132: 559–570.
 43. **Somfai T, Kashiwazaki N, Ozawa M, Nakai M, Maedomari N, Noguchi J, Kaneko H, Nagai T, Kikuchi K.** Effect of centrifugation treatment before vitrification on the viability of porcine mature oocytes and zygotes produced *in vitro*. *J. Reprod. Dev.* 2008; 54: 149–155.
 44. **Somfai T, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Karja NWK, Fahrudin M, Nakai M, Maedomari N, Dinnyés A, Nagai T, Kikuchi K.** *In vitro* development of polyspermic porcine oocytes: relationship between early fragmentation and excessive number of penetrating spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 2008; 107: 131–147.
 45. **Somfai T, Inaba Y, Aikawa Y, Ohtake M, Kobayashi S, Konishi K, Imai K.** Relationship between the length of cell cycles, cleavage pattern, and developmental competence during *in vitro* culture of *in vitro*-matured/*in vitro*-fertilized bovine oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.* 2009; 21: 209–210.
 46. **Somfai T, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Nakai M, Maedomari N, Ito J, Kashiwazaki N, Nagai T, Kikuchi K.** Live piglets derived from *in vitro*-produced zygotes vitrified at the pronuclear stage. *Biol. Reprod.* 2009; 80: 42–49.
 47. **Sorensen RA, Wassarman PM.** Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev. Biol.* 1976; 50: 531–536.
 48. **Sosnowski J, Waroczyk M, Switonski.** Chromosome abnormalities in secondary pig oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* 2003; 60: 571–581.
 49. **Suzuki K, Eriksson B, Shimizu H, Nagai T, Rodriguez-Martinez H.** Effect of hyaluronan on monospermic penetration of porcine oocytes fertilized *in vitro*. *Int. J. Androl.* 2000; 23: 13–21.
 50. **Szybek K.** *In vitro* maturation of oocytes from sexually immature mice. *J. Endocrinol.* 1972; 54: 527–528.
 51. **Tsunoda Y, Shiosa Y, Onodera M, Nakamura K, Uchida T.** Differential sensitivity of mouse pronuclei and zygote cytoplasm to Hoechst staining and ultraviolet irradiation. *J. Reprod. Fertil.* 1988; 82: 173–178.
 52. **Ulloa Ulloa CM, Yoshizawa M, Komoriya E, Mitsui A, Nagai T, Kikuchi K.** The blastocyst production rate and incidence of chromosomal abnormalities by developmental stage in *in vitro* produced porcine embryos. *J. Reprod. Dev.* 2008; 54: 22–29.
 53. **Wassarman PM, Josefowicz WJ, Letourneau GE.** Meiotic maturation of mouse oocytes *in vitro*: inhibition of maturation at specific stages of nuclear progression. *J. Cell Sci.* 1976; 12: 531–545.
 54. **Yang X, Zhang L, Kovács A, Tobback C, Foote RH.** Potential of hypertonic medium treatment for embryo micromanipulation. II. Assessment of nuclear transplantation methodology, isolation, subzona insertion, and electrofusion of blastomeres to intact or functionally enucleated oocytes in rabbits. *Mol. Reprod. Dev.* 1990; 27: 118–129.
 55. **Yoshida M, Mizoguchi Y, Ishiaki K, Kojima T, Nagai T.** Birth of piglets derived from *in vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* 1993; 39: 1303–1311.

