

氏 名(本籍) 小 林 敬 三
学位の種類 博 士 (農 学)
学位記番号 農 第 5 3 2 号
学位授与年月日 平 成 7 年 9 月 14 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文題目 ウン卵胞卵子の体外成熟および体外発生
に関する研究
～成分既知培地を用いた培養法の確立～

論文審査委員(主 査) 教 授 菅 原 七 郎
教 授 鈴 木 惇
教 授 伊 藤 敏 敏

論 文 内 容 要 旨

1. 目的および背景

ウシの受精卵移植は、近年、人工授精に代わる雌のサイドからも品種改良が可能な育種法として注目されており、実用化をめざして活発に研究が行われている。受精卵移植の利点としては、乳牛に優秀な血統の肉牛の受精卵を移植することで、より付加価値の高い子牛を生産できる点や、従来屠場で廃棄される運命にあった卵胞卵子を有効に利用できる点などがあげられる。さらに、核移植、キメラやトランスジェニック動物の作出など、発生工学的な実験の基礎技術として極めて重要である。しかし、現在の技術では、未成熟卵子から体外成熟/体外受精/体外発生のプロセスを経て非外科的に移植可能な胚盤胞期まで発生する効率が低く、受精卵移植技術を実用化するためには、この効率を高めて行く必要がある。

現在、ウシ卵胞卵子の成熟培養には、成熟を促進するため血清添加培地が一般に用いられている。さらに、受精卵の体外培養系では、発生阻害の起こる8-16細胞期を越えて胚盤胞期まで発生を進める目的で、血清添加培地を用い顆粒膜細胞や卵管上皮細胞などの体細胞と共培養が行われている。しかし、血清や体細胞が卵子(胚)の成熟/発生におよぼす影響は複雑でほとんど解明されておらず、これらの存在は、成熟/発生におよぼす外的要因の影響を解析する上で妨げになっている。したがって、血清と体細胞を培養系から除外することは、卵子(胚)の成熟・発生機構を解明するために重要であり、また、成熟/発生効率を高め、実験ごとの結果のばらつきを解決するための基礎的手段になると考えられる。

本研究では、成分既知培地を用いた体細胞を含まないウシ卵子の体外成熟/体外発生系の確立を目的として種々の検討を行った。体外成熟については、細胞成長因子とゴナドトロピンの成分既知培地への添加および卵丘細胞の影響を検討した。体外発生においては、顆粒膜細胞の培養上清に含まれる胚発生促進因子の精製を試みた。さらに、胚発生に重要な影響を与えられとされる要因として、培養系の酸素濃度、基礎培地中に含まれるグルコース濃度、および細胞成長因子の添加の検討を行った。

2. 成分既知培地を用いた体外成熟

(第2章)

LH、FSHなどのゴナドトロピンが哺乳類卵子の成熟を促進することはよく知られているが、近年、これらの他に表皮成長因子 (EGF)、腫瘍成長因子- α 、- β (TGF- α 、 β) などの細胞成長因子が成熟を促進することが報告されている。そこで、これらの因子を成熟培地に添加することにより、卵丘細胞付着卵子の成分既知培地による体外成熟系の確立を試み、さらに、卵丘細胞が体外成熟におよぼす影響について検討した。

(1) 細胞成長因子およびゴナドトロピンの

卵丘細胞膨潤と体外成熟におよぼす影響

種々の細胞成長因子 (EGF、TGF- α 、TGF- β 1、bFGF、insulin) とゴナドトロピン (LH、FSH) が卵丘細胞付着卵子の卵丘細胞膨潤および体外成熟におよぼす影響を、成分既知培地 (M199培地) を用いて検討した。成熟培養は、5%CO₂/95%air、37.5℃の条件で22時間行った。卵丘細胞膨潤の程度は、形態的に3段階に分けて評価し (degree 0 < degree 1 < degree 2)、成熟については媒精後の分割率を指標として評価した。試験した因子のなかで、EGF、TGF- α 、LHおよびFSHは卵丘細胞膨潤を強く促進し、媒精後の分割率をコントロール実験区の48.8%からそれぞれ70.3%、73.6%、74.8%および84.6%に増加させた (Table 1)。EGFとゴナドトロピンの相乗的な効果は認めらず、これらの作用機構の共通性が示唆された。一方、胎児ウシ血清 (FBS) を添加した場合の分割率は65.5%であり、これらの因子の添加によって、成分既知培地を用いて血清添加培地と同等以上の効率で体外成熟を誘導できる可能性が示された。

(2) 核の成熟におよぼす卵丘細胞の影響

成熟促進効果が認められたEGF、TGF- α 、LHおよびFSHについて、それらの因子

の効果に卵丘細胞が関与しているかどうかを調べるため、卵丘細胞付着卵子と卵丘細胞を除去した卵子（裸化卵子）で、これらの因子の成熟促進効果を比較した。裸化卵子に媒精する方法が確立されていなかったため、metaphase IIへの核の成熟を指標として実験を行った。

卵丘細胞付着卵子では、EGF、TGF- α 、LHおよびFSHは、metaphase IIへの核の成熟を促進し、コントロール実験区の44.0%に対し、それぞれ66.8%、62.8%、64.3%、および56.9%の高い成熟率が得られた（Table 2）。一方、裸化卵子では、コントロール実験区におけるmetaphase IIへの成熟率が14.0%と卵丘細胞付着卵子の44.0%と比較して著しく低く、細胞成長因子やゴナドトロピンの添加による有意な成熟促進効果は認められなかった（Table 3）。これらの結果は、体外成熟における卵丘細胞の重要性を示しており、細胞成長因子やゴナドトロピンの成熟促進効果は卵丘細胞を介するものと考えられた。単に細胞成長因子やゴナドトロピンを添加した培地で、裸化卵子の成熟培養を行うというアプローチでは、体外成熟系からの体細胞の除外は達成されず、今後、卵丘細胞の体外成熟における役割を解明して行く必要がある。

（3）成分既知培地を用いて成熟培養したウシ卵胞卵子の胚盤胞期への発生能

EGF、TGF- α 、LHおよびFSHの成熟培地への添加は、卵丘細胞付着卵子の体外成熟を促進し、媒精後の分割率を増加させることが明らかになったが、これらの因子を添加した成分既知培地における体外成熟が正常であるかどうかを評価するためには、2細胞期以降への発生能を検討する必要がある。そこで、これらの因子の成熟培地への添加が胚盤胞期への発生におよぼす影響を検討した。成熟培養はM199培地を基礎培地として行い、媒精後の卵子は5 $\mu\text{g/ml}$ のinsulinを添加したM199培地を用いて、5%CO₂/95%air、37.5℃の条件で顆粒膜細胞と共培養した。

結果はTable 4に示した。EGF、TGF- α 、LH+FSHの添加により、分割率はコントロール実験区の50.5%に対して、それぞれ77.6%、78.8%および69.7%に増加し、これに伴って、胚盤胞期への発生率もコントロール実験区の9.8%から、それぞれ

17.9%、21.2%および15.9%に増加した。FBS添加区における分割率は78.8%、胚盤胞形成率は19.2%であり、細胞成長因子やゴナドトロピンの添加区と有意差は認められなかった。この結果は、これらの細胞成長因子やゴナドトロピンを添加した成分既知培地を用いて成熟培養を行った卵子が、血清添加培地で成熟培養した卵子と同等の発生能を持つことを示しており、成熟培地にこれらの細胞成長因子またはゴナドトロピンを添加することにより、成分既知培地を用いた体外成熟/体外培養系において、血清添加培地に匹敵する胚盤胞形成率を得られることが明らかになった。しかし、体外発生は顆粒膜細胞との共培養により行っているため、さらに顆粒膜細胞を培養系から除外するための検討が必要である。

3. 顆粒膜細胞由来の胚発生促進因子の精製

(第3章)

共培養系において顆粒膜細胞が胚発生を促進する機構として、顆粒膜細胞が産生する因子が胚発生を促進していることが示唆されており、この胚発生促進因子を精製し、発生培地に添加して体細胞を代替することによって、体細胞に依存しない体外培養系を確立できる可能性が考えられる。そこで、顆粒膜細胞由来の胚発生促進因子の精製・同定を試みた。

(1) 濃縮した顆粒膜細胞培養上清の胚発生促進効果

顆粒膜細胞の培養上清は、発生促進効果を持つことが知られている。この効果は、加熱処理やプロテアーゼ処理により失われるので、タンパク性の発生促進因子の存在が示唆されている。精製の最初の段階として、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ insulinと0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotininを添加したM199培地 (M199IAP) を用いて調製した顆粒膜細胞培養上清 (BGC-CM) を、限外濾過により約25倍に濃縮した後、M199IAPに対して透析し、胚発生促進活性を検討した。胚発生促進活性は、10%FBSを添加したM199培地で成熟培養し、媒精後24~30時間 (1-2細胞期) で裸化した卵子の胚盤胞期への発生率により評価した。体外発生は、5%CO₂/95%air、37.5℃の条件で行った。

未処理のBGC-CMは胚発生促進効果を示し、胚盤胞期への発生率は新鮮なM199IAP培地 (FM) の1.3%から17.5%に増加したが、濃縮したBGC-CM (cBGC-CM) をFMで25倍および10倍に希釈した培地では、3.0%および4.8%で、cBGC-CMの胚発生促進効果は認められなかった (Table 5)。

(2) グルコース濃度とcBGC-CMの影響

cBGC-CMが胚発生促進効果を示さなかった理由として、BGC-CMの効果が、胚発生促進因子だけによるものではなく、基礎培地に含まれる胚発生阻害物質の顆粒膜細胞による除去も一因となっていることが考えられる。近年、グルコースによる初期胚発生の阻害が、ハムスターなどの動物種で報告されており、基礎培地中のグルコースが胚発生を阻害していることが考えられた。そこで、グルコース濃度とcBGC-CMの胚発生におよぼす影響を調べた。基礎培地は、M199培地の組成から、グルコース、パラアミノ安息香酸およびTween 80を除き、乳酸ナトリウム (4.13 mM)、ピルビン酸ナトリウム (0.27 mM) およびgentamycin (10 µg/ml) を添加した培地 (GF-199培地) にウシ血清アルブミン (BSA, 5 mg/ml) を加えた培地を基礎培地とし、グルコース濃度 (1.1 mMおよび5.6 mM) とcBGC-CMの影響を調べた。

Table 6に示したように、グルコース濃度を5.6 mM (オリジナルのM199培地の濃度) から1.1 mM (平均的なBGC-CM中の濃度) に低下させることにより、胚盤胞形成立は3.4%から8.5%にやや増加し、さらにcBGC-CMを10%添加することによって29.8%まで著しく増加した。一方、グルコース濃度5.6 mMの培地にcBGC-CMを添加しても、胚盤胞形成立は11.1%とやや増加したのにとどまり、有意差は認められなかった。この結果は、BGC-CMの効果が、顆粒膜細胞によるグルコース濃度の低下と、胚発生促進因子の産生の二つの要因によるものであることを示唆している。また、cBGC-CMの効果は、BSAの添加により増強されることが認められた (Table 7)。これらの検討の結果、cBGC-CMはウシ初期胚の胚発生を促進することが確認され、BSAを添加した低グルコース培地における裸化胚の胚発生を指標として胚発生促進因子の精製を行うことが可能になった。

(3) 顆粒膜細胞が産生する胚発生促進因子の精製

cBGC-CMを出発材料として、ゲル浸透、イオン交換および逆相の3段階のHPLCによって胚発生促進因子の精製を行った。各段階で得られた分画の胚発生促進活性は、1.1 mMのグルコースと5 mg/mlのBSAを添加したGF-199培地における2細胞期裸化胚の胚盤胞期への発生率によって評価した。

ゲル浸透クロマトグラフィー (TSK-G3000SWXL) では、分子量約30000と約80000の2箇所に活性のピークが認められた (Fig. 1)。これらをそれぞれ embryogenin-1 (EG-1) および embryogenin-2 (EG-2) とし、これらのうち低分子量のEG-1についてさらに精製を進めた。EG-1の分画をイオン交換カラム (Mono-Q) に吸着させ、NaClの濃度勾配で溶出させたところ、胚発生促進活性は0.1-0.3M NaClの蛋白ピークに一致して検出された (Fig. 2A)。さらに、この分画を逆相カラム (Vydac C-4) で分画すると、EG-1は33%アセトニトリルでシングルピークとして溶出され (Fig. 2B)、SDS-PAGEで分子量31000の単一バンドとして検出された。精製されたEG-1は、2.5 μ g/mlの濃度で最大の活性を示した (Fig. 3)。さらに、EG-1のアミノ末端アミノ酸配列をエドマン法により分析した結果、29番目までの配列はウシ組織性メタロプロテアーゼ-1 (bTIMP-1) と93%の相同性が認められた (Fig. 4)。EG-1は、bTIMP抗体と交叉し、cDNA配列もbTIMPと一致することが示されており、bTIMP-1と同定された。EG-2については、ゲル浸透クロマトグラフィー以降の精製は現在のところ進展していない。

bTIMP-1は、分子量約30000のシアロ糖蛋白で、コラゲナーゼなど細胞外マトリックス (ECM) を分解するメタロプロテアーゼを阻害する活性を持っている。bTIMP-1が発生を促進する機構としては、このような活性によってECMの分解/再構築を適度に制御することが考えられる。一方、最近TIMP-1には上記の活性の他に、直接的に細胞増殖を促進する活性があることが示唆されており、このような細胞成長因子様の活性により細胞分裂が刺激された結果、発生が促進された可能性もある。

4. 成分既知培地におけるウシ体外受精卵の体外発生

～酸素濃度、グルコース濃度、細胞成長因子の影響～

(第4章)

前節に述べた実験結果から、cBGC-CMまたはbTIMP-1 (EG-1) を利用することにより、無血清培地において、体細胞に依存することなく良好な胚盤胞形成率を得ることができた。しかし、cBGC-CMやbTIMP-1 (EG-1) が十分に効果を発揮するためには、BSAの添加が必要であった (Table 7)。したがって、共培養系において顆粒膜細胞のはたす役割は、グルコース濃度の低下と発生促進因子の供給だけでは説明できない。また、BSAは夾雑蛋白や脂質などの不純物を含み、製造ロットによって生物活性が異なる場合があり、成分既知培地による培養系を確立するためには、BSAを培地成分から除去する必要がある。

グルコース濃度の低下と発生促進因子の供給以外の顆粒膜細胞の役割としては、胚の酸素毒性からの保護が考えられる。これまでの実験で体外発生に用いてきた気相条件は、5%CO₂/95%airで、酸素濃度は約20%であるが、卵管や子宮内の酸素濃度はこれよりも低い (5%前後) ことが知られており、この条件下では生体内に比べ酸素毒性による障害が起こりやすい状態になっている。共培養系においては、顆粒膜細胞は酸素の消費により胚の周囲の酸素濃度を低下させ、酸素毒性による障害を抑えることにより胚発生を促進すると考えられる。BSAは、胚単独の培養系において酸素毒性を緩和する働きをする可能性がある。そこで、成分既知培地におけるウシ体外受精卵の体外発生におよぼす酸素濃度、グルコース濃度および顆粒膜細胞の影響を検討した。さらに、酸素濃度とグルコース濃度を至適化した条件で、成分既知培地において成熟培養した卵子の発生能を検討するとともに、種々の細胞成長因子の影響を試験した。

(1) 高グルコース培地における酸素濃度と顆粒膜細胞の影響

高グルコース培地 (M199培地+0.5 µg/ml insulin、5.6mMグルコース) を用いて、酸素濃度 (5%または20%) と顆粒膜細胞との共培養の影響を検討した (Table

8)。20%O₂ (5%CO₂/95%air) の条件では、顆粒膜細胞がないと胚盤胞形成率は2.6%と非常に低かったが、顆粒膜細胞と共培養を行うことにより、15.0%まで著しく増加した。一方、5%O₂ (5%O₂/5%CO₂/90%N₂) の条件では、顆粒膜細胞がない場合でも比較的高い胚盤胞形成率が得られ(10.9%)、共培養によって逆に2.5%に低下した。これらの結果から、酸素濃度を低下させることにより、明らかに胚発生が促進されることが認められた。低酸素条件下で顆粒膜細胞の存在によって胚盤胞形成率が減少したのは、顆粒膜細胞による酸素消費により酸素濃度が必要量以下に低下したためと考えられる。

(2) 低酸素培養におけるグルコース濃度の影響

低酸素条件(5%O₂)において、培地中のグルコース濃度(0-5.6 mM)が体外発生におよぼす影響を5 µg/ml insulinを添加したGF-199培地を基礎培地として検討した(Table 9)。最も高い胚盤胞形成率は、2.2 mMのグルコース濃度において得られた(23.7%)。5.6 mMにおける胚盤胞形成率は8.6%で、他の実験区(0-4.4 mM)に比較して有意に低かった。この実験から、グルコース濃度を2.2 mMに調整した培地を用いて低酸素培養を行うことにより、成分既知培地において体細胞に依存することなく20%以上の高い胚盤胞形成率を得られることが示された。

(3) 低グルコース培地における酸素濃度と顆粒膜細胞の影響

低グルコース培地(GF-199培地+2.2 mMグルコース+5 µg/ml insulin)を用いて、酸素濃度(5%または20%)と顆粒膜細胞の影響を検討した(Table 10)。高酸素条件(20%O₂)では、顆粒膜細胞の有無に関わらず胚盤胞形成率は低く、共培養で5.0%、胚単独で3.8%であった。共培養を行っても胚発生が促進されなかったのは、顆粒膜細胞によりグルコースが消費されて、欠乏したためと考えられる。一方、低酸素条件(5%O₂)では、共培養系で低い胚盤胞形成率(2.1%)であったのに対し、胚単独の場合には27.9%と非常に高い胚盤胞形成率が得られた。これらの結果から、共培養系と胚単独の培養系では胚発生に適した培養条件が異なっており、低酸素、

低グルコースの条件が胚単独の培養系においては好適であることが明らかになった。

(4) 低酸素、低グルコース培養におけるcBGC-CMの影響

低酸素、低グルコースの条件で体外培養を行うことにより、成分既知培地で体細胞に依存することなく25%以上の高い胚盤胞形成率を得られることがわかったが、この系にcBGC-CMを添加することにより、さらに高い形成率を得られる可能性が考えられた。そこで、5%O₂の条件下で、2.2 mMグルコースと5 µg/ml insulinを添加したGF-199培地を用いてcBGC-CMの効果を検討した (Table 11)。1.25%から10%の濃度を検討したが、すべての濃度区でコントロール実験区の胚盤胞形成率30.5%と有意差はなく、cBGC-CMの効果は認められなかった。低酸素、低グルコースの条件でcBGC-CMの効果なくなる理由は不明であるが、この結果は、ウシ胚の初期発生には体細胞の産生する因子は本質的に必要ではないことを示唆している。

(5) 体外発生におよぼす抗酸化剤の影響

酸素毒性を緩和する方法として、酸素濃度の低減の他に抗酸化剤の発生培地への添加が考えられ、特殊な培養器 (低酸素培養器) を必要としない利点があり、また、胚を培養器外で取り扱う際に効果を発揮することが期待される。そこで、抗酸化作用を持つ種々の物質が裸化胚の発生におよぼす影響を検討した。試験した物質は、L-ascorbic acid、α-tocopherol、superoxide desumutase (SOD)、catalase、bovine apotransferrin (BAT)、dihydroxyethylglycin (DHEG)、glycylglycine、2-mercaptoethanol (2-ME) およびdithiothreitol (DTT) である。発生培地のグルコース濃度は2.2 mMとし、5%CO₂/95%air、38.5℃の条件で体外培養を行った。

これらのうち、低分子チオール化合物である2-MEとDTTのみに強い胚発生促進効果が認められた (Table 12およびTable 13)。2-MEは、71.3 nMと142.6 nMの濃度において強い発生促進効果を示し、胚盤胞形成率は、コントロール実験区の7.5%に対し、19.4%および17.2%であった。しかし、285.2 nMでは12.6%と効果があまり認められなくなり、713.0 nMにおいては、逆に胚発生を強く阻害し、胚盤胞まで発生

する胚は全くなかった。DTTは、100 nMにおいて、胚盤胞形成率をコントロール実験区の6.3%に対し13.5%と2倍以上増加させた。しかし、1000nMにおいては、胚発生を強く阻害し、胚盤胞まで発生したものは全くなかった。2-MEとDTTの有効濃度は100 nM付近の狭い範囲であり、過剰の添加は著しく発生を阻害するため、実用的な利用は難しいと考えられる。

(6) 成分既知培地で成熟培養した卵子の体外発生におよぼす細胞成長因子の影響
これまで裸化胚の培養条件に関する実験は、すべて血清添加培地 (M199培地+10%FBS) で成熟培養した卵子を用いて行ってきた。したがって、成分既知培地を用いて体外成熟した卵子が、体細胞を含まない培養系において効率よく胚盤胞期まで発生するかどうかは確認されていなかった。そこで、成分既知培地 (M199培地+5 µg/ml insulin+10 ng/ml TGF-α) において成熟培養を行った卵子を媒精後24~30時間で裸化し、2.2 mMグルコースと5 µg/ml insulinを添加したGF-199培地を用いて、5%O₂/5%CO₂/90%N₂、37.5℃の条件で培養した。あわせて、近年体外発生を促進することが報告されている細胞成長因子 (bFGF、insulin、TGF-α、TGF-β1、PDGF) を添加し、これらの発生におよぼす影響を検討した。

結果をTable 14に示した。コントロール実験区における胚盤胞形成率は27.4%で、これまで血清添加培地で成熟培養した卵子を用いて得られた結果と同等であった。この結果から、TGF-αの成熟培地への添加と低酸素/低グルコース条件の体外培養への適用によって、成分既知培地で成熟した卵子から、成分既知培地を用いて、体細胞に依存せずに効率よく胚盤胞を作出できることが示された。

細胞成長因子に関しては、試験したすべての因子に有意な効果は認められなかったが、bFGFとTGF-β1を同時に添加した実験区で、わずかではあるが胚盤胞形成率の増加が認められた (33.6%)。また、これらの細胞成長因子の発生培地への添加が凍結融解後の胚盤胞期胚の生存率を高める傾向が認められており、胚盤胞期胚の質の点からさらに検討を進める必要がある。

Table 1. Effects of growth factors and gonadotrophins during in vitro maturation on cumulus expansion and cleavage of bovine oocytes

Treatment*	No. of COCs** examined	No.(%) of COCs** expanded			No.(%) of fertilized ova cleaved
		Degree 0	Degree 1	Degree 2	
None	127	114 (89.8)	13 (10.2)	0 (0.0)	62 (48.8)
EGF	118	0 (0.0) ^a	10 (8.5)	108 (91.5) ^a	83 (70.3) ^a
TGF- α	121	0 (0.0) ^a	7 (5.8)	114 (94.2) ^a	89 (73.6) ^a
TGF- β 1	126	119 (94.4)	7 (5.6)	0 (0.0)	38 (30.2) ^b
bFGF	125	108 (86.4)	17 (13.6)	0 (0.0)	50 (40.0)
Insulin	131	101 (77.1) ^b	30 (22.9) ^b	0 (0.0)	71 (54.2)
LH	119	0 (0.0) ^a	0 (0.0) ^a	119 (100.0) ^a	89 (74.8) ^a
FSH	117	0 (0.0) ^a	0 (0.0) ^a	117 (100.0) ^a	99 (84.6) ^a
LH+FSH	119	0 (0.0) ^a	1 (0.8) ^b	118 (99.2) ^a	80 (67.2)
LH+EGF	119	0 (0.0) ^a	0 (0.0) ^a	119 (100.0) ^a	87 (73.1) ^a
FSH+EGF	116	0 (0.0) ^a	0 (0.0) ^a	116 (100.0) ^a	79 (68.1) ^b
LH+FSH+EGF	119	0 (0.0) ^a	0 (0.0) ^a	119 (100.0) ^a	88 (73.9) ^a
FBS	119	2 (1.7) ^a	74 (62.2) ^a	43 (36.1) ^a	78 (65.5) ^b

*EGF:epidermal growth factor, TGF- α :transforming growth factor- α , TGF- β 1 : transforming growth factor- β 1, bFGF:basic fibroblast growth factor, FBS:fetal bovine serum.
 **COCs:cumulus-oocyte complexes. ^{a,b}Percentages with a superscript differ from the percentage of the control in each column at $P < 0.001$ and at $P < 0.01$. Data were analyzed by χ^2 test.

Table 2. Effects of growth factors and gonadotrophins on nuclear maturation of bovine cumulus-enclosed oocytes

Treatment	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes at each nuclear stage*		
		GV	MI—TI	MII
None	175	33 (18.9 ^a)	65 (37.1 ^c)	77 (44.0 ^f)
EGF	184	0 (0.0 ^b)	61 (33.2 ^{cd})	123 (66.8 ^g)
TGF- α	51	8 (15.7 ^a)	11 (21.6 ^{de})	32 (62.8 ^g)
LH	56	9 (16.1 ^a)	11 (19.6 ^e)	36 (64.3 ^g)
FSH	58	10 (17.2 ^a)	15 (25.9 ^{cde})	33 (56.9 ^{fg})

*GV:germinal vesicle, MI:metaphase I, TI:telophase I, MII:metaphase II.
^{a, b, c, d, e, f, g} Percentages differ significantly at $P < 0.05$ (χ^2 test).

Table 3. Effects of growth factors and gonadotrophin on nuclear maturation of bovine denuded oocytes

Treatment	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes at each nuclear stage*		
		GV	MI—TI	M II
None	50	16 (32.0 ^a)	27 (54.0)	7 (14.0)
EGF	50	9 (19.6 ^{ab})	26 (46.4)	11 (23.9)
TGF- α	50	6 (12.0 ^b)	32 (64.0)	12 (24.0)
LH	51	6 (11.8 ^b)	32 (62.7)	13 (25.5)
FSH	50	11 (22.0 ^{ab})	28 (56.0)	11 (22.0)

*GV:germinal vesicle, MI:metaphase I, TI:telophase I, MII:metaphase II.
^{a, b, c} Percentages differ significantly at $P < 0.05$ (χ^2 test).

Table 4. In vitro development of bovine oocytes matured in defined media

Treatment	No. of ova added to fertilization drops	No. (%) of ova added to fertilization drops	
		cleaved	developed to blastocyst
None	194	98 (50.5 ^a)	19 (9.8 ^c)
EGF	196	152 (77.6 ^b)	35 (17.9 ^d)
TGF- α	198	156 (78.8 ^b)	42 (21.2 ^d)
LH+FSH	195	136 (69.7 ^b)	31 (15.9 ^{cd})
LH+FSH+EGF	198	155 (78.3 ^b)	38 (19.2 ^d)
FBS	198	156 (78.8 ^b)	38 (19.2 ^d)

Percentages differ significantly ^{a, b} at $P < 0.001$ and ^{c, d} at $P < 0.05$ (χ^2 test).

Table 5. Effect of concentrated BGC-CM on in vitro development of IVM/IVF derived bovine embryos

Medium*	No. of ova fertilized	No. (%) of fertilized ova developed to:		
		2-cell	8-cell	Blastocyst
FM	158	97 (61.4 ^a)	44 (27.8 ^c)	2 (1.3 ^e)
BGC-CM	171	124 (72.5 ^b)	80 (46.8 ^d)	30 (17.5 ^f)
cBGC-CM				
25-fold diluted with FM	164	114 (69.5 ^{ab})	53 (32.3 ^c)	5 (3.0 ^e)
10-fold diluted with FM	166	118 (71.1 ^{ab})	62 (37.3 ^c)	8 (4.8 ^e)

*FM: fresh medium (M199 + 5 µg/ml insulin + 0.5 µg/ml aprotinin);
 BGC-CM: bovine granulosa cell-conditioned medium; cBGC-CM: BGC-CM concentrated 25-fold by ultrafiltration with a YM-10 membrane and dialyzed against FM.
 a, b, c, d, e Percentages differ significantly at $P < 0.05$ (χ^2 test).

Table 6. Effects of reduced glucose concentration and concentrated BGC-CM on in vitro development of IVM/IVF derived bovine embryos

Glucose (mM)	cBGC-CM* (%)	No. of ova fertilized	No. (%) of fertilized ova developed to:		
			2-cell	8-cell	Blastocyst
1.1	0	47	33 (70.2)	20 (42.6)	4 (8.5 ^a)
1.1	10	47	34 (72.3)	17 (36.2)	14 (29.8 ^b)
5.6	0	59	45 (76.3)	29 (49.2)	2 (3.4 ^a)
5.6	10	54	38 (70.4)	54 (50.0)	6 (11.1 ^a)

*cBGC-CM: BGC-CM concentrated 25-fold by ultrafiltration with a YM-10 membrane and dialyzed against PBS (-).
 a, b Percentages differ significantly at $P < 0.05$ (χ^2 test).

Table 7. Effects of BSA and cBGC-CM on development of denuded bovine embryos in low glucose medium

BSA (mg/ml)	cBGC-CM (%)	No. of ova fertilized	No. (%) of ova developed to:		
			2-cell	8-cell	Blastocyst
0	0	111	90 (81.1)	65 (58.6)	2 (1.8 ^a)
0	5	113	94 (83.2)	70 (61.9)	8 (7.1 ^{ab})
5	0	112	88 (78.6)	64 (57.1)	14 (12.5 ^b)
5	5	113	92 (81.4)	71 (62.8)	30 (26.5 ^c)

a, b, c Percentages differ significantly at $P < 0.01$ (χ^2 test).

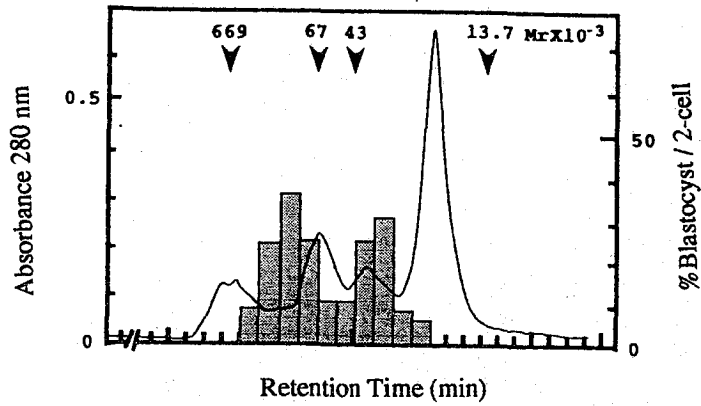


Fig. 1. Gel-permeation HPLC of BGC-CM
Shadedbars indicate embryogenesis-stimulating-activity (%blastocyst/2-cell).

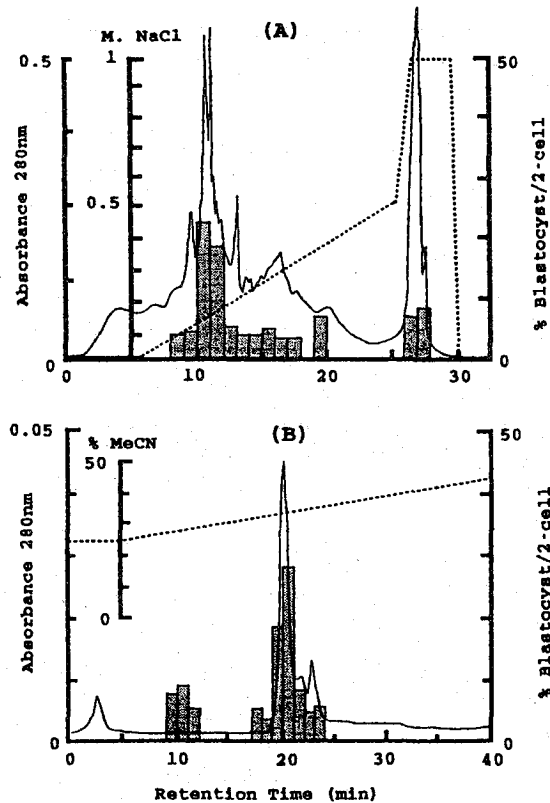


Fig. 2. Chromatography of EG-1 by A) Mono-Q ion-exchange HPLC and B) C-4 reverse-phase HPLC. Shadedbars indicate embryogenesis-stimulating-activity (%blastocyst/2-cell).

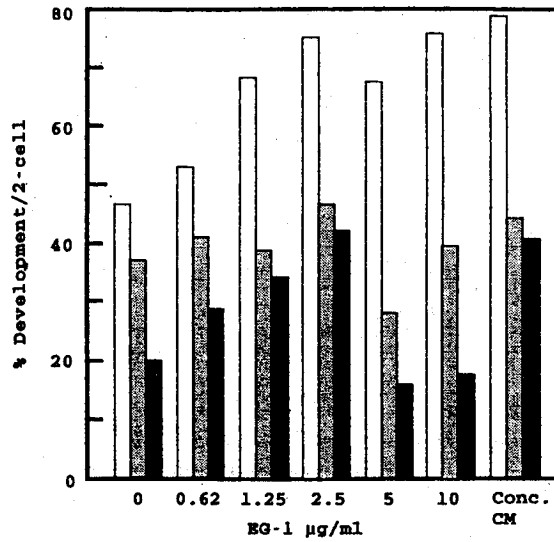


Fig.3. Dose-dependent stimulation of bovine embryo development by purified EG-1. Open bars:8-cell embryos, shaded bars: morulae, closed bars: blastocysts.

	1	5	10	
Embryogenin-1	(His) - Thr - X - Val - Pro - Pro - His - Pro - Gln - Thr - Ala - Phe - X - Asn			
	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
Bovine TIMP-1	Cys - Thr - Cys - Val - Pro - Pro - His - Pro - Gln - Thr - Ala - Phe - Cys - Asn			
	15	20	25	
Embryogenin-1	Ser - Asp - Val - Val - Ile - Arg - Ala - Lys - Phe - Val - Gly - Thr - Ala - X - Val -			
	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
Bovine TIMP-1	Ser - Asp - Val - Val - Ile - Arg - Ala - Lys - Phe - Val - Gly - Thr - Ala - Glu - Val -			

Fig. 4. Amino-terminal amino acid sequence of EG-1

*Sequence identity between amino-terminal amino acid sequence of EG-1 and bovine TIMP-1. X: unidentified amino acids tentatively assumed to be cysteine. (): less than total confidence.

Table 8. Effects of gas phase and the presence or absence of BGC on the development of IVM/IVF bovine embryos cultured in high glucose medium (5.6 mM)

Treatment		No. of ova fertilized	No.(%) of fertilized ova developed to:		
Gas	With (+) or without (-) BGC coculture		2-cell	8-cell	Blastocyst
20%O ₂	+	120	94 (78.3)	80 (66.7 ^a)	18 (15.0 ^c)
	-	117	95 (81.2)	65 (55.6 ^{ab})	3 (2.6 ^d)
5%O ₂	+	118	90 (76.3)	56 (47.5 ^b)	3 (2.5 ^d)
	-	119	88 (73.9)	72 (60.5 ^a)	13 (10.9 ^c)

a, b, c, d Percentages differ significantly at $P < 0.05$ (χ^2 test).

Table 9. Effect of glucose concentrations on the development of denuded bovine embryos cultured alone with defined medium under a low oxygen atmosphere

Glucose (mM)	No. of ova fertilized	No. (%) of fertilized ova developed to:		
		2-cell	8-cell	Blastocyst
0.0	111	82 (73.9)	63 (56.8)	18 (16.2 ^{ab})
1.1	127	93 (73.2)	69 (54.3)	19 (15.0 ^{ab})
2.2	131	100 (76.3)	86 (65.6)	31 (23.7 ^a)
3.3	122	96 (78.7)	69 (56.5)	21 (17.2 ^a)
4.4	117	89 (76.1)	72 (61.5)	20 (17.1 ^a)
5.6	128	91 (71.1)	72 (56.3)	11 (8.6 ^b)

a, b, c Percentages differ significantly at $P < 0.05$ (χ^2 test).

Table 10. Effects of gas phase and the presense or absense of BGC on the development of denuded bovine embryos cultured in low glucose medium (2.2mM)

Treatment		No. of ova fertilized	No. (%) of fertilized ova developed to:		
Gas	With (+) or Without (-) BGC Coculture		2-cell	8-cell	Blastocyst
20% O ₂	+	160	123 (76.9)	77 (48.1 ^a)	8 (5.0 ^d)
	-	156	127 (81.4)	106 (67.9 ^{ab})	6 (3.8 ^d)
5% O ₂	+	146	106 (72.6)	74 (50.7 ^{bc})	3 (2.1 ^d)
	-	154	119 (77.3)	96 (62.3 ^c)	43 (27.9 ^e)

a, b, c, d Percentages differ significantly at $P < 0.05$ (χ^2 test).

Table 11. Effect of concentrated BGC-CM on development of denuded bovine embryos in defined medium under a low oxygen atmosphere

BGC-CM (% v/v)	No. of ova fertilized	No. (%) of fertilized ova developed to:		
		2-cell	8-cell	Blastocyst
0.0	210	173 (82.4)	120 (57.1)	64 (30.5)
1.25	216	161 (74.5)	119 (55.1)	57 (26.4)
2.5	217	179 (82.5)	138 (63.6)	74 (34.1)
5.0	220	182 (82.7)	139 (63.2)	65 (29.5)
10.0	218	173 (79.4)	123 (56.4)	63 (28.9)

Table 12. Effect of 2-mercaptoethanol on development of IVM/IVF derived bovine embryos

2-Mercaptoethanol (nM)	No. of ova fertilized	No.(%) of fertilized ova developed to:		
		2-cell	8-cell	Blastocyst
0	226	181 (80.1)	156 (69.0)	17 (7.5 ^h)
14	118	86 (72.9)	72 (61.0)	13 (11.0 ^{bc})
71	237	181 (76.4)	158 (66.7)	46 (19.4 ^d)
143	232	186 (80.2)	151 (65.1)	40 (17.2 ^{cd})
285	174	134 (77.0)	115 (66.1)	22 (12.6 ^{bcd})
713	122	87 (71.3)	75 (61.5)	0 (0.0 ^a)

a, b, c, d Percentages differ significantly at $P < 0.05$ (χ^2 test).

Table 13. Effect of dithiothreitol on development of IVM/IVF derived bovine embryos

Dithiothreitol (nM)	No. of ova fertilized	No.(%) of fertilized ova developed to:		
		2-cell	8-cell	Blastocyst
0	96	81 (84.4 ^{cd})	68 (70.8 ^{fg})	6 (6.3 ⁱ)
1	95	75 (78.9 ^{bc})	67 (70.5 ^{fg})	7 (7.4 ⁱ)
10	95	86 (90.5 ^d)	73 (76.8 ^g)	7 (7.4 ⁱ)
100	96	66 (68.8 ^{ab})	60 (62.5 ^f)	13 (13.5 ⁱ)
1000	97	58 (59.8 ^a)	30 (30.9 ^e)	0 (0.0 ^h)

a, b, c, d, e, f, g, h, i Percentages differ significantly at $P < 0.05$ (χ^2 test).

Table 14. Effects of various growth factors on the development of bovine IVM/IVF embryos under improved culture conditions

Treatment	No. of ova fertilized	No.(%) of fertilized ova developed to blastocyst
None	124	34 (27.4 ^{ab})
bFGF (10 ng/ml)	115	34 (29.6 ^{ab})
Insulin (5 µg/ml)	115	23 (20.0 ^a)
TGF- α (10 ng/ml)	115	23 (20.0 ^a)
PDGF (1 ng/ml)	117	32 (27.4 ^{ab})
bFGF (10 ng/ml) +TGF- β 1 (1 ng/ml)	116	39 (33.6 ^b)

a, b Percentages differ significantly at $P < 0.05$ (χ^2 test).

論文審査の要旨

本論文は牛卵母細胞の体外成熟，体外受精，体外発生のための体外培養について，無蛋白質成分既知培養液を用いた培養系を確立することを目的として行ったもので従来の培養系よりも効率のよい一つの成分既知培養系を開発し新しい方法論を確立した。

まず，従来，発生阻害は他の体細胞との共培養によって解除する培養系であるが体細胞を含まない体外成熟／体外発生系を確立するため，体細胞を除いた培地に対するゴナドトロピン，細胞成長因子などの添加培地を検討し，表皮成長因子（EGF）腫瘍成長因子 α ， β （TGF α ， β ），LH，FSHなどを添加し，成熟と発生させることを可能にした（第2章）。

次いで顆粒膜細胞由来の胚発生促進因子の解析を行いその本体を明らかにした。すなわち，顆粒膜細胞の培養上清中に胚発生促進物質が含まれることからその物質の特性や抽出精製を行った。その結果，加熱処理プロテアーゼ処理で促進活性が失われる物は，浸透・イオン交換および逆相の3段階のHPLCで精製し，30,000と80,000の分子量を持つもので前者は逆相カラムSDS-PAGEで単一のバンドとして得られアミノ末端アミノ酸配列をエドマン法で分析して29番目までの配列が牛組織性メタロプロテアーゼと93%の相同性を認めた（第3章）。最後に成分既知培地における牛体外受精卵子の効率的な培養系を得るために酸素濃度，グルコース濃度細胞成長因子などの諸条件を検討し効率の高い培養法を開発した。まず，酸素濃度とグルコース濃度について共培養系と成分既知培地で比較検討し，成分既知培地では低酸素濃度（5%）で低グルコース濃度（2.2mM）が最も効率よいことを明らかにした。

更に，TGF β 2を成熟培地へ添加し，低酸素／低グルコース条件を体外培養系へ適用することで成分既知培地でIVM・IVFをして，成分既知培地でのIVCを行うことにより，これまでの共培養系と比べ有為に高い発生率を得ることに成功した（第4章）。

本研究の成果は牛の体外成熟，卵子からの産子と改良の手段として実用化を一層推進させるだけでなく，卵子の初期発生過程における発生機構や栄養要求などの基礎研究の方法論として画期的なものである。

よって博士（農学）の学位を授与されるに十分な資格があるものと判定された。