

氏 名 (本籍) 寺 田 幸 弘

学位の種類 博 士 (医 学)

学位記番号 医 第 2745 号

学位授与年月日 平 成 7 年 3 月 8 日

学位授与の条件 学位規則第4条第2項該当

最 終 学 歴 昭 和 63 年 3 月 25 日  
東北大学医学部医学科卒業

学位論文題目 Localization of Microfilaments During Oocyte  
Maturation.  
(卵成熟における Microfilaments の局在)

(主 査)

論文審査委員 教授 矢 嶋 聰 教授 高 橋 徹

教授 名 倉 宏

# 論 文 内 容 要 旨

## 【研究目的】

哺乳動物では、成熟卵胞内の卵核胞期（GV）卵が、LH サージにより休止していた減数分裂を再開し、第二減数分裂中期（M2）の状態となり受精能を有した成熟卵となり排卵する。この過程が卵成熟である。ヒト体外受精、胚移植プログラムでは、卵胞から卵を採取するため、獲得される卵の数割が受精能を有していない未熟な卵である。卵成熟の過程を明らかにして、より良好な体外での成熟培養環境を検討することは臨床上有意義なことである。

未熟卵を卵胞内から取り出し体外培養をすると、多くの卵の核相は M2 に到達するが、それらの卵の受精能は非常に低い、この事実から受精に備えた卵の細胞質の成熟の存在が考えられている。卵核成熟については、形態的な解析が容易であり種々の検討がされているが、卵細胞質成熟については未だに不明な点が多い。

Microfilaments（MF）はアクチンポリマーより構成され、細胞膜の裏打ち構造を中心とし細胞骨格系の一要素として細胞質を構成している。今回、体外、体内卵成熟過程における細胞質構成要素としての MF の局在の変化を、蛍光抗体法と共焦点走査型レーザー顕微鏡（CLSM）による観察で明らかにし、卵核成熟、卵細胞質成熟とその動態の関係を検討した。

## 【方 法】

性成熟雌ゴールデンハムスターを pregnant mare serum gonadotroine-human chorionic gonadotropine 処理し、各成熟段階の卵を卵管及び卵胞から採取した。一部の GV 卵は TALP（Tyrode Albumin Lactate Pyruvate）を基本培地として、体外成熟培養した。このようにして得られた体内成熟、体外成熟の各過程の卵の核の状態と MF の局在を観察し、比較検討した。次に、GV 卵をアクチン重合阻害剤である cytochalasin D 添加培地で培養し、17 時間後の核の状態と MF の局在を観察した。最後に、GV 卵を hypoxanthine 添加培地で核成熟を停止させた状態で培養し、17 時間後の MF の局在を観察した。MF は透明体除去卵を固定、細胞膜透過処理後 FITC-phalloidin で蛍光染色した。十分な洗浄の後、全載標本を共焦点走査型レーザー顕微鏡（CLSM）で観察した。

## 【結 果】

卵の全載標本を CLSM で観察することにより、MF の細胞内の局在を無侵襲で 3 次元的に解析することが可能となった。

GV 卵に MF は殆ど認められなかったが、成熟に伴い細胞膜直下に MF が集積してゆくのが観察された。特に M2 卵では、第一極体放出部に特に強く集積しているのが観察された。しかし、体外成熟 M2 卵の 43% に第一極体放出部以外の細胞膜直下の MF の形成が観察されなかった。Cytochalasin D 添加培養卵では、metaphase like chromosome が卵の中心部に観察され、MF は観察されなかった。Hypoxanthine 添加培養による核成熟停止卵に、核相が GV にも拘わらず細胞膜直下に MF が集積しているのが観察された。

### 【 考 察 】

卵体内成熟時の MF の動態を明らかにした。体外成熟卵の一部で、核相が M2 であるにも拘わらず細胞膜直下の MF の形成が不十分であるものが存在した。受精における MF の役割は未だ不明な点が多いが、この事実が体外成熟卵の低受精率の一因となっている可能性が考えられる。Cytochalasin D 添加培養卵の観察から、MF は核の卵表層への移動及び極体放出に関与していると考えられるが、hypoxanthine にて核成熟を停止した卵にも細胞膜直下の MF の形成が観察された。この事実は核と MF の動態に discrepancy が存在することを示し、MF の動態が卵細胞質成熟の一要素となっている可能性が考えられた。

## 審査結果の要旨

現在の不妊症治療において、体外受精・胚移植は欠くことのできない治療法となっている。従来より、妊娠率を向上させるための種々の試みが報告されているが、20%前後で頭打ちになっているのが現状である。体外受精・胚移植の妊娠率を頭打ちにしている一因として、体外成熟培養した配偶子の受精能の低さがある。哺乳動物では、成熟卵胞内の卵核胞期（GV）卵がLHサージにより休止していた減数分裂を再開し、第2減数分裂中期（M2）の成熟卵となり排卵する。この過程が卵成熟である。ヒト体外受精・胚移植プログラムでは、卵胞から採卵するため、獲得される卵の約3割が受精能を有していない未熟な卵である。卵成熟のメカニズムを明らかにして、より良好な体外成熟培養環境を検討することは臨床上非常に意義深い。未熟卵を卵胞内より取り出し体外培養すると、多くの卵の核相はM2に到達するが、それらの卵の受精能は非常に低い。この事実から受精に備えた卵の細胞質の成熟の存在が考えられている。卵核成熟については、形態的な解析が比較的容易であり種々の検討が報告されているが、卵細胞質成熟については未だに不明な点が多い。

本研究では、卵成熟過程でのMicrofilaments（MF）の動態を観察している。MFはアクチンポリマーより構成され、細胞骨格系の一要素として細胞質を構成している。従来、細胞骨格系研究は主として電子顕微鏡による解析が為されていた。本研究では、MFを蛍光抗体法で染色し、全裁標本を共焦点走査型レーザー顕微鏡で観察している。この方法により、無侵襲で卵の3次元の細胞骨格構築の解析を行うことが可能となり、本研究の独創的な点として特筆される。

体内の成熟過程では、その進行にともない細胞膜直下にMFが集積していくのが観察された。また、体外成熟卵に細胞膜直下のMFの集積が未熟なものが存在することが認められた。さらに、核成熟阻害剤、アクチン重合阻害剤の添加実験から、卵核の動態と独立したMFの動態が存在することが明らかになった。以上の結果より、卵成熟過程でのMFの動態が初めて明らかになった。また、体外成熟卵の観察より、卵が正常な受精能を得るためには、成熟の過程で細胞膜直下にMFが集積することが必要である可能性が考えられた。さらに、核の動態と独立したMFの動態が存在することから、MFの動態が卵細胞質成熟の一要素である可能性が考えられた。この知見は、今後の卵細胞質成熟研究における新しい解析法を示した点で意義深い。

以上、本研究は未だ解明され得ない問題が山積している卵成熟、特に卵細胞質成熟のメカニズム解明に新しい手がかりを与えるものと考えられ、学位論文に十分値するものと判断される。