培養ブタ卵胞卵における“核の形成”と“分割”について

佐藤英明・入谷 明・西川義正*

(京都大学農学部)

著者らはブタとウシ卵胞卵の体外培養下での成熟に影響する要因や成熟に要する時間についてしらべ¹⁻⁵⁾、最適な培養条件のもとではブタ卵胞卵は培養 14 時間で卵核胞が崩壊し、第 1 成熟分裂中期に達するが、速いものでは培養 22~23 時間で第 2 成熟分裂中期へ進むことを明らかにした⁶⁾。また培養時間が長くなると染色体の凝縮や細胞の崩壊などの退化現象が高頻度に見られるようになると同時に、核の変化や“分割”像も見られるようになる。そこで今回、体外培養下での卵胞卵の核の変化と“分割”についてしらべたので報告する。

材料及び方法

卵胞卵の調製、培養及び観察方法は前報¹⁻⁵⁾の通りであるが、卵胞卵は主に卵丘細胞を有するものを用いた。なお培養液としては修正 KRB (KRB) 及び Eagle MEM (MEM 阪大微研製) を用いた。なお培養液にはウシ血清アルブミン分画 V 1 mg/ml、ペニシリン 100 IU/ml 及びストレプトマイシン 50 µg/ml を添加した。表示の培養時間は卵子を培養シャーレに入れてから固定するまでの時間とし、培養液は 24~30 時間ごとに更新した。

結 果

1 “核の形成”と“分割”像の出現時間

予備的に卵胞卵を KRB で 72 時間培養したところ、“核” (核膜を有し、染色質が観察され、卵核胞にくらべて小さい核、図 1, 2) 及び“極体” (極体、“分割”した極体、極体様抽出物を含む) が観察された。そこで KRB と MEM を用いて培養し、3 時間ごとに固定染色して観察した。卵丘細胞をもつ卵子では表 1 に示すように“核の形成”は KRB の場合、培養 57 時間から観察さ

れた。MEM では 69 時間から観察され、KRB にくらべて“核”の出現時間が 12 時間延長した。また表 2 に示すように KRB では 72 時間から“割球”を 2 ないし 3 個有する“分割”卵が観察された (図 3, 4)。“割球”を 4 個以上有する卵子は極く少数しか観察されず、時間の経過にともなって“割球”数が増加する現象はみられなかった。また卵丘細胞をもたない卵子を修正 KRB で培養した場合、表 3 に示すように培養 27 時間から“核”が観察され、卵丘細胞をもつ卵にくらべ 30 時間早く“核の形成”がみられた。しかし“分割”卵は観察されず、細胞の崩壊像を呈する退化卵が多くみられた。なお本実験では各時間ごとの卵子の“核”及び“極体”を観察するため、観察時に固定標本を作成した。また表 2 にしめた数値は同一の卵子群を経時的に観察した結果ではない。

2. 細胞学的観察

a. “核形成”卵: 本実験で観察された“核の形成”は正常な分裂過程を経たものではないと思われる。従って“極体”と“核の形成”とは直接に関連する現象ではないが、表 1 に示した KRB で 57~78 時間培養した卵子の観察結果を細胞学的観点から表 4 のようにまとめてみた。計 305 個の卵子のうち成熟分裂の種々のステージにあるものは 175 個 (57.4%) であり、また染色体の凝縮や細胞の崩壊したものなどの退化卵は 60 個 (19.7%) であった。“極体”数 2 個の卵子が 6 個観察されたが、第 2 極体の放出像は観察されなかった。また“核”を 1 個有する卵子は 63 個で“核形成”卵の多数を占める。なお 2 個の“極体”が観察された卵子のうち 5 個には“核の形成”がみとめられ、残りの 1 個は退化卵であった。

b. “分割”卵: 表 2 に示した培養 72~111 時間における“分割”卵を“極体”数によって分類し、表 5 に示した。計 346 個の卵子をしらべたが、そのうち 50 個に“分割”が認められた。“極体”数 0 が 19 個 (38.0%)、 “極体”数 1 が 30 個 (60.0%)、 “極体”数 2 が 1 個 (2.0%) であり、“極体”数 0 及び 1 個の卵子が全“分割”卵の 98% を占めた。

“割球”内の“核”は成熟分裂像を呈するもの、“休止

*現所属 帯広畜産大学
“Formation of nucleus” and “cleavage” of pig follicular oocytes cultured *in vitro*.

SATO, Eimei, Akira IRITANI & Yoshimasa NISHIKAWA* (College of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 606. *Present address; Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro 080) *Japan. J. Anim. Reprod.* 25 (2), 1979.

Table 1. Time course for the "formation of nucleus" in pig follicular oocytes with corona cells cultured *in vitro*

Duration of culture (hrs)	Modified KRB		Eagle MEM	
	No. of ova examined	No. of ova with "nucleus" (-ei)	No. of ova examined	No. of ova with "nucleus" (-ei)
48.0	23	0	—	—
51.0	33	0	—	—
54.0	19	0	14	0
57.0	19	1	37	0
60.0	24	7	12	0
63.0	22	4	40	0
66.0	23	6	42	0
69.0	21	13	29	4
72.0	62	1	33	5
75.0	73	21	12	1
78.0	61	13	32	5
81.0	—	—	25	5

Table 2. "Cleavage" of pig follicular oocytes cultured in modified KRB *in vitro*

Duration of culture (hrs)	No. of ova examined	No. of "cleaved" ova	No. of ova classified with no. of blastomeres					
			2	3	4	5	8	9
69.0	23	0	0	0	0	0	0	0
72.0	70	3	2	1	0	0	0	0
75.0	52	4	3	0	0	0	0	1
78.0	20	1	0	0	0	0	1	0
81.0	10	2	1	0	0	1	0	0
84.0	10	1	1	0	0	0	0	0
87.0	10	1	1	0	0	0	0	0
90.0	10	3	3	0	0	0	0	0
93.0	20	4	3	1	0	0	0	0
96.0	37	3	2	1	0	0	0	0
99.0	10	4	3	1	0	0	0	0
102.0	43	10	5	4	0	0	1	0
105.0	20	2	0	1	0	0	1	0
108.0	20	7	4	1	1	0	0	1
111.0	14	5	3	1	0	0	1	0

Table 3. Time course for the "formation of nucleus" in pig follicular oocytes without corona cells cultured in modified KRB *in vitro*

Duration of culture (hrs)	No. of ova examined	No. of ova with "nucleus" (-ei)
24.0	12	0
27.0	39	1
30.0	23	2
33.0	7	1
36.0	8	2
39.0	13	1
42.0	15	2
45.0	16	1
48.0	38	3

Table 4. Cytological aspects of the ova cultured for 57~78 hours in modified KRB *in vitro*

Duration of culture (hrs)	No. of ova examined	No. of ova at meiotic stage	No. of ova cleaved	No. of ova with "nucleus"		No. of ova with two "polar bodies"	No. of degenerating ova
				Total	No. of "nucleus" 1 2		
57~78	305	175 (57.4)	4 (1.3)	66 (21.6)	63 3	6	60 (19.7)

Table 5. Number of polar bodies observed in the "cleaved" ova *in vitro*

Duration of culture (hrs)	No. of ova examined	No. of ova "cleaved"	No. of ova classified with no. of "polar body"		
			0	1	2
72~111	346	50	19 (38.0)	30 (60.0)	1 (2.0)

Table 6. Morphological aspects of the "cleaved" ova *in vitro*

Duration of culture (hrs)	No. of "cells"	No. of ova examined	No. of ova without 1 "nucleus" per "blastomere"	No. of ova with 1 "nucleus" per "blastomere"	No. of ova with 2 "nuclei" in "blastomere"
72~111	2	31	22	7	2
	3	11	9	1	1
	4	1	0	0	1

核”を認めうるもの，“休止核”と分裂像の双方の認められるもの、あるいは核の存在しないものなど多様であった。表6に示すように、観察された31個の2“細胞”卵では、1“割球”当たり1個の“核”を有するものは7個、2“割球”のうちの1“割球”に2個の核を有するもの2個であり、残りの22個は1“割球”にのみ“核”1個を有するか、または2“割球”とも“核”をもたない卵子であった。また3及び4“細胞”卵の9個では、3“細胞”卵に1“割球”当たり1個ずつの“核”を有する卵子が1個みられたほか、“割球”内に“核”を欠くか、あるいは1“割球”内に2個の“核”を有するものであった。

考 察

CHANG⁶⁾ はフェレットで排卵後8~10日に約60%の卵子が2~6“細胞”に“分割”していたとのべている。AUSTIN⁷⁾ もハムスター及びラットにおいて未受精卵子の第2極体の放出、“分割”を観察している。石

橋^{8,9)}によってラット卵管内卵子の“核”や“分割”の大意が明らかにされたが、ラット卵管内卵子は排卵後26時間で“分割”をはじめ、50時間以降にはほぼ普遍的におこることが報告されている。

また DEMPSEY¹⁰⁾ (モルモット), KRAFKA¹¹⁾ (ラット, マウス, モルモット), BACSICH & WYBURN¹²⁾ (モルモット, ウサギ, ラット) とも卵胞卵はとくにその退化過程において“分割”することを観察している。このように卵管卵や卵胞卵に“分割”がおこることは良く知られた事実である。本実験の培養ブタ卵胞卵ではKRB液中で33時間で“核”を“形成”し、75時間以後に“分割”がみられた。ブタの卵管内未受精卵の fragmentation については DZIUK¹³⁾ の報告があるが、排卵後4~5日に高い比率で fragmented ova が観察されている。体外培養下での卵胞卵の“分割”は培養75時間、約3日でみられ、第2成熟分裂中期までの成熟に22~30時間、約1日を要することを考える⁹⁾ と体外での方が早く“分割”がおこると考えられる。また卵丘細胞のない卵、

すなわち卵齢のすすんだ卵子においては、培養 27 時間ですでに“核の形成”がみられ、培養液 KRB は MEM よりも“核の形成”時間が 12 時間早いなど本実験でも“核の形成”や“分割”に至る時間は種々な条件によって左右されている。

近年卵管卵の体外受精のみならず、卵胞卵の体外受精が試みられているが、卵胞卵に“核の形成”や“分割”などがおこることは、受精の判定を困難にするものと考えられる。

本実験において“核の形成”は 33 時間、“分割”は 75 時間以前には観察されていないので、体外受精において、これ以前に“核の形成”や“分割”が観察された場合は受精の結果と考えられ、一つの目安となるであろう。ラット卵管卵では“核の形成”、第 2 極体の放出、“分割”などがおこり、細胞学的にも受精卵に類似していると報告されている^{14,15)}。ブタ卵胞卵においても本実験で明らかのように“核の形成”、“分割”など受精卵に類似する像がみられるので、受精の判定には慎重を要すると考えられる。

なお本実験における“極体”数 2 個の卵子は第 2 成熟分裂の結果に起因するのか、第 1 極体の“分割”によるものか判然としないので単に“極体”数 2 個と表現した。また活性化とは「受精によって表層変化、極体の放出、卵割など著しい変化を起こし、続いて発生へと進むが、このような変化の始動を未受精卵に与える」¹⁶⁾ ことと定義され、第 2 極体の放出が重要なポイントとなるが、本実験では第 2 極体の放出像は観察されなかった。以上のことから今回観察された“核の形成”や“分割”は若干の例外はあるとしても、基本的には退化過程におけるものと考えられる。

要 約

卵丘細胞をもつブタ卵胞卵を培養し、3 時間ごとに核の変化と“分割”をしらべた。

1. KRB で培養した場合には 57 時間から“核の形成”が認められるが、MEM では 69 時間であった。また卵丘細胞をもたない卵胞卵では KRB 液で培養 27 時

間から“核の形成”がみられた。“分割”卵は KRB 培養で 72 時間から観察され、その主体は 2“細胞”卵であり、経時的な“分割”ステージの進展はみられなかった。

2. KRB で 57~78 時間培養の 305 個の卵子のうち、“核形成”卵は 67 個であったが、それらの卵の“極体”数は 0, 1, 2 と多様であり、“極体”数 1 個の卵が多数を占めた。“核”の数は 1 個と 2 個であり、“核”1 個を有する卵が多数を占めた。

3. 以上の現象は退化過程におこったものと考えられる。

本研究の一部は Ford 財団 (Grant No. 740-0404) 及び文部省科学研究費 (No. 056120) の援助を受けた。

(1978. 12. 26 受付)

文 献

- 1) 佐藤(英)・入谷(明)・西川(義): 本誌 23, 12, 1977.
- 2) 佐藤(英)・石橋(武): 日畜会報 48, 107, 1977.
- 3) SATO, E., A. IRTANI & Y. NISHIKAWA: *Jap. J. Zootech. Sci.* 48, 333, 1977.
- 4) 佐藤(英)・入谷(明)・西川(義): 日畜会報 49, 236, 1978.
- 5) 佐藤(英)・入谷(明)・西川(義): 日畜会報 49, 400, 1978.
- 6) CHANG, M. C.: *Anat. Rec.* 128, 187, 1957.
- 7) AUSTIN, C. R.: *J. Exp. Biol.* 33, 338, 1956.
- 8) 石橋(功): 日畜会報 30, 212, 1959.
- 9) 石橋(功): 日畜会報 32, 291, 1961.
- 10) DEMPSEY, E. W.: *Anat. Rec.* 75, 223, 1939.
- 11) KRAFKA, J.: *Anat. Rec.* 75, 19, 1939.
- 12) BACSICH, P. & G. M. WYBURN: *J. Anat.* 79, 177, 1945.
- 13) DZIUK, P.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 103, 91, 1960.
- 14) AUSTIN, C. R.: *J. Endocrinol.* 6, 104, 1949.
- 15) AUSTIN, C. R. & A. W. H. BRADEN: *Nature* 173, 999, 1954.
- 16) 岩波生物学辞典, 岩波書店, 第 11 刷 p. 156, 1974.

PLATE

Fig. 1. A pig oocyte with one "nucleus" and without "polar body", recovered at 75 hours of culture, $\times 400$.

Fig. 2. A pig oocyte with two "nuclei" and without "polar body", recovered at 69 hours of culture, $\times 400$.

Fig. 3. A pig ova with two "blastomeres", recovered at 72 hours of culture, $\times 100$.

Fig. 4. A pig ova with three "blastomeres", recovered at 72 hours of culture, $\times 100$.

Summary

Experiments were carried out to examine "formation of nucleus" and "cleavage" in pig follicular oocytes cultured *in vitro*. When oocytes with corona cells were cultured in modified Krebs Ringer bicarbonate solution, "formation of nucleus" was observed at 57~60 hours, and at 27 hours in the oocytes without corona cells. The predominantly found numbers of "nucleus" in the oocytes were one and two. Extrusion of the second polar body was not observed, but the oocytes having two "polar bodies" were observed. "Cleavage" occurred at 72 hours of culture in modified Krebs Ringer bicarbonate solution. Fragmenting ova which closely resemble segmenting ova were observed, the predominantly found type of "cleaved" ova was 2 "cell", and 3 and 4 "cell" ova were also observed. When oocytes were cultured in Eagle MEM, "formation of nucleus" was observed at 69 hours of culture.

家畜繁殖研究会表彰規程 (昭和 42 年 4 月 8 日改正)

- 第 1 条 本会会員で家畜繁殖に関する研究、技術の向上
または普及に顕著な功績のあったものに対して、この
規程の定めるところにより表彰する。
- 第 2 条 表彰は会長が行なう。
- 第 3 条 表彰は毎年 1 回総会で行なう。
- 第 4 条 表彰は、表彰状を授与して行なう。
2 表彰には、副賞を添えることがある。
3 表彰状および副賞には、総会の決議を経て名称を
冠することができる。
- 第 5 条 表彰は、原則として本会会誌に発表されたもの
とするが、普及を対象として表彰する場合は本会会誌
以外に全国的規模の畜産関係誌に発表されたものも含
み、それぞれ会員の推せんしたもののうちから行な
う。
- 第 6 条 被表彰者を推せんする者は、被推せん者の氏
名、所属、推せん理由に推せん者の氏名を付して、毎
年 10 月 31 日までに会長に提出するものとする。
- 第 7 条 本会内に、表彰選考委員会をおく。
2 表彰選考委員は、毎年理事会で決定し、会長が委
嘱する。
3 表彰選考委員会は、その審査結果を理事会に報告
する。
4 被表彰者の決定は理事会で行なう。
- 第 8 条 表彰は、家畜繁殖に関して学術団体から表彰さ
れた者になるべく除外する。
- 附 則
1 この規程は、昭和 42 年 4 月から実施する。
2 第 4 条第 3 項の表彰状および副賞の名称には、家畜
繁殖の基礎部門に島村賞、応用部門に佐藤賞、普及部
門に斎藤賞の名称を冠する。