

卵核胞期に媒精したイヌ卵子における雌雄両前核の形成

島津 美樹¹・内藤 邦彦²

¹(株)CSKリサーチパーク 長野県諏訪市 〒392 ²東京大学医科学研究所 東京都港区 〒108

要旨: イヌは排卵の2~3日前から交配が可能であること、排卵時の卵子は卵核胞期(GV期)であることから、GV期の卵子に精子が侵入し正常に発生する可能性が考えられる。本試験では排卵直前のGV期の卵子を採取直後媒精し72時間後まで培養することにより、精子侵入率、精子侵入卵子の核ステージ及び精子核の膨潤化の関係を調べ、イヌのGV期卵子が受精に携わる可能性について検討した。精子侵入率は媒精後24時間ではすでに64.4%と最高値に達していたが、その精子侵入卵子の成熟率は6.9%であった。従って、GV期の卵子が精子の侵入を受けたと考えられた。その後、精子侵入率と成熟率は媒精後48、72時間でそれぞれ57.1%及び17.9%、54.3%及び60.0%となった。媒精後72時間の成熟受精卵の26.7%に雌雄両前核が認められた。以上の結果より、イヌではGV期に受精した卵子が前核を形成することが示され、GV期卵子が正常受精に携わる可能性が示唆された。

キーワード: イヌ卵子、卵核胞期、雌雄両前核。

イヌにおける卵子の排卵、成熟及びその後の受精は、ほかの多くの哺乳動物の場合に比較して特異的な特徴を有している。Van der Strichtは、イヌの排卵は未成熟なステージである卵核胞期(GV期)で起こることを初めて報告した[1]。筒井は、イヌの排卵時の卵子はGV期であり、排卵後48~72時間で卵管内において成熟し受精能を獲得することを報告している[2]。イヌ卵子の体外成熟の試みはMahi and Yanagimachi[3]、Yamadaら[4]及びNicksonら[5]によって行われたが、いずれも48~72時間の培養で成熟卵子が得られている。

一方、Evans and Cole[6]とPhemisterら[7]は、イヌは排卵の2~3日前から1週間後まで交配が可能であることを報告した。筒井と清水[8]は排卵前54時間に交配したと考えられるイヌが受胎したことを報告している。また、Mahi and YanagimachiはGV期にあるイヌ卵子を体外受精し、11~24時間後において精子侵入が認められたことを報告した[3]。これらの報告を考慮すると、イヌではGV期の卵子が受精に携わるのが生理的な状態であるとも考えられる。しかし、これまでに排卵直後に媒精された卵子が正常に前核を形成するか否かについて確認した報告はない。

そこで今回我々は、山田らの方法[4]に従い発情休止期にあるイヌに人為的発情を誘起して排卵直前の卵子を採取

し、採取直後に体外受精し72時間後まで培養することにより、精子侵入率、精子侵入卵子の核ステージ及び精子核の膨潤化の関係を調べ、GV期の卵子が受精に携わる可能性について検討した。

材料と方法

1) 発情誘起: 山田らの方法[4]に従った。すなわち、性成熟に達した1~3歳齢の雌のビーグルの血漿中プロジェストロン濃度が10 ng/ml未満である個体に、エストロン(Estrone; Sigma Chemical Co.)を100、200及び400 mgと段階的に3日ずつ9日間を限度に連日筋肉内投与し、外陰部から明確な出血が認められた8頭を実験に供した。出血が確認された時点でのエストロンの投与を中止し、その後に妊娠馬血清性腺刺激ホルモン(セロトロピン®; 帝国臓器製薬株式会社)400 I.U.とヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(ペロゲン®; 三共株式会社、以下hCG)1000 I.U.を混合筋肉内投与し、さらに3日後、エストラジオール(安息香酸エストラジオール注・DS; デンカ製薬株式会社)を10 mgずつ2日間筋肉内投与した。エストラジオール投与終了後、腫瘍スメア像を観察しながら明確なEstrusを示した初日にhCG1,000 I.U.を静脈内投与した。

2) 卵巣摘出手術と採卵: hCG投与後72時間に、硫酸アトロピン(硫酸アトロピン注タナベ; 田辺製薬株式会社)0.03 mg/kgとアセプロマジン(Acetromazine Maleate Injection; Tec America Group, Inc.)0.25 mg/kgを混合皮下投与することにより前麻酔を行い、次いで、チアミラールナトリウム(イソゾール; 吉富製薬株式会社)12.5 mg/kgの静脈内投与により導入麻酔とした。気管チューブ挿管後フローセン(ハロタン; 武田薬品工業株式会社)と酸素の混合ガスによる維持麻酔を行い、卵巣を外科的に摘出した。摘出した卵巣から山田らの方法[4]に従い排卵直前の卵子を採取した。

3) 精子の受精能獲得と体外受精: 精液採取は3~5歳齢の雄の3頭のビーグルから行った。用手法で精液の第1及び第2分画のみを採取し、島津らの方法[9]に従いTYH[10]で4時間前培養し精子の受精能獲得を行った。体外受精は、0.4 mlのイヌ用卵子成熟培地であるm-TYH[4]に20個の卵子を導入した後1時間以内に精子懸濁液を加えることによって行った(精子濃度; 1.0×10^6 sperm/ml)。媒精後24、48及び72時間に卵子のホールマウント標本を作製し観察を行った。なお、媒精後48及び72時間でホールマウント標本を作製する実験区では、24時間の時点で培地交換を行った。

(受付 1996年2月10日/受理 1996年4月1日)

別刷請求先: 〒392 諏訪市豊田6598

(株)CSKリサーチパーク

4) 統計処理：フィッシャーの直接確率計算法を用いて有意差検定を行った。

結果

媒精後 24, 48 及び 72 時間における精子侵入率を Table 1 に示した。精子侵入率は媒精後 24 時間で 64.4% を示し、48 時間 (57.1%) 及び 72 時間 (54.3%) と比較して有意な差は認められなかった。

媒精後 24, 48 及び 72 時間における卵子の成熟率を精子侵入の有無とともに Table 2 に示した。精子侵入卵では媒精後 24, 48 時間でそれぞれ、6.9%, 17.9% が第 II 減数分裂中期以降のステージであったのに対し、媒精後 72 時間では 60.0% と有意に高い値を示した ($P < 0.01$)。精子侵入の確

認できなかった卵子ではそれぞれの時間の成熟率は 6.2%, 14.3% 及び 42.9% であり、媒精後 72 時間では、精子侵入卵子同様ほかの実験区と比較して有意に高い値を示した ($P < 0.05$)。また、各実験区における卵子の成熟率を精子侵入の有無で比較した場合、いずれも有意差は認められなかつたが精子侵入卵子の方が高い成熟率を示す傾向にあった。

媒精後 72 時間ににおける精子侵入卵子の核ステージと精子核の膨潤化との関係を Table 3 に示した。GV 期から第 II 減数分裂終期までの卵子では、大部分の侵入精子頭部は膨潤した状態で止まっていた。しかし、雌性前核が認められた 4 個 (16.0%) の受精卵ではすべて雄性前核が形成されていた。その雌雄両前核が形成された卵は成熟受精卵 (15 個) の 26.7% に相当した。

考察

本試験において我々は排卵直前のイヌ卵子を採取直後に媒精したところ、72 時間後に雌雄両前核を有する正常受精卵を得ることができた。この結果は、イヌでは GV 期の卵子が正常受精に携わる可能性を直接的に示した初めてのものである。

今回、受精能獲得処理後の精子で体外受精したところ精子侵入率は媒精後 24, 48 及び 72 時間ににおいて有意な差は認められず、いずれも 60%

前後と以前の報告に匹敵する値であった [4, 9, 10]。このことから、卵子への精子侵入は 24 時間以内に終了したものと考えられる。すなわち、卵子が成熟した後に精子侵入が起きたではなく、GV 期の状態で侵入していたことを示唆している。島津ら [9] と山田ら [4] は同様の受精能獲得処理を行った精子を用いて、採取後 72 時間培養したイヌ卵子を体外受精したところ、媒精後 4 時間ににおいて受精率が最高値に達したことを報告している。今回も同程度の時間経過で精子侵入が起こったことが推測される。

これまでイヌ卵子の成熟が精子侵入に影響されるか否かを論じた報告は Mahi and Yanagimachi [3] によって媒精後 11 ~ 24 時間まで観察したもののみであり、彼女らは精子侵入によ

Table 1. Penetration rates for beagle oocytes inseminated at the preovulatory stage and cultured up to 72 h

Time after insemination (h)	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes penetrated
24	45	29 (64.4)
48	49	28 (57.1)
72	46	25 (54.3)

Table 2. The maturation stage of beagle oocytes with or without sperm penetration

Time after insemination (h)	Sperm penetration	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes at the stage of	
			Germinal vesicle	Metaphase II-Female pronucleus (%)
24	+	29	27	2 (6.9 ^a)
	-	16	15	1 (6.2 ^a)
48	+	28	23	5 (17.9 ^a)
	-	21	18	3 (14.3 ^{ac})
72	+	25	10	15 (60.0 ^{bd})
	-	21	12	9 (42.9 ^{cd})

At the prometaphase I- telophase I stage no oocytes were detected. Values with different superscripts are significantly different (^a vs ^b $P < 0.01$; ^a vs ^c $P < 0.05$).

Table 3. Changes in sperm heads which penetrated into beagle oocytes at 72 h after insemination

Stage of oocyte nucleus	No. of oocytes with			Total no. (%) of oocytes observed	Percent of matured oocytes
	Unchanged sperm head	Enlarged sperm head	Male pronucleus		
Germinal vesicle	2	8	0	10 (40.0)	-
Metaphase II-Telophase II	0	11	0	11 (44.0)	73.3
Female pronucleus	0	0	4	4 (16.0)	26.7

At the prometaphase I- telophase I stage with sperm nuclei no oocytes were detected.

る卵子の成熟率への影響はないと述べている。今回、媒精後72時間まで観察した結果では有意な差は認められなかったものの、精子侵入卵子の方が精子侵入の確認できなかった卵子より高い成熟率を示す傾向にあった。特に72時間後では精子侵入卵子は60%が成熟しており、イヌ卵子の体外成熟率は30%前後であるという以前の報告[3-5]を大きく上回っている。この結果は精子侵入が卵子の成熟を促進した可能性が考えられる。

一方、侵入精子頭部はGV期から第II減数分裂中期の卵子では若干膨潤化するが前核を形成するまでには至らず、雌性前核が形成されたものでのみ雄性前核が認められた。近年、減数分裂を含む細胞分裂周期は成熟促進因子(MPF)によって制御されており、この活性が高いと分裂中期が誘発され、この活性の低下が分裂期を脱出し核形成を誘導することが明らかとなった[11]。イヌでも同様にMPF活性による制御があり、この活性が低下した卵子でのみ雌雄両前核が形成されたと考えられる。一般に、哺乳動物の卵子は第II減数分裂中期で成熟分裂を停止し、精子侵入によってMPF活性が低下しその後の分裂が再開されるが、GV期の卵子が受精に携わる可能性があるイヌ卵子では自発的な活性化が起りやすくなっている必要がある。今回媒精後72時間で成熟受精卵の26.7%のものに雌雄両前核が形成されたことはこの可能性を示唆している。

以上のことから、イヌではGV期に受精した卵子が前核期まで進行することが示されGV期卵子が正常受精に携わる可能性が示唆された。今後、この点を確認するとともに、さらに前核期以降の初期発生の進行を観察する必要があろう。

文 献

- 1) Van der Stricht, O. (1923): Etude comparée des ovules des mammifères aux différentes périodes de l'ovogenèse, d'après les travaux du Laboratoire d'Histologie et d'Embryologie de l'Université de Gand. Paris Arch. Biol., 33, 229-300.
- 2) Tsutsui, T. (1975): Studies on the reproduction in the dog. V. On cleavage and transport of fertilized ova in the oviduct. Jpn. J. Anim. Reprod., 21, 70-75.
- 3) Mahi, C.A. and Yanagimachi, R. (1976): Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes *in vitro*. J. Exp. Zool., 196, 189-196.
- 4) Yamada, S., Shimazu, Y., Kawaji, H., Nakazawa, M., Naito, K. and Toyoda, Y. (1992): Maturation, fertilization, and development of dog oocytes *in vitro*. Biol. Reprod., 46, 853-858.
- 5) Nickson, D.A., Boyd, J.S., Eckersall, P.D., Ferguson, J.M., Harvey, M.J.A. and Renton, J.P. (1993): Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation and *in vitro* fertilization in bitches. J. Reprod. Fert., Suppl., 47, 231-240.
- 6) Evans, H.M. and Cole, H.H. (1931): An introduction to the study of the oestrous cycle in the dog. Mem. Univ. Calif., 65-103.
- 7) Phemister, R.D., Holst, P.A., Spans, J.S. and Hopwood, M.L. (1973): Time of ovulation in the beagle bitch. Biol. Reprod., 8, 74-82.
- 8) Tsutsui, T. and Shimizu, T. (1975): Studies on the reproduction in the dog. IV. On the fertile period of ovum after ovulation. Jpn. J. Anim. Reprod., 21, 65-69.
- 9) Shimazu, Y., Yamada, S., Kawaji, H., Nakazawa, M., Naito, K. and Toyoda, Y. (1992): *In vitro* capacitation of canine spermatozoa. J. Reprod. Dev., 38, 67-71.
- 10) Toyoda, Y., Yokoyama, M. and Hoshi, T. (1971): Studies on the fertilization of mouse eggs *in vitro*. I. *In vitro* fertilization of eggs by fresh epididymal sperm. Jpn. J. Anim. Reprod., 16, 147-151.
- 11) Norbury, C. and Nurse, P. (1992): Animal cell cycles and their control. Ann. Rev. Biochem., 61, 441-470.

Both Male and Female Pronuclei Formation in Canine Oocytes Inseminated at Germinal Vesicle Stage

Yoshiki Shimazu¹ and Kunihiko Naito²

¹CSK Research Park, Inc., Suwa, Nagano 392 and ²The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo 108, Japan

In the dog, copulation can occur 2-3 days before ovulation and oocytes are ovulated at the stage of the germinal vesicle (GV). It is therefore probable that GV oocytes can be penetrated by spermatozoa and developed normally. In the present study, we examined the penetration rate and male and female nuclear changes in canine oocytes which were inseminated just after collection from preovulatory follicles and cultured for up to 72 h. The penetration rate reached its maximum (64.4%) at 24 h after insemination, although only 6.9% of penetrated oocytes were

mature at that time, indicating that GV oocytes were penetrated by spermatozoa. Thereafter, the maturation rate increased to 17.9% and 60.0% of penetrated oocytes at 48 and 72 h after insemination, respectively. Both male and female pronuclei were developed in 26.7% of matured-fertilized oocytes at 72 h after insemination. These results suggest the possibility of the participation of GV oocytes in the normal fertilization processes in the dog.

Key words: Canine oocytes, Germinal vesicle, Both male and female pronuclei.