

ウマ卵管上皮細胞による受精卵認識における 特異的発現物質の検索

羽 田 真 悟

連合獣医学研究科獣医学専攻臨床獣医学講座（博士課程2年）

1. 目 的

ウマは季節繁殖動物であり繁殖季節である4～7月の間に6回前後しか交配の機会がない。空胎となったものは翌年に産子を得られず生産性がない。そのため、限られた期間で受胎率を上昇させることが期待される。現在、ウマの妊娠鑑定は超音波画像診断装置を使用して排卵後12日目あたりから可能である。しかし、この時点で非妊娠が確認されたとしても次の発情が近いため発情周期の短縮は望めない。

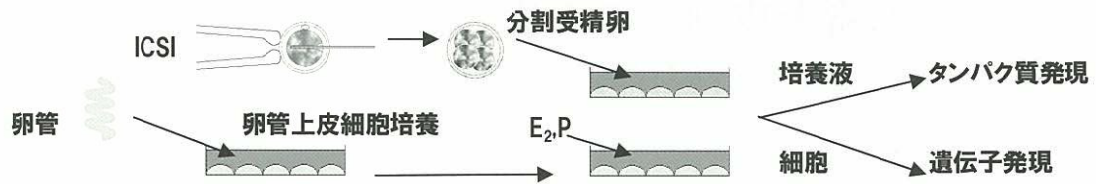
ヒト、マウス、その他種々の動物において早期妊娠因子（以下EPF）に関する報告がある。この物質は受精後数日で母体血中に出現するとされている。この時期に受精卵は卵管内に存在し、受精卵と卵管の間に何らかのシグナルのやり取りがあると考えられる。また、ウマにおける受精卵だけがPGE₂を産生し子宮に到達するという現象からもこのことが伺える。このようなEPF様物質をウマにおいて同定できれば、早期妊娠診断や胚のモニタリングによる不受胎の原因解明に有効な手段となりえる。

そこで、本研究ではウマの卵管細胞と細胞質内精子注入法（ICSI）により作成した受精卵もしくは未受精卵を共培養し、受精卵存在時特異的に発現する物質をタンパク質、遺伝子の面から検索する。

2. 方 法

- ① 屠場から卵管を採材し、卵管上皮細胞を分離して培養する。コンフルエントになったら1度継代し、70%コンフルエントになった時点で実験に供する。
- ② 基礎実験としてホルモン（estradiol-17 β , progesterone）の影響による卵管細胞の分泌動態を確認する。血清と各ホルモンを加えた培地で24時間培養した後、無血清にホルモンを加えた培地で培養し、その上清を分析すると共に細胞を回収、遺伝的分析の材料とする。
- ③ 屠場から卵巣を採材し、卵胞吸引、搔把と卵巣の細切により卵子を採取する。成熟培養（IVM）24時間後に先体反応を誘起した精子を、ピエゾマイクロマニピュレータを用いたICSIによって注入するもしくは体外受精（IVF）により受精卵を作成する。さらに36時間培養し卵割を始めたものを卵管との共培養に供する。未受精卵は受精卵と同様に培養しICSIを行わないものを用いる。

- ④ 培養液は濃縮し、SDS-PAGE もしくは 2 次元電気泳動によってタンパク質を検索する。また、細胞を回収し遺伝子発現検索を行う。



3. 結 果

ホルモン処置による培養細胞の分泌動態

数回の培養の結果、ある個体の初代培養の培養上清においてホルモン依存的に強く発現するタンパク質を認めた (図 1 矢印)。しかし、以前に認められたもの (図 2 矢印) とは分子量が異なる。また、この個体の細胞を凍結保存し、1 代継代した後に培養した場合そのような違いは認められなかった。さらに、1 代継代した細胞の抽出物を SDS-PAGE を用いて解析した結果においても違いは認められなかった (図 3)。

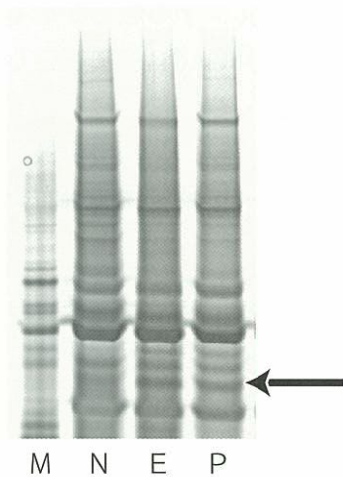


図 1

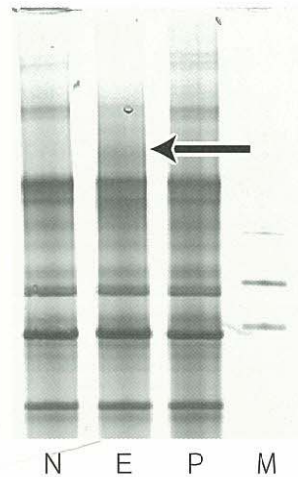


図 2

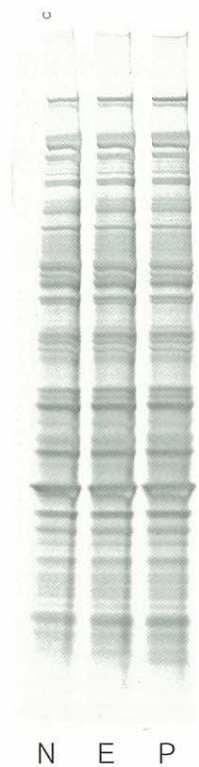


図 3

図の記号 N : 非処理, E : estradiol-17 β 添加, P : progesterone 添加, M : マーカー

卵巣からの卵子回収と成熟培養

1 回に輸送された 3 対計 6 個の卵巣の卵胞から顆粒層を搔把することにより 62 個の卵子を得た。得られた卵子を成熟培養した結果、17 個の卵子に第 1 極体の放出を認めた。



4. 考 察

個体によって培養細胞のホルモンに対する反応が異なる要因として次のことが考えられる。まずは材料となった個体が発情周期のどの時期にあったかということを確認できなかったということである。採材前の個体の情報は一切得られず、また採材された卵管は卵巣と切り離されて送られてきたため時期を予想することもできなかった。この問題については、卵管と卵巣を切り離さないようにすることである程度の時期を予想できるようにすることが可能である。しかし、依頼時に時期を選ぶことはできない。そのため、受け取った後に一定期間プロゲステロンに曝すなど条件の統一が必要であると考えられる。

1代継代するとホルモンに対する感受性が見られなくなるなど性質が変化することは細胞の種類によって起こりうる現象である。従って培養には初代培養か組織片の培養が推奨される。しかし、共培養に用いるなど、後の試験で使用するためには個体、条件が統一されている方が好ましく、活性をもった細胞を大量に凍結保存しておく方法の更なる検索が必要である。

卵巣から回収した卵子の成熟率は約27%にとどまった。これは見える卵胞全てから卵子の回収を行ったことに由来し、すなわち未成熟のものから退行中のものまで全てを対象にした結果である。本実験では屠体からの回収なので目的としては良い卵子の割合よりも良い卵子の数が求められる。従って17個が成熟したということが重要であり、これは1度の試験で扱うには適当な数であると思われる。

現在凍結精液の作成を進行しており、準備ができれば ICSI もしくは IVF による受精卵の作成からその後の試験へと進んでいく予定である。