

論文内容要旨

※ 整理番号		(ふりがな) 氏名(自署)	印
論文題目	体外成熟培養 MII 卵の紡錘体を新鮮 MII 卵の細胞質にマイクロインジェクションして得られた再構築 MII 卵の初期発生能の検討 Early development of the MII oocyte reconstructed by microinjection of the spindle derived from <i>in vitro</i> matured MII oocyte into the cytoplasm derived from fresh MII oocyte		
<p>【目的】 生殖医療において今後の発展が期待される技術の 1 つとして、体外成熟培養 (<i>in vitro</i> maturation、IVM) がある。しかしながら、IVM で得られる MII 卵 (IVM-MII 卵) の発生能は新鮮 MII 卵よりも低い。その理由として、IVM-MII 卵の細胞質の成熟遅延が考えられている。細胞質の成熟遅延を改善する方法として、IVM の培養液を改変し細胞質の成熟を促すか、または、成熟遅延している細胞質を成熟した新鮮 MII 卵の細胞質と入れ替える方法が考えられるが、前者については臨床および実験動物を用いた研究において様々な検討がなされたが、発生能の著明な改善は得られていない。そのため、今回我々は実験動物において後者の研究を行った。</p> <p>本研究において、はじめに、紡錘体移植法では紡錘体移植時に紡錘体周囲の細胞質に含まれる mtDNA が混入することが懸念されているため、紡錘体周囲の細胞質に含まれる mtDNA 量をリアルタイム PCR を用いて検討した。つづいて、本研究で用いた MESI 法の手技自体による紡錘体および細胞質体の損傷による発生能への影響を検討するため、新鮮 MII 卵の紡錘体を別の新鮮 MII 卵の細胞質体に移植し作出した再構築 MII 卵の発生能を新鮮 MII 卵の発生能と比較し検討した。さらに、IVM-MII 卵の紡錘体と新鮮 MII 卵の細胞質体から MESI (metaphase II spindle injection) 法を用いて再構築 MII 卵を作出し、新鮮 MII 卵と再構築 MII 卵の発生能を検討した。</p> <p>【方法】 6 ~ 8 週の雌 BDF1 マウスに過排卵処理を行い新鮮 MII 卵を得た。マイクロマニピレータを用いて、新鮮 MII 卵から少量の細胞質を含む紡錘体 (未精製「核」体) を単離 (除「核」) し、さらに、インジェクションピペットを用いて「核」体から少量の細胞質を除去し、精製「核」体を得た。新鮮 MII 卵、未精製「核」体、精製「核」体から DNA を抽出し、リアルタイム PCR を用いて mtDNA を半定量した。</p> <p>つづいて、新鮮 MII 卵の精製「核」体を別の新鮮 MII 卵の除「核」した細胞質体マイクロインジェクションして (MESI 法) 再構築 MII 卵を作出した。再構築 MII 卵と新鮮 MII 卵の初期発生能を単為発生で比較し検討した。単為発生における活性化は、4 mM の SrCl₂ と 1 % のサイトカラシン B を含む Ca²⁺ free の KSOM 培養液内で 2 時間行った。拡張胚盤胞および脱出胚盤胞に到達したものを初期発生能良好と判定した。</p> <p>さらに、同マウスより GV 卵を cumulus oocyte complex (COC) として採取し、TYH : MEN = 1 : 1 (3 mg/mL BSA、0.12 μg/mL アストキサンチン、0.5 mM アスコルビン酸、1.35 μM E-64 を含む) にて IVM し、IVM-MII 卵を得た。上記と同様に MESI 法を用いて、IVM-MII 卵の紡錘体と新鮮 MII 卵の細胞質体から再構築 MII 卵を作出した。IVM-MII 卵と再構築 MII 卵の初期発生能を単為発生で比較し検討した。単為発生および初期発生能の評価は上記と同様の方法で行った。</p>			
<p>備 考</p> <ol style="list-style-type: none"> ※印の欄には記入しないこと。 論文題目が外国語の場合は、カッコを付し和訳を付記すること。 論文題目が日本語の場合は、カッコを付し英訳を付記すること。 論文内容要旨は、(研究の目的)、(方法)、(結果)、(考察)、(結論)の順に日本語(2,000字程度)もしくは英語(半角5,000字程度)でまとめ、タイプ等で印字すること。(文字数を記載してください。) 			

論文内容要旨 (続紙)

(ふりがな)
氏名(自署)

印

【結果】

新鮮 MII 卵の全卵、未精製「核」体および精製「核」体に含まれる mtDNA 量の検討では、未精製「核」体の mtDNA 量は全卵の約 4 % であり、精製「核」体の mtDNA 量は全卵の約 0.9 % であった。

新鮮 MII 卵の紡錘体と別の新鮮 MII 卵の細胞質体から作出した再構築 MII 卵の単為発生では、新鮮 MII 卵では約 90 % が初期発生能が良好であるという報告に比し、再構築 MII 卵では初期発生能が良好な卵子は 60 - 70 % 程度であった。

IVM-MII 卵の紡錘体と新鮮 MII 卵の細胞質体から作出した再構築 MII 卵の単為発生では、初期発生良好胚は IVM-MII 卵では 229 個中 42 個であったのに対し、再構築 MII 卵では 200 個中 95 個であり、IVM-MII 卵の細胞質を新鮮 MII 卵の細胞質と入れ替えることにより、初期発生能が有意に改善された ($p < 0.001$)。

【考察】

新鮮 MII 卵、未精製「核」体、および精製「核」体に含まれる mtDNA 量の解析により、MESI 法では細胞融合法と比較し、混入する mtDNA 量を 1/4 - 1/5 程度になることが示された。マウスでは少量の mtDNA の混入は個体発生に影響を与えないと報告されているが、今後、ヒトへの応用をする際には、混入する mtDNA を減量することが望ましいと考えられるため、その際には MESI 法が細胞質融合法に比して有用な方法となると考えられる。

新鮮 MII 卵同士から MESI 法により作出された再構築 MII 卵の初期発生能は新鮮 MII 卵に比して低下した。このことから、MESI 法自体が細胞質体および紡錘体に損傷を与え、初期発生能を低下させる可能性が示唆され、MESI 法の手技自体に問題点があることが明らかとなった。しかしながら、MESI 法で 60 - 70 % という割合で初期発生能が良好な再構築 MII 卵を作出できることが示されたため、MESI 法を用いて再構築 MII 卵を作出することは妥当であると考えられた。

IVM-MII 卵の紡錘体と新鮮 MII 卵の細胞質体から作出した再構築 MII 卵の初期発生能は IVM-MII 卵に比して有意に改善された。このことは、IVM-MII 卵の初期発生能が低下する原因は細胞質の成熟遅延であるという報告を裏付けるものであり、成熟した細胞質と入れ替えることで初期発生能を改善できることが示された。

【結論】

IVM-MII 卵に比し、再構築 MII 卵の初期発生能が有意に改善されたことから、IVM-MII 卵の初期発生能の低下が細胞質に起因することが示唆された。本法の臨床への応用に向けては、MESI 法による物理的な卵子への傷害など、基礎的な技術の改善を進める必要があるが、現在治療が困難な症例に対して、将来的に根本的な解決策となりうる可能性を見出すことができたものとする。

(2055文字)