

果はそんなに大きいものではなく、大量摂取は、皮膚細胞等の細胞の老化の促進、細胞膜や細胞内小器官膜の透過性の変化による免疫機能への影響、胆汁にコレステロールが集まり胆石症を増加させる等の副作用もあげている。

一方、国立健康・栄養研究所の山口賢次部長は「植物油ばかりを摂ると、血管壁が脆くなり、その原因は脂肪酸バランスが崩れるため」と述べている。

#### 11. まとめ

欧米では、動物性脂肪が7割以上、植物性脂肪が3割以下といった食生活であり、前者が著しく多いことが特徴である。これに比べてわが国の食構成は多様であるため、現状では動物性脂肪をあえて減らすことにこだわる必要はないと思われる。牛肉や豚肉はあたかも不必要な飽和脂肪酸の固まりのように決め付けられているが、これは誤解である。その理由の第一は、飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸ともに人体にとっては不可欠の栄養成分であること、第二は、牛肉や豚肉がそれぞれ脂肪酸構成成分のバランスが保たれていることである。

食肉の取り過ぎについて、自国民に行っている欧米での警告が、わが国にそのまま取り上げられている感は否定できまい。事実、一般国民のコレステロールに対する“恐怖症”は、日本人が将来にも決して変えないであろう日本型食構成を棚上げしている。日本国民の寿命のより延長と健康を維持するためには、食肉の健康への関わりについて科学的に正しい情報を提供することが必要である。

(第42回日本豚病研究会発表)

住所：〒107東京都港区赤坂6-13-16

### 豚卵子における細胞周期の休止および再開

永井 卓 (農林水産省畜産試験場)

Nagai, T. (1992). Arrest and resumption of cell cycle in pig oocytes. *Proc. Jpn. Pig Vet. Soc.*, 21:8-11

豚において卵子内への精子侵入に Iritani et al.<sup>1)</sup> が1987年に成功して以来、体外受精の研究が進み、英国で Cheang et al.<sup>2)</sup>、日本で Yoshida et al.<sup>3)</sup> と Nagai et al.<sup>4)</sup> さらにイタリアでは Mattioli et al.<sup>5)</sup> が子豚を得ている。特に、Mattioli et al.<sup>5)</sup> は、体外培養によって成熟させた卵子の体外受精によって産子を得ており、豚においても体外成熟卵子が固体への発生能を有することを証明した。最近、農林水産省畜産試験場でも体外成熟卵子の体外受精により子豚が生まれている。しかし、成熟卵子の受精後の発生率は極めて低いのが現状である。卵子を受精後に、安定して高率に固体へと発生させるには、卵子の成熟機構を理解し、その成熟培養方法を改良する必要があると思われる。以下に卵子の成熟機構を知ることを目的として、卵子の成熟を細胞周期の観点から見てみることにする。

卵細胞の細胞分裂は、成熟期に1)を減数分裂をする。2)卵核胞期(GV期)と第二減数分裂中期(M-II期)で細胞周期が止まる。という二点で体細胞のそれとは異なる。

#### 1) 減数分裂の特長

- a) 相同染色体間の組替え(crossing over)：母方と父方の染色体の混合
- b) 染色体数の半減
- c) 第一極体の放出(M-II期)
- d) 第二極体の放出(精子侵入)

#### 2) GV期での細胞周期の休止および再開

豚の卵子細胞周期は、胎子の卵巢中で既にS期(DNA合成期)を経て、G<sub>2</sub>期(分裂準備期)にあたるGV期にあり、性成熟に達するまでこのままで減数分裂が中断している。食肉センターで採取した卵巢内卵胞中の卵子(写真1)のほとんどがこのGV期にある。これらの卵子をGV期で休止させる因子としては、cAMP、卵胞液内の物質および顆粒膜細胞などが考えられている。生体内では排卵刺激、すなわちLHサージにより卵核胞崩壊(GVBD)が起こり、減数分裂が再開する。しかし、豚卵子を卵胞から取り出し体外で培養すると、GVBDが起こる。ところが、

卵子が顆粒膜細胞で囲まれていると、GVBDが抑制される。この豚における、顆粒膜細胞のGVBD抑制について以下の実験を行った。

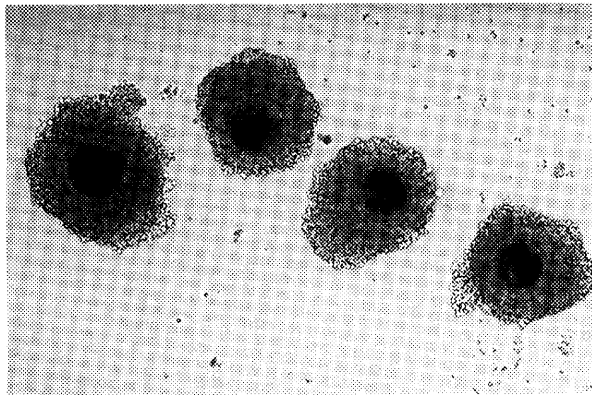


写真1 卵丘細胞に囲まれた卵胞卵子 (卵巣より採取直後)

方法：卵胞卵は、屠場で入手した未経産豚卵巣内の卵胞を解剖用メスで切開して採取し、コンパクトな卵丘細胞(C)に囲まれた卵胞卵(C+卵子)および卵丘細胞と顆粒膜細胞(P)に囲まれた卵胞卵(C+P卵子)を選んだ。一部のC+卵子の卵丘細胞をピペティングで取り除きC-卵子とした。C+およびC-卵子(各約15個)は、培養液のドロップ(0.05ml)に入れ、C+P卵子(約15個)は、0.5mlの培養液に入れて培養した。対照区の培養液には、牛胎子血清(10%v/v)、ピルビン酸ナトリウム(0.2mg/ml)および抗生物質を加えたTCM-199液を用い、実験区の培養液には、さらに、1-100 μg/mlのピューロマイシン(タンパク質合成阻害剤)を添加した。卵子は、炭酸ガス培養器内(CO<sub>2</sub> 5%, 空気95%, 38.5°C)で24および32時間培養し、GVBDを調べた。

結果：1) C-およびC+卵子のGVBDにおよぼすピューロマイシンの影響；対照区では、培養24時間後のC-およびC+卵子のGVBD率は、それぞれ82%および96%であったが、ピューロマイシンを50 μg/ml以上添加すると、GVBDが有意(P < 0.001)に抑制された(図1)。

2) C+P卵子のGVBDにおよぼすピューロマイシンの影響：対照区では、ほとんど全ての卵子でGVBDが起こらなかった。実験区の培養24時間後のGVBD率は、ピューロマイシンを1, 5および10 μg/ml添加した場合、17%以下であったが、17および25 μg/mlでは、それぞれ43%および56%に増加した。培養32時間では、ピューロマイシンを5, 10, 17および25 μg/ml

添加するとGVBD率は、それぞれ48%, 62%, 80%及び68%であった。しかし、50 μg/ml以上添加すると、ほとんど全ての卵子でGVBDが抑制された(図2)。

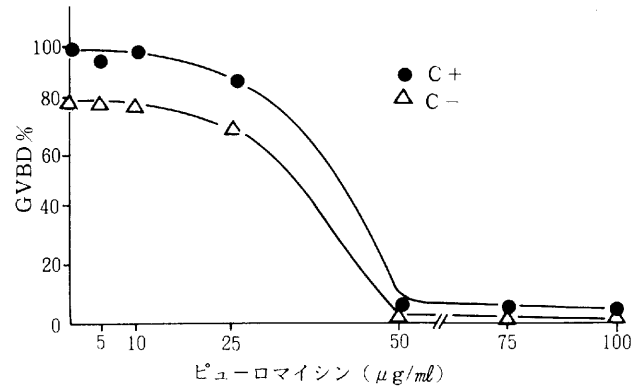


図1. 卵丘に囲まれた(C+)豚卵子および卵丘を取り除いた(C-)豚卵子における卵核胞崩壊(GVBD)に及ぼすピューロマイシンの効果。C+およびC-卵子共に、50, 70および100 μg/ml濃度のピューロマイシンによってGVBD率は有意に低下する。(Motlik et al.<sup>6)</sup>)

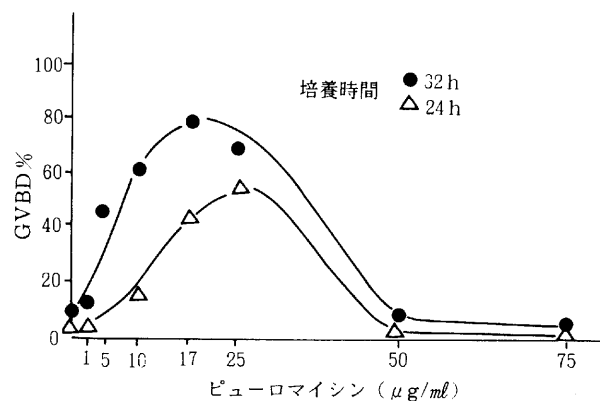


図2. 卵丘および顆粒膜細胞に囲まれた豚卵子のGVBDに対するピューロマイシンの効果。対照区では、卵丘および顆粒膜細胞が存在すると、卵子を24及び32時間培養してもGVBDは起こらない。しかし、ピューロマイシン(17 μg/ml)を添加すると24および32時間培養後に、それぞれ43および80%の卵子がGVBDを起こす。(Motlik et al.<sup>6)</sup>)

以上のように、C+P卵子においてはピューロマイシンを17~25 μg/ml添加した場合にのみGVBDが再開した。これは、1)ピューロマイシン無添加および低濃度(1~10 μg/ml)添加区では、顆粒膜細胞によってGVBDが抑制される。2)高濃度(50 μg/ml以上)のピューロマイシン添加区ではC-およびC+卵子のGVBDも抑制されたことから、この濃度では卵子内

でGVBDに關与するタンパク質の合成が抑制されたことによりGVBDが抑制される。従って、3)ピューロマイシンは、その間の濃度(17~25 $\mu\text{g/ml}$ )では、卵子そのものには影響を及ぼさないが、顆粒膜細胞内のGVBDの抑制に關与する蛋白質の合成を阻害し、その結果、GVBDが起こったのではないかと推察される(図3)。

卵子におよぼす影響	ピューロマイシンによるGVBDブロックなし	ピューロマイシンによるGVBDブロックなし	ピューロマイシンによるGVBDブロックあり
顆粒膜細胞におよぼす影響	顆粒膜細胞によるGVBDブロックあり	顆粒膜細胞によるGVBDブロックなし	顆粒膜細胞によるGVBDブロックなし
	0	10	25
	ピューロマイシン ( $\mu\text{g/ml}$ )		
			50

図3 豚卵子の減数分裂再開におよぼす顆粒膜細胞およびピューロマイシンの關係。(Motlik et al.<sup>6)</sup>)

従って、豚のGV期での細胞周期の休止には、顆粒膜細胞内で合成されるタンパク質が關与しているものと思われる。詳しくは、Motlik et al.<sup>6)</sup>を参照されたい。

現行の卵子の体外培養には、ほとんど顆粒膜細胞が附着していない卵子を用いているので、GVBDが勝手に起こる。すなわち、GVBDが生理学的な刺激(あるいは抑制からの解除)によって誘起されていない可能性が高い。今後、この生理学的なGVBD誘起のメカニズムについて調べる必要があると思われる。

このように卵細胞を取り巻く細胞が、卵子のGVBDに關与していることを明かにした。つぎに卵細胞室内に目をむけると、ヒトデおよびカエル卵子において、GVBDの直前にMPF(卵成熟促進因子:cdc2ホモログとサイクリンの複合体)の活性化が起こり、その結果、GVBDが誘起されることが明かになった<sup>7)</sup>。このMPFは、一般に細胞の細胞周期をM期(分裂期)へと導く因子であると考えられる。しかし、その活性化のメカニズムについては不明な点が多い<sup>7)</sup>。

3) M-II期での細胞周期の休止および再開:

M-II期の卵子は上述のMPFの活性が高く、細胞周期のM期で休止している。ところが、受精卵では精子侵入(あるいは卵子の活性化を誘起する方法;エタノール、イオノフォア処理、電気刺激etc.<sup>8)</sup>)によって、結果的にはMPFのサイクリンが分解され



写真2 雌雄両前核と精子尾部

(?), MPFが不活性の状態になり、細胞周期がM期からG<sub>1</sub>期(DNA準備期)へと移行すると考えられている。

4) 雌雄両性前核の形成(写真2)

上述のように、M-II期の卵子が精子侵入により活性化を受けると、細胞周期が変化し、雌雄両性前核が形成されることになる。しかし、豚において体外成熟卵子を用いた体外受精では、雌雄前核は形成されるが、雄性前核形成が不完全な場合が多い。受精卵に雌性前核形成が確認されたことから、染色体の濃縮および脱濃縮のサイクル(細胞周期)は正常に機能していると思われる。従って、精子の染色体がその細胞周期の変化に対応できないために雄性前核形成不全が生じるとと思われる。すなわち、精子が卵子と融合(膜融合)し、1)精子細胞膜の崩壊が起こり、2)S-S結合が還元され、3)精子核に特有なタンパクであるプロタミンがヒストンに置き換わるまでの過程のどこかに欠陥があり、その結果、精子染色体の脱濃縮(雄性前核形成)が不完全になるのではないかと推察される。そこで、吉田ら(1992)は、細胞内で、SH基およびS-S結合の反応に關与することが知られているグルタチオンが雄性前核形成におよぼす影響について調べた(未発表)。

その結果、授精時の卵子内のグルタチオン濃度、すなわち成熟培養による卵子内のグルタチオン合成が卵子の雄性前核形成能獲得に重要であることから明らかになった。

また、受精時に精子と卵子の細胞膜が融合すると、卵子内にフリーCaイオンが周期的に放出されるが、このCaイオンの放出パターンが受精卵の発生に關与しているとの報告がある<sup>9)</sup>。

従って、受精現象は、単なる“静止の卵子への侵入”

ではなく、精子核という“遺伝子の導入”と卵子の“細胞周期の再開”との二本柱からなると認識すべきである。

このように卵子は、減数分裂という特殊な分裂の進行過程で、極めて対照的な状態、すなわち染色体が開いた状態 (GV 期) と閉じた状態 (M-II 期) で止まり、劇的な変化を待っている。前者は発情期の LH サージを待ち、後者は精子膜との融合を待つ。「いかにしてこの変化を、in vitro で、しかも生理学的に自然な形で起こさせるか」が、今後の卵子の体外での成熟および受精の課題である。

#### 参考文献

- 1) Iritani, A. et al. (1978). Sperm penetration of pig follicular oocytes in culture. *J. Reprod. Fert.*, 54:379-383.
- 2) Cheng, W. T. K. et al. (1986). In vitro fertilization of pig and sheep oocytes matured in vitro. *Theriogenology*, 25:146. (Abst.)
- 3) Yoshida, M. (1987). In vitro fertilization of pig oocytes matured in vitro. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 49:711-718.
- 4) Nagai, T. et al. (1988). In-vitro fertilization of pig oocytes by frozen boar spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 84:585-591.
- 5) Mattioli, M. et al. (1989). Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology*, 31:1201-1207.
- 6) Motlik, J. et al. (1991). Resumption of meiosis in pig oocytes cultured with cumulus and parietal granulosa cells: The effect of protein synthesis inhibition. *J. Exp. Zool.*, 259:386-391.
- 7) 岸本健雄 (1989). 分裂期における細胞周期の調節機構. 蛋白質・核酸・酵素, 34: 1599-1609.
- 8) Nagai, T. (1992). Development of bovine in vitro-matured follicular oocytes activated with ethanol. *Theriogenology*, 37:869-875.
- 9) Ozil, J. P. (1990). The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electric stimulation. *Development*, 109:117-127.

(第42回日本豚病研究会発表)

住所: 〒305茨城県稲敷郡基崎町池の台2

