

培養したブタの裸化卵母細胞の囲卵腔の大きさと 媒精後の多精子侵入の頻度

神保幸弘¹・新村末雄^{2*}

(平成24年7月1日受付)

要 約

NCSU37で培養したブタの裸化卵母細胞について、成熟に伴う囲卵腔の大きさの変化を経時的に観察した。また、NaCl濃度を低くした低NaCl-NCSU37およびヒアルロン酸の合成阻害剤である4-メチルウンベリフェロン (MU) を添加したNCSU37で培養した裸化卵母細胞についても、成熟後の囲卵腔の大きさと媒精後の多精子侵入の頻度を観察した。

採取直後の卵母細胞30個において、9個には囲卵腔はみられなかったが、21個には囲卵腔が観察され、卵母細胞30個の囲卵腔の平均値は0.63 μm であった。囲卵腔は、培養8時間以降拡大したが、培養後22時間までの卵母細胞では採取直後のものと有意な相違はなかった。一方囲卵腔は、培養32時間以降有意に拡大し、培養44時間後では4.58 μm になった。

一方、各種培養液で成熟させた卵母細胞において、囲卵腔は、低NaCl-NCSU37で培養したものでは6.25 μm であり、対照のNCSU37で培養したものの4.93 μm に比べて有意に大きかった。また、MU処置した卵母細胞の囲卵腔は4.02 μm であり、対照の卵母細胞の4.69 μm に比べて有意に小さかった。

受精率は、各種培養液で成熟させた卵母細胞の間で相違なかったが、多精子侵入の頻度は、低NaCl-NCSU37で培養した卵母細胞に比べ、NCSU37で培養した卵母細胞では有意に高いとともに、MU処置卵母細胞では、対照の卵母細胞に比べて有意に高かった。

以上の結果から、囲卵腔の大きさと多精子侵入の頻度との間には密接な関係のあることが推察された。

新大農研報, 65(1):23-30, 2012

キーワード：ブタ裸化卵母細胞、囲卵腔の大きさ、多精子侵入の頻度

最近、囲卵腔の大きさと多精子侵入の頻度との間には関係のあることが報告されている。すなわち、体外で成熟させたブタ、マウス、ウサギおよびハムスターの卵母細胞では、体内で成熟した卵母細胞に比べ、囲卵腔が有意に小さいとともに、媒精後の多精子侵入の頻度が有意に高いことが報告されている (Wang ら, 1998; Ueno と Niimura, 2008; Yoshida と Niimura, 2011)。一方、卵母細胞の囲卵腔には、排卵前ではヒアルロン酸や各種の糖タンパク質が (Talbot と Dicarlantonio, 1984; Dandekar と Talbot, 1992; Talbot と Dandekar, 2003)、排卵後では卵管からの分泌物が (Kapur と Johnson, 1985; Buih ら, 1993, 1997, 2000)、受精後には表層粒の内容物が (Sun, 2003; Talbot と Dandekar, 2003)、それぞれ存在することが知られている。それらの中でもヒアルロン酸は、水を多量に保持する性質があることから、囲卵腔に存在するヒアルロン酸は、水を吸収し、囲卵腔の拡大に役割を果たしていると考えられている (Talbot と Dandekar, 2003)。また、ヒアルロン酸には膜融合を阻害する作用のあることも知られており、囲卵腔が大きいと、そこに存在するヒアルロン酸も多く、多量のヒアルロン酸が卵母細胞と精子の膜融合を阻害することによって多精子侵入を阻止することも考えられている (Vollet と Roth, 1974; Kujawa と Tepperman, 1983; Orkin ら, 1985)。

Funahashi ら (1994)、Kitagawa と Niimura (2006) および Niimura ら (2007) は、低NaCl濃度の培養液で成熟させたブタおよびマウスの卵丘・卵母細胞複合体 (COC) における卵母細胞では、高NaCl濃度および通常のNaCl濃度の培養液で成熟させたものに比べ、囲卵腔が有意に大きいことを報告して

いる。また、Kitagawa と Niimura (2006)、Ueno と Niimura (2008) および Ueno ら (2009) は、糖タンパク質合成の阻害剤であるツシカマイシンまたはヒアルロン酸合成の阻害剤である4-メチルウンベリフェロン (MU) を含む培養液で成熟させたマウス卵母細胞では、これらを含まない培養液で成熟させた対照の卵母細胞に比べ、囲卵腔が有意に小さいことを報告している。しかしこれまでに、卵丘細胞を除去した裸化卵母細胞 (DO) について成熟に伴う囲卵腔の大きさが観察されているのはマウスのみであり、それ以外の動物では観察されていない。従って、培養したブタのDOにおいて、囲卵腔がCOCにおける卵母細胞と同様に成熟に伴って拡大するの否かは不明である。また、MUを含む培養液およびNaClの濃度を低下した培養液でそれぞれ培養したブタDOの囲卵腔の大きさがどのように変化するかについても明らかではない。

本研究は、培養したブタの裸化卵母細胞について、成熟に伴う囲卵腔の大きさの変化を経時的に観察するとともに、NaCl濃度を低くした培養液およびヒアルロン酸の合成阻害剤であるMUを添加した培養液で培養した裸化卵母細胞についても、成熟後の囲卵腔の大きさと媒精後の多精子侵入の頻度を観察し、囲卵腔の大きさと多精子侵入の頻度との間にそれぞれ関係があるの否かを検討したものである。

材料および方法

ブタ卵母細胞の採取および培養

屠場で採取したブタ卵巣を、39°Cに保温した生理食塩水に入れて速やかに研究室に持ち帰り、生理食塩水500ml中にペニ

¹ 新潟大学大学院自然科学研究科

² 新潟大学農学部

*代表著者：niimura@agr.niigata-u.ac.jp

シリンGカリウム (明治製菓) を 100,000 単位含む液で洗浄した。次いで、COC を、直径 3 ないし 5 mm の小型胞状卵胞から、21G の注射針を取り付けた 10ml のシリンジで吸引採取した。COC は、リン酸緩衝塩類溶液 (PBS, pH7.4) (Dulbecco と Vogt, 1954) で数回洗浄した。その後、COC を 0.1% のヒアルロニダーゼ (Sigma Chemical Co., MO, USA) を含む PBS に浸漬し、ピペット操作により卵母細胞の周囲に付着している卵丘細胞を取り除いた。これらの DO は、10% (v/v) ブタ卵胞液 (PFF)、10 単位/ml PMSG (ピーメックス, 三共)、10 単位/ml hCG (プペローゲン, 三共)、0.57mM システインを含む NCSU37 (Petters と Wells, 1993) で数回洗浄し、表面をミネラルオイルで覆った同種培養液中で、39°C で CO₂5%、空気 95% の気相下で 44 時間培養した。

培養には、4-well dish (Nunc, Roskilde, Denmark) を用い、1-well に 20 ないし 40 個の DO を入れるとともに、1-well あたりの培養液の量は 500 μ l とした。

一方、NaCl 濃度を低下させた培養液およびヒアルロン酸合成の阻害剤である MU を添加した培養液で培養した DO についても囲卵腔の大きさを観察した。すなわち、採取して卵丘細胞を除去した DO を、NaCl 濃度を 108.73mM から 61.6mM に低下した NCSU37 (低 NaCl-NCSU37) で、39°C で CO₂5%、空気 95% の気相下で 44 時間培養した。また、DO を、0.25mM の MU (和光純薬) を含む NCSU37 で、39°C で CO₂5%、空気 95% の気相下で 44 時間培養した。MU は、あらかじめジメチルスルホキシド (DMSO, 和光純薬) に溶解し、上記の濃度になるように NCSU37 で希釈して使用した。対照として、0.1% の DMSO を含む NCSU37 で 44 時間培養した DO を用いた。

囲卵腔の大きさの計測

NCSU37 で培養した DO は、培養後 0、8、22、32 および 44 時間に、図 1 に示した方法に従って細胞質の直径、透明帯の内径および外径をそれぞれ光学顕微鏡下でマイクロメーターを用いて測定し、囲卵腔の大きさを求めた。

また、低 NaCl-NCSU37、0.25mM の MU を添加した NCSU37 および対照の NCSU37 で 44 時間培養した DO についても、囲卵腔の大きさを同上の方法で測定した。なお、観察には第 1 極体を放出している DO のみを用いた。

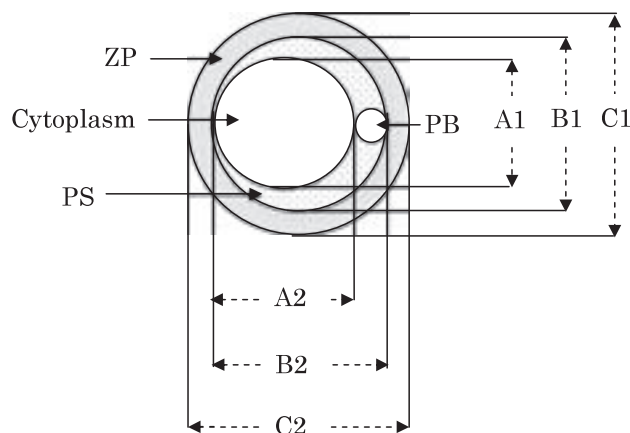
体外受精

体外受精に用いるために、NCSU37、低 NaCl-NCSU37、0.25mM の MU を添加した NCSU37 および対照の NCSU37 で 44 時間培養し、第 1 極体を放出している DO を選別して Pig-FM (Kikuchi ら, 2002) で 3 回洗浄した。

一方、ブタの新鮮射出精子を、0.1% BSA、75 μ g/ml ペニシリン G カリウム、50 μ g/ml ストレプトマイシン (明治製菓) を含む PBS で 3 回洗浄した。この処置を施した精子は、 1×10^6 個/ml の濃度になるように 0.5% BSA を含む Pig-FM で希釈した。媒精は、この精子懸濁液の 100 μ l ドロップに上述の DO を移し、CO₂5%、空気 95% の気相下で、39°C で 6 時間培養して行った。なお、媒精に用いた精子の最終濃度は 1×10^5 個/ml である。

受精の観察

媒精 6 時間後に、DO を 0.1% のプロナーゼ (Sigma Chemical Co.) を含む PBS に浸漬して透明帯を溶解した。透明帯を溶解した卵母細胞は Hoechst33342 (Sigma Chemical Co.) で染色し、



ZP: Zona pellucida, PS: perivitelline space, PB: 1st polar body.

$$\text{Diameter of cytoplasm (A)} = (A1 + A2) / 2$$

$$\text{Inner diameter of zona pellucida (B)} = (B1 + B2) / 2$$

$$\text{Outer diameter of zona pellucida (C)} = (C1 + C2) / 2$$

$$\text{Thickness of zona pellucida} = (C - B) / 2$$

$$\text{Size of perivitelline space} = (B - A) / 2$$

Fig. 1. Calculation method of the size of each part in oocyte.

細胞質内の膨化精子頭部の数および前核の数を落射蛍光顕微鏡下で調べた。

統計処理

培養後に M II 期に達した卵母細胞の数に関する統計処理には χ^2 検定法を、卵母細胞の各部位の大きさに関する数値の統計処理には分散分析法をそれぞれ用いた。

結果

採取直後および培養後のブタ卵母細胞の囲卵腔の大きさ

採取直後および NCSU37 で培養後のブタ卵母細胞の囲卵腔の大きさについて得られた結果は表 1 に示した通りである。すなわち、採取直後の卵母細胞 30 個において、9 個には囲卵腔はみられなかったが、21 個には囲卵腔が観察され、卵母細胞 30 個の囲卵腔の平均値は $0.63 \mu\text{m}$ (図 2a) であった。囲卵腔は、培養 8 時間以降拡大したが、培養後 22 時間 (図 2b) までの卵母細胞では採取直後のものと有意な相違はなかった。一方囲卵腔は、培養 32 時間以降有意に拡大し、培養 44 時間後では $4.58 \mu\text{m}$ になった (図 2c)。

低 NaCl-NCSU37 および MU を含む培養液で培養したブタ卵母細胞の囲卵腔の大きさ

低 NaCl-NCSU37 および 0.25mM の MU を添加した NCSU37 で培養した卵母細胞の成熟率および囲卵腔の大きさについて得られた結果は表 2 に示した通りである。すなわち、低 NaCl-NCSU37 で培養した卵母細胞の成熟率は 56.7% であり、対照の通常濃度の NaCl を含む NCSU37 で培養した卵母細胞の 53.6% と相違はなかった。また、MU 処置した卵母細胞の成熟率は 47.8% であり、対照の MU 処置していない卵母細胞の 51.9% と相違はなかった。

囲卵腔は、低 NaCl 濃度の培養液で培養した卵母細胞 (図 3a) では $6.25 \mu\text{m}$ であり、対照の NCSU37 で培養した卵母細胞 (図 3b) の $4.93 \mu\text{m}$ に比べて有意に大きかった。また、MU 処置した卵母細胞 (図 3c) の囲卵腔は $4.02 \mu\text{m}$ であり、対照の卵母細胞 (図 3d) の $4.69 \mu\text{m}$ に比べて有意に小さかった。

卵母細胞の媒精後の多精子侵入の頻度

低 NaCl 濃度の培養液で培養した卵母細胞および MU 処置した卵母細胞の多精子侵入の頻度は表 3 に示した通りである。すなわち、受精率は、低 NaCl 濃度の培養液で培養した卵母細胞では 80.9% であり、対照の NCSU37 で培養した卵母細胞 (図 4a) の 82.5% との間に有意な差はみられなかった。また、MU 処置した卵母細胞の受精率は 88.1% であり、対照の MU 処置

していない卵母細胞の 85.7% との間に有意な差はみられなかった。一方、多精子侵入の頻度は、低 NaCl 濃度の培養液で培養した卵母細胞では 32.7% であり、対照の NCSU37 で培養した卵母細胞の 51.9% に比べて有意に低かった。また、MU 処置した卵母細胞 (図 4b) の多精子侵入率は 70.3% であり、対照の MU 処置していない卵母細胞の 47.6% に比べて有意に高かった。

考察

本研究において、ブタ DO の囲卵腔の大きさが培養時間の経過に伴ってどのように変化するかを初めて観察した。その結果、採取直後には囲卵腔を有していないものが 30% 程度みられたが、8 時間後にはすべての卵母細胞で囲卵腔が認められるとともに、囲卵腔は拡大した。囲卵腔は、培養 32 時間以降有意に拡大し、培養後 44 時間では平均で $4.58 \mu\text{m}$ になった。この DO における結果は、COC で培養した卵母細胞の囲卵腔の変化 (Kitagawa と Niimura, 2006) と同様のものではなかった。このことから、ブタ卵母細胞の囲卵腔は、卵丘細胞の有無に関わらず、成熟に伴って拡大するものと考えられた。

一方、本研究において、各種処置を施したブタ DO の囲卵腔の大きさを調べた。その結果、囲卵腔は、低 NaCl-NCSU37 で培養したブタ DO では、対照の通常濃度の NaCl を含む NCSU37 で培養した DO に比べて有意に大きくなるとともに、MU で処置した DO では、対照の DO に比べて有意に小さくなることが確認された。

また、本研究において、各種処置を施して囲卵腔の大きさを变化させたブタ卵母細胞の媒精後の多精子侵入の頻度について観察した。その結果、受精率は、各種培養液で培養した DO の間でそれぞれ相違ないことが確かめられた。一方、多精子侵入の頻度は、低 NaCl-NCSU37 で培養した DO に比べ、対照の NCSU37 で培養した DO で有意に高いとともに、MU 処置していない対照の DO に比べ、MU 処置した DO で、それぞれ有意に高いことが確かめられた。本研究の結果から、ブタ卵母細胞の囲卵腔の大きさと媒精後の多精子侵入の頻度との間には関係のあることが推察された。

大型の囲卵腔を有する卵母細胞で、媒精後の多精子侵入の頻度が低い理由については明らかではないが、Talbot と Dandekar (2003) は、囲卵腔の大きさが受精時に精子の卵細胞膜への接着に影響を及ぼすのではないかと考えている。すなわち、透明帯を通過した精子が卵母細胞の細胞膜と融合するには、精子先体が卵母細胞の細胞膜と平行になり、赤道部で細胞膜と接する必要がある (Iwamatsu と Chang, 1972; Bedford ら, 1979; Sathananthan と Chen, 1986)。従って、囲卵腔が小さけ

Table 1. The size of the perivitelline space in denuded porcine oocytes cultured in NCSU37

Hours of culture	No. of oocytes examined	Size of perivitelline space (μm)
0	30	$0.63 \pm 0.10^{\text{ab}}$
8	30	$1.17 \pm 0.28^{\text{b}}$
22	30	$1.36 \pm 0.20^{\text{b}}$
32	34	$4.38 \pm 0.32^{\text{a}}$
44	56	$4.58 \pm 0.29^{\text{a}}$

*Mean \pm S.E.

Values with different superscripts in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

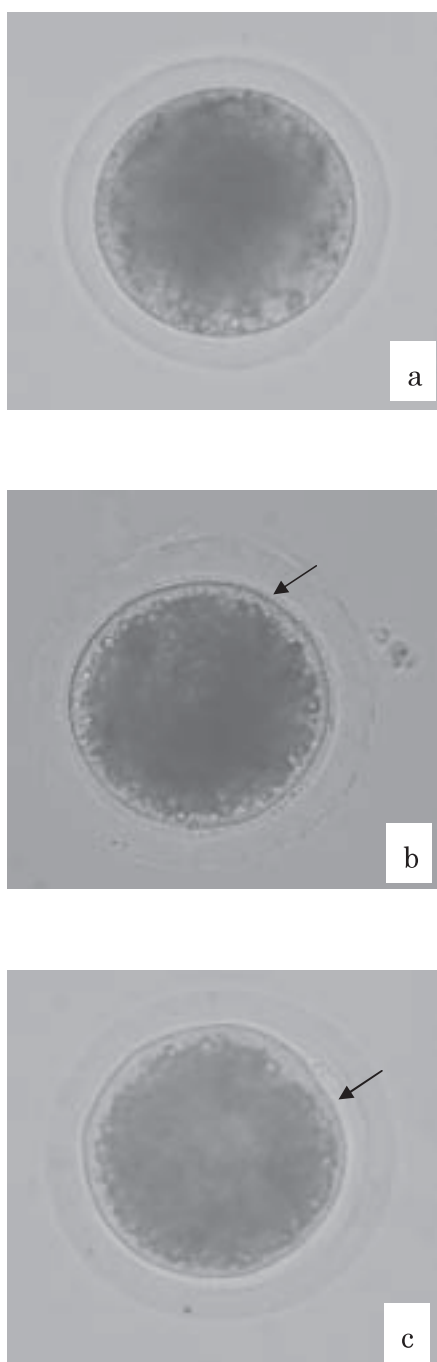


Fig. 2. Perivitelline space of denuded porcine oocytes.

- No perivitelline space is seen between the plasma membrane and zona pellucida of an oocyte immediately after collection from antral follicle.
- A small perivitelline space (an arrow) is seen in an oocyte cultured for 22 hrs in NCSU37.
- A large perivitelline space (an arrow) is seen in an oocyte cultured for 44 hrs in NCSU37.

れば、精子の赤道部が卵母細胞の細胞膜と接する機会が増し、多精子侵入の頻度は上昇するものと考えられている (Talbot と Dandekar, 2003)。一方、囲卵腔が拡大すると、そこに存在するタンパク質やヒアルロン酸の量も増加するので、それらが物理的障壁となって精子の卵母細胞の細胞膜への接触を阻害するのではないかと考えられている (Dandekar と Talbot, 1992; Talbot と Dandekar, 2003)。さらに、ヒアルロン酸は、膜融合を阻害する作用のあることも報告されているので (Vollet と Roth, 1974; Kujawa と Tepperman, 1983; Orkin ら, 1985)、これらが囲卵腔の大きい卵母細胞で媒精後の多精子侵入の頻度が低い理由のように考えられた。

以上の結果から、囲卵腔の大きさと多精子侵入の頻度との間には密接な関係のあることが推察された。

引用文献

- Bedford, J. M., H. D. Moore and L. E. Franklin. 1979. Significance of the equatorial segment of the acrosome of the spermatozoon in eutherian mammals. *Exp. Cell Res.*, **119**: 119-126.
- Buhi, W. C., B. O'Brein, I. M. Alvares, G. Erdos and D. Dubois. 1993. Immunogold localization of porcine oviductal secretory proteins within the zona pellucida, perivitelline space, and plasma membrane of oviductal and uterine oocytes and early embryos. *Biol. Reprod.*, **48**: 1274-1283.
- Buhi, W. C., I. M. Alvarez and A. J. Kouba. 1997. Oviductal regulation of fertilization and early embryonic development. *J. Reprod. Fertil.*, **52**: 285-300.
- Buhi, W. C., I. M. Alvarez and A. J. Kouba. 2000. Secreted proteins of the oviduct. *Cells Tissues Organs*, **166**: 165-179.
- Dandekar, P. and P. Talbot. 1992. Perivitelline space of mammalian oocytes: extracellular matrix of unfertilized oocytes and formation of a cortical granules envelope following fertilization. *Mol. Reprod. Dev.*, **31**: 135-143.
- Dulbecco, R. and M. Vogt. 1954. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. Exp. Med.*, **99**: 167-182.
- Funahashi, H., T. C. Cantley, T. T. Stumpf, S. L. Terlouw and B. N. Day. 1994. Use of low-salt culture medium for in vitro maturation of porcine oocytes is associated with elevated oocyte glutathione levels and enhanced male pronuclear formation after in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology*, **49**: 1489-1499.
- Iwamatsu, T. and M. C. Chang. 1972. Sperm penetration in vitro of mouse oocytes at various times during maturation. *J. Reprod. Fertil.*, **31**: 237-247.
- Kapur, R. P. and L. V. Johnson. 1985. An oviductal fluid glycoprotein associated with ovulated mouse ova and early embryos. *Dev. Biol.*, **112**: 89-94.
- Kitagawa, T. and S. Niimura. 2006. Relationship between the size of perivitelline space and the incidence of polyspermy in porcine oocytes. *Bull. Facul. Agric. Niigata Univ.*, **59**: 21-26
- Kujawa, M. J. and K. Tepperman. 1983. Culturing chick muscle cells on glycosaminoglycan substrates:

Table 2. The size of the perivitelline space in denuded porcine oocytes cultured in media of different kinds

Kinds of culture media	Maturation rate (%)	No. of oocytes examined	Size of perivitelline space (μm)
NCSU37	53.6 ^a (30/56)	30	4.93 \pm 0.20 ^{ab}
Modified NCSU37 with decreased concentration of NaCl**	56.7 ^a (38/67)	38	6.25 \pm 0.27 ^a
NCSU37 with 0.25 mM MU	47.8 ^a (43/90)	43	4.02 \pm 0.22 ^b
NCSU37 without MU (Control)	51.9 ^a (42/81)	42	4.69 \pm 0.26 ^a

* Mean \pm S.E.

** Concentration of NaCl in modified NCSU37 medium was lowered from 108.73 to 61.6 mM. The oocytes were observed after 44 hrs of culture.

Values with different superscripts in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

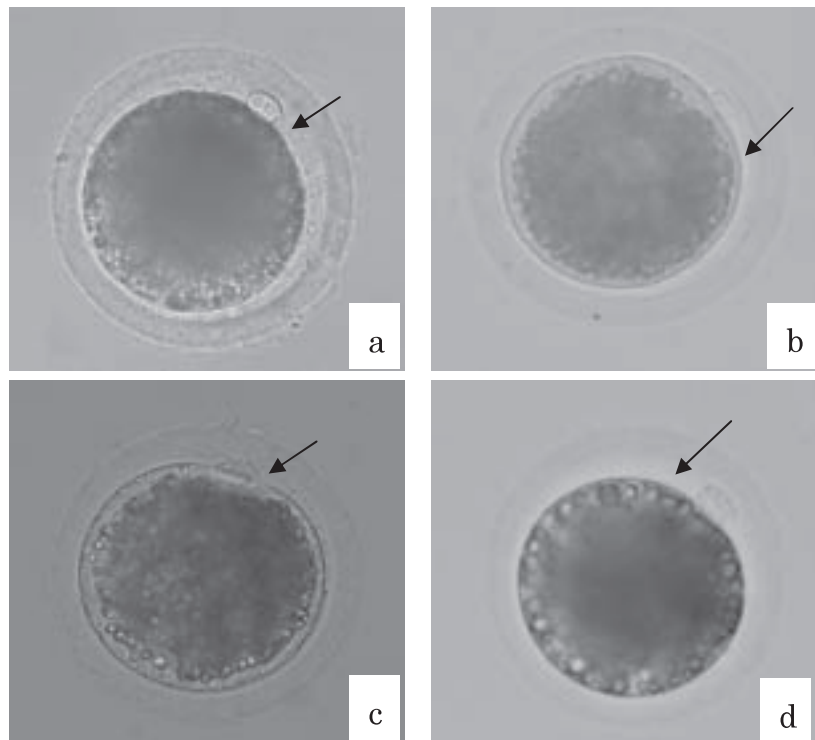


Fig. 3. Perivitelline space of denuded porcine oocytes cultured for 44 hrs in media of different kinds.

- Perivitelline space (an arrow) of oocyte cultured in modified NCSU37 with decreased concentration of NaCl.
- Perivitelline space (an arrow) of oocyte cultured in NCSU37.
- Perivitelline space (an arrow) of oocyte cultured in NCSU37 containing 0.25mM MU.
- Perivitelline space (an arrow) of oocyte cultured in NCSU37 containing no MU.

Table 3. The incidence of fertilization and polyspermy in porcine oocytes matured in media of different kinds

Kinds of culture media	No. of oocytes inseminated	No. (%) of oocytes fertilized	No. (%) of monospermic oocytes	No. (%) of polyspermic oocytes
NCSU37	63	52(82.5) ^a	25(48.1) ^b	27(51.9) ^a
Modified NCSU37 with decreased concentration of NaCl*	68	55(80.9) ^a	37(67.3) ^a	18(32.7) ^b
NCSU37 with 0.25 mM MU	49	37(88.1) ^a	11(29.7) ^b	26(70.3) ^a
NCSU37 without MU (Control)	42	42(85.7) ^a	22(52.4) ^a	20(47.6) ^b

* Concentration of NaCl in modified NCSU37 medium was lowered from 108.73 to 61.6 mM.

Values with different superscripts in the same column in each group of experiments are significantly different ($p < 0.05$).

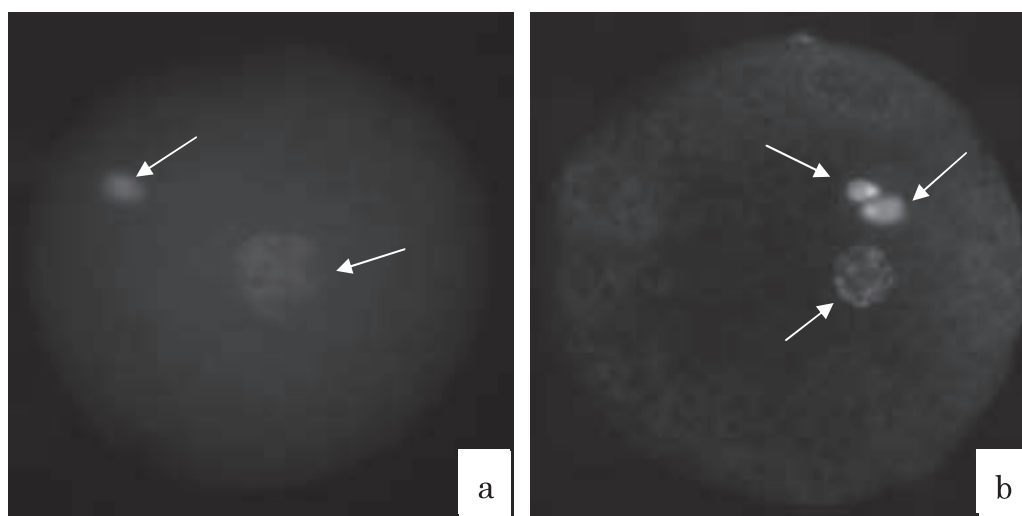


Fig. 4. Fertilized porcine oocytes matured in NCSU37 (a) and NCSU37 containing 0.25mM MU (b).
 a. A monospermic oocyte with two pronuclei (arrows) in the cytoplasm.
 b. A polyspermic oocyte with three pronuclei (arrows) in the cytoplasm.

- attachment and differentiation. *Dev. Biol.*, **99**: 277-286.
- Niimura, S., S. Ueno, T. Kitagawa and K. Sato. 2007. The size of perivitelline space in mouse oocytes cultured in the medium with decreased concentration of NaCl. *Bull. Facul. Agric. Niigata Univ.*, **52**: 100-106.
- Orkin, R. W., W. Knudson and B. P. Toole. 1985. Loss of hyaluronate dependent coat during myoblast fusion. *Dev. Biol.*, **107**: 527-530.
- Petters, R. M. and K. D. Wells. 1993. Culture of pig embryos. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, **48**: 61-73.
- Sathananthan, A. H. and C. Chen. 1986. Sperm-oocyte membrane fusion in the human during monospermic fertilization. *Gamete Res.*, **15**: 117-186.
- Sun, Q. Y. and T. Nagai. 2003. Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *J. Reprod. Dev.*, **49**: 347-359.
- Talbot, P. and G. Dicarantonio. 1984. The oocyte-cumulus complex: ultrastructure of the extracellular components in hamsters and mice. *Gamete Res.*, **10**: 127-142.
- Talbot, P. and P. Dandekar. 2003. Perivitelline space: does it play a role in blocking polyspermy in mammals? *Microsc. Res. Tech.*, **61**: 349-357.
- Ueno, S. and S. Niimura. 2008. Size of perivitelline space and incidence of polyspermy in mouse oocytes matured in vivo and in vitro. *J. Mamm. Ova Res.*, **25**: 44-49.
- Vollet, J. J. and L. E. Roth. 1974. Cell fusion by nascent membrane induction and divalent cation treatment. *Cryobiologie*, **9**: 249-262.
- Wang, W. H., L. R. Abeydeera, R. S. Prather and B. N. Day. 1998. Morphologic comparison of ovulated and in vitro-matured porcine oocytes, with particular reference to polyspermy after in vitro fertilization. *Mol. Reprod. Dev.*,

49: 308-316.

Yoshida, N. and S. Niimura. 2011. Size of the perivitelline space and incidence of polyspermy in rabbit and hamster oocytes. *Reprod. Med. Biol.*, **10**: 31-41.

Size of the Perivitelline Space of Denuded Porcine Oocytes and Incidence of Polyspermy following Insemination

Yukihiro JINBO¹ and Sueo NIIMURA^{2*}

(Received July 1, 2012)

Summary

The size of the perivitelline space was measured in porcine oocytes without cumulus cells (DOs) cultured in NCSU37. In addition, the size of the perivitelline space of DOs cultured in modified NCSU37 with decreased concentration of NaCl and those cultured in NCSU37 containing 4-methylumbelliferone (MU), an inhibitor of hyaluronic acid synthase, was observed. The incidence of polyspermy in DOs matured in NCSU37, modified NCSU37, and NCSU37 containing MU following insemination was also examined, in order to ascertain a relationship between the size of the perivitelline space and the incidence of polyspermy.

The perivitelline space could barely be seen in 70 % (21/30) of oocytes immediately after collection from antral follicles and could not be seen in 30 % of the oocytes. The mean size of the perivitelline space was 0.63 μm in oocytes immediately after collection from antral follicles and significantly increased to 4.38 and 4.58 μm at 32 and 44 hrs after culture.

In DOs matured in modified NCSU37 with decreased concentration of NaCl, the size of perivitelline space (6.25 μm) was significantly larger than 4.93 μm in DOs cultured in NCSU37. The size of perivitelline space was significantly smaller in DOs cultured in NCSU37 containing MU (4.02 μm) than in those cultured in NCSU37 without MU (4.69 μm).

DOs matured in NCSU37, modified NCSU37 with decreased concentration of NaCl, NCSU37 containing MU, NCSU37 containing no MU showed the maturation rate of 53.6, 56.7, 47.8 and 51.9% , respectively, and the fertilization rate after insemination of 82.5, 80.9, 88.1 and 85.7% , respectively. There were no differences in either the maturation rate or the fertilization rate seen among these four culture media. On the other hand, the incidence of polyspermy of DOs matured in modified NCSU37 with decreased concentration of NaCl was 32.7 % , which was significantly lower than 51.9 % of DOs matured in NCSU37. The incidence of polyspermy was significantly higher in DOs matured in NCSU37 containing MU (70.3 %) than in control DOs matured in NCSU37 without MU (47.6 %).

From these findings, it was confirmed that the higher incidence of polyspermy is closely related to the smaller perivitelline space in porcine oocytes.

Bull.Facul.Agric.Niigata Univ., 65(1):23-30, 2012

Key words : denuded porcine oocyte, size of perivitelline space, polyspermy

¹ Graduate School of Science and Technology, Niigata University

² Faculty of Agriculture, Niigata University

* Corresponding author: niimura@agr.niigata-u.ac.jp