

マウスの卵丘・卵母細胞複合体から分泌されるヒアルロン酸の量と役割

上野紗也香¹・新村末雄^{2*}

(平成19年12月20日受付)

要約

マウスの卵丘・卵母細胞複合体 (COC) から分泌されるヒアルロン酸の量を競合 ELISA 法で検出した。また、ヒアルロン酸合成を阻害した COC について、ヒアルロン酸の分泌量を測定するとともに、卵母細胞については囲卵腔の大きさと媒精後の多精子受精の頻度を観察し、COC から分泌されるヒアルロン酸の囲卵腔の大きさに果たす役割および囲卵腔の大きさと多精子受精の頻度との関係の有無を検討した。

ヒアルロン酸は、胞状卵胞から採取直後の COC からは検出されなかったが、培養後14時間の COC では1個あたり8.40ng 検出された。また、ヒアルロン酸合成を阻害する作用のある4-メチルウンベリフェロン (MU) で処置した COC では、1個あたり3.52ng のヒアルロン酸が検出されたが、この量は対照の COC の6.54ng に比べて有意に少なかった。

一方、囲卵腔は、対照の COC における卵母細胞では平均で5.48 μm あったが、MU 処置した COC における卵母細胞では有意に小さく、4.36 μm であった。また、媒精後の受精率は、MU 処置した COC における卵母細胞 (82.2%) と対照の COC における卵母細胞 (88.6%) との間で相違なかったが、多精子受精の頻度は、MU 処置した COC における卵母細胞では37.8%であり、対照の COC における卵母細胞の16.1%に比べて有意に高かった。

以上の結果から、COC から分泌されるヒアルロン酸は卵母細胞の囲卵腔の拡大に関係していること、また、卵母細胞の囲卵腔の大きさと多精子受精の頻度との間には関係のあることがそれぞれ考えられた。

新大農研報, 60(2):129-133, 2008

キーワード: マウス、卵丘・卵母細胞複合体、ヒアルロン酸、囲卵腔、多精子受精

囲卵腔は、卵母細胞の細胞膜と透明帯の間にある間隙で、最近、囲卵腔の大きさと媒精後の多精子受精の頻度との間には関係のあることがブタで報告されている (Funahashi ら, 1994; Wang ら, 1998; Kitagawa と Niimura, 2006)。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, 1986; Buih ら, 1993, 1997, 2000)、受精後には表層粒の内容物が (Szollosi, 1967; Gulyas, 1980; 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)。一般に、囲卵腔の拡大に役割を果たすと考えられているヒアルロン酸は、卵丘・卵母細胞複合体 (COC) から分泌されたものであろうと考えられている (Talbot と Dicarlantonio, 1984)。Salustri ら (1992) は、放射性同位元素を標識したヒアルロン酸の測定キットを用いて、マウスの COC が分泌するヒアルロン酸の量を測定している。それによると、PMSG 注射後 48 時間に胞状卵胞から採取した直後の COC からはヒアルロン酸は検出されなかったが、hCG 注射後 15 時間および培養後 15 時間の COC では、それぞれ1個から11.4あるいは4.2ng のヒアルロン酸が検出されたという。しかしこれまでに、COC から分泌されたヒアルロン酸が卵母細胞の囲卵腔の拡大に役割を果たしているのかどうかを検討した報告はみられない。

本研究は、培養前と培養後のマウスの COC について、ヒア

ルロン酸の分泌量を競合 ELISA 法で測定したものである。また、ヒアルロン酸の合成を阻害する物質である4-メチルウンベリフェロン (MU) (Nakamura ら, 1995, 1997; Itano, 2004; Kakizaki ら, 2004) で処置した COC についてもヒアルロン酸の分泌量を測定するとともに、MU 処置した COC における卵母細胞の囲卵腔の大きさを測定し、COC が分泌するヒアルロン酸が卵母細胞の囲卵腔の大きさに影響を及ぼすのかどうかを検討したものである。さらに、MU 処置して囲卵腔の大きさが変化した卵母細胞に媒精して多精子受精の頻度を調べ、囲卵腔の大きさと多精子受精の頻度との関係も併せて検討したものである。

材料および方法

動物

供試動物として、PMSG (ピーメックス、三共エール薬品) 5 単位を腹腔内注射した ICR 系成熟雌マウスおよび同系統の成熟雄マウスを使用した。マウスの飼育は 24°C に調節した室内で行い、点灯は午前 4 時から午後 6 時までの 14 時間とした。COC の採取と培養

COC から分泌されるヒアルロン酸量を測定するために、PMSG 注射後 48 時間に胞状卵胞から COC を採取した。採取した COC は、20 個ずつのグループに分け、60 μl の TYH 液 (豊田ら, 1971) に入れた。TYH 液に入れた 20 個の COC のグループのいくつかは、ヒアルロン酸の検出まで -20°C で凍結保存した。また、培養後の COC から分泌されるヒアルロン酸量を測定するために、60 μl の TYH 液に入れた 20 個の COC のグループのいくつかを、37°C で CO₂5%、空気 95% の気相下で 14

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

時間培養した。培養後のCOCおよび培養液は、ヒアルロン酸の検出まで -20°C で凍結保存した。

一方、ヒアルロン酸合成が阻害されたCOCにおけるヒアルロン酸の分泌量ならびに卵母細胞の囲卵腔の大きさを測定するために、PMSG注射後48時間に胞状卵胞から採取したCOC20個を、 0.25mM のMU(和光純薬)を含む $60\mu\text{l}$ のTYH液のドロップ中で、 37°C で CO_2 5%、空気95%の気相下で14時間培養した。MUは、あらかじめDMSOに溶解し、上記の濃度になるようにTYH液で希釈した。対照として、0.1%のDMSOを含むTYH液で14時間培養したCOCを用いた。なお、ヒアルロン酸の分泌量を測定するために、培養後のドロップの培養液を20個のCOCとともに -20°C で凍結保存した。

ヒアルロン酸の検出

ヒアルロン酸の検出は、培養前のCOC、培養後14時間のCOC、ならびにMUで処置したCOCとその対照のCOCを含む培養液について、KongtawelertとGhosh(1990)の方法に準じた競合ELISA法によって行った。すなわち、96ウェルのマキシソープヌンクイムプレート(Nunc Co., Denmark)に、 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度のヒアルロン酸(MP Biomedicals, Inc., USA)水溶液を1ウェルに $100\mu\text{l}$ ずつ加え、室温で一晩静置した。一晩静置後、イムプレートのヒアルロン酸水溶液を捨て、各ウェルを0.05%のTween 20(和光純薬)を含むPBS(DulbeccoとVogt, 1954)(PBS-Tween 20)で3回洗浄した。次いで、1%のBSA(Sigma Chemical Co., USA)を含むPBS(BSA-PBS)を、1ウェルに $100\mu\text{l}$ ずつ加えて 37°C で1時間インキュベートした後、BSA-PBSを捨て、各ウェルをPBS-Tween 20で5回洗浄し、乾燥させた。

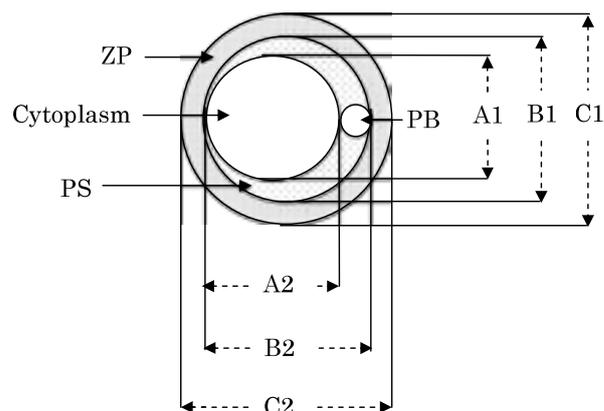
一方、 -20°C で凍結保存した各種COCを含むTYH液は、融解後、 $1,500\text{rpm}$ で10分間遠心し、上清を採取してTYH液で3倍に希釈した。これらの上清の希釈液およびヒアルロン酸を 1ml のTYH液中に0、1.56、3.13、6.25、12.5、25.0、50.0および 100.0ng 含む標準液それぞれ $60\mu\text{l}$ に、 1ml 中に $0.7\mu\text{g}$ のビオチンを標識したヒアルロン酸結合タンパク質(生化学工業)を含む水溶液 $60\mu\text{l}$ を加え、 37°C で90分間反応させた。次いで、反応液をイムプレートの各ウェルに $100\mu\text{l}$ ずつ添加し、 37°C で1時間インキュベートした。インキュベート後、反応液を捨て、各ウェルをPBS-Tween 20で5回洗浄した。これらのウェルに、1:5,000に希釈したアルカリホスファターゼ結合アビジン(Sigma Chemical Co.)を1ウェルに $100\mu\text{l}$ ずつ加え、 37°C で1時間インキュベートした。インキュベート後、アルカリホスファターゼ結合アビジンを捨て、各ウェルをPBS-Tween 20で5回洗浄した。次いで、発色試薬であるpNPP(Sigma Chemical Co.)を各ウェルに $100\mu\text{l}$ ずつ添加し、 37°C で反応させた。15分後、 0.2M の NaOH $80\mu\text{l}$ を各ウェルに添加して反応を停止させ、マイクロプレートリーダー(BIO-RAD, USA)を用いて、 405nm の吸光度を測定した。

ヒアルロン酸量は、標準液で得られた吸光度から標準曲線を描き、その曲線にCOCを含むTYH液で得られた吸光度をあてはめて求めた。

卵母細胞の囲卵腔の大きさの測定

0.25mM のMUを含むTYH液で14時間培養したCOC、およびMUを含まないTYH液で14時間培養した対照のCOCは、0.1%のヒアルロニダーゼ(Sigma Chemical Co.)を含むTYH液に浸漬し、ピペット操作により卵母細胞周囲の卵丘細胞を除去した。卵丘細胞を除去した卵母細胞を実体顕微鏡で観察し、第1極体を放出したもの、すなわち成熟した卵母細胞のみを選

別し、図1に示した方法に従って細胞質の直径、透明帯の内径と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。



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

$$\begin{aligned} \text{Diameter of cytoplasm (A)} &= (A1+A2) / 2 \\ \text{Inner diameter of zona pellucida (B)} &= (B1+B2) / 2 \\ \text{Outer diameter of zona pellucida (C)} &= (C1+C2) / 2 \\ \text{Thickness of zona pellucida} &= (C - B) / 2 \\ \text{Size of perivitelline space} &= (B - A) / 2 \end{aligned}$$

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

体外受精

媒精後の多精子受精の頻度を観察するために、 0.25mM のMUを含むTYH液で14時間培養したCOC、およびMUを含まないTYH液で14時間培養した対照のCOCは、0.1%のヒアルロニダーゼ(Sigma Chemical Co.)を含むTYH液に浸漬し、ピペット操作により卵母細胞周囲の卵丘細胞を除去した。卵丘細胞を除去した卵母細胞を実体顕微鏡で観察し、第1極体を放出したもの、すなわち成熟した卵母細胞のみを選別した。一方、体外受精に用いる精子を調整するために、ICR系成熟雄マウスの精巣上体尾部から精子塊を取り出し、TYH液中で、 37°C で1ないし1.5時間前培養して受精能獲得処置を施した。次いで、精子濃度が 2×10^6 個/mlになるようにTYH液で希釈した。体外受精は、上述の成熟した卵母細胞を、上記濃度の精子懸濁液 $100\mu\text{l}$ のドロップに移し、 37°C で12時間培養して行った。

精子とともに12時間培養した後、卵母細胞を光学顕微鏡で観察し、細胞質中に2個の前核が存在するものを単精子受精卵母細胞、細胞質中に3個以上の前核が存在するものを多精子受精卵母細胞と判定した。

統計処理

第1極体を放出している卵母細胞、すなわち成熟している卵母細胞に関する数値および受精に関する数値の統計処理には χ^2 検定法を、ヒアルロン酸の分泌量および囲卵腔の大きさに関する数値の統計処理にはt検定をそれぞれ用いた。

結 果

1. COC が分泌するヒアルロン酸の量

表 1 に示したように、PMSG 注射後 48 時間に胞状卵胞から採取した直後の COC からはヒアルロン酸は検出されなかったが、培養後 14 時間では、COC 1 個あたり 8.40ng のヒアルロン酸が検出された。

また、MU とともに培養した COC において、1 個あたり 3.52ng のヒアルロン酸が検出されたが、MU 処置した COC が分泌したヒアルロン酸量は、対照の COC の分泌量である 6.54ng に比べて有意に少なかった。

Table 1. The amount of hyaluronic acid secreted by mouse cumulus-oocyte complexes

Cumulus-oocyte complexes	ng/Cumulus-oocyte complex
Cultured for 0 hr	ND [†]
Cultured for 14 hrs	8.40 ± 0.46 ^{††}
Cultured for 14 hrs in the medium without MU	6.54 ± 0.59 ^a
Cultured for 14 hrs in the medium with 0.25mM MU	3.52 ± 0.33 ^b

[†] ND: Not detected.

^{††} Values are expressed as mean ± S.E. from three replicates. Values with different superscripts in the same column in each experimental lot are significantly different ($p < 0.05$).

2. MU 処置した COC における卵母細胞の成熟率と囲卵腔の大きさ

0.25mM の MU とともに培養した COC において、卵母細胞の成熟率は 66.6% であり、対照の COC における卵母細胞の 86.0% に比べて有意に低かった (表 2)。一方、MU 処置した COC における卵母細胞の囲卵腔は 4.36 μ m あり、MU を含まない培養液で培養した対照の卵母細胞の 5.48 μ m に比べて有意に小さかった (表 2)。

Table 2. The rate of maturation and the size of perivitelline space in mouse oocytes cultured in the medium containing MU

Concentration of MU (mM)	No. of oocytes cultured	No. (%) of oocytes matured	Size of perivitelline space (μ m)
0	43	37(86.0) ^a	5.48 ± 0.25 ^{†a}
0.25	45	30(66.6) ^b	4.36 ± 0.17 ^b

[†] Mean ± S.E.

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

3. MU 処置した COC における卵母細胞の受精率と多精子受精率

MU 処置した COC における卵母細胞の受精率は 82.2% であり、対照の卵母細胞の 88.6% と相違なかったが、多精子受精率は 37.8% であり、対照の卵母細胞の 16.1% に比べて有意に高かった (表 3)。

Table 3. The rates of fertilization and polyspermy in mouse oocytes cultured in the medium containing MU

Concentration of MU (mM)	No. of oocytes inseminated	No. (%) of fertilized oocytes	No. (%) of polyspermic oocytes
0	35	31(88.6) ^a	5(16.1) ^b
0.25	45	37(82.2) ^a	14(37.8) ^a

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

考 察

放射性同位元素を標識したヒアルロン酸の測定キットを用いて、マウスの COC が分泌するヒアルロン酸の量を測定した Salustri ら (1992) によると、PMSG 注射後 48 時間に胞状卵胞から採取した直後の COC からはヒアルロン酸は検出されなかったが、hCG 注射後 15 時間および培養後 15 時間の COC では、それぞれ 1 個から 11.4 あるいは 4.2ng のヒアルロン酸が検出されたという。しかしこれまでに、COC から分泌されるヒアルロン酸量を測定しているのは Salustri ら (1992) のみである。

本研究において、マウスの培養前の COC ならびに培養後 14 時間の COC について、Salustri ら (1992) とは異なった方法、すなわち競合 ELISA 法を用いてヒアルロン酸の分泌量を測定した。その結果、胞状卵胞から採取直後の COC からはヒアルロン酸は検出されなかったが、培養後 14 時間の COC からは 8.40ng のヒアルロン酸が検出された。この結果は、Salustri ら (1992) の結果とほぼ同様であった。一方本研究において、ヒアルロン酸の合成阻害剤である MU で処置した COC が分泌したヒアルロン酸の量は 3.52ng であり、対照の COC が分泌した 6.54ng と比較して有意に少ないことが確かめられた。従って、培養した COC から検出されたヒアルロン酸は、COC が合成して分泌したものであることがうかがわれた。

一般に、囲卵腔の拡大に役割を果たすと考えられているヒアルロン酸は、COC の卵丘細胞で合成・分泌され、卵母細胞の囲卵腔に侵入するのであろうと考えられている。しかし、卵丘細胞で合成・分泌されたヒアルロン酸が、卵母細胞の囲卵腔の拡大に役割を果たしているのかどうかは不明である。本研究において、MU 処置した COC における卵母細胞の囲卵腔の大きさを計測して対照の卵母細胞のものと比較し、COC から分泌されるヒアルロン酸が卵母細胞の囲卵腔の拡大に役割を果たしているのかどうかを検討した。その結果、MU 処置した COC における卵母細胞の囲卵腔は、対照の COC におけるものに比べて有意に小さいことが確かめられた。従って、COC が分泌するヒアルロン酸は卵母細胞の囲卵腔の拡大に役割を果たしていることが示唆された。

一方、ヒアルロン酸合成酵素の 1 つである HAS3 の mRNA がブタの卵母細胞に存在すること (Kimura ら, 2002)、また、金を標識したヒアルロニダーゼでハムスターの COC の切片を染色すると、金の沈着は、卵丘細胞間および卵丘細胞と囲卵腔にはみられたが、透明帯にはみられなかったことから、囲卵腔のヒアルロン酸は卵母細胞由来であることが示唆されている (Kan, 1990)。本研究では、卵丘細胞とともに卵母細胞も一緒に MU 処置しているので、卵母細胞にヒアルロン酸の合成・分泌能があったとしても、卵丘細胞とともに卵母細胞でのヒアルロン酸の合成と分泌も阻害され、結果として囲卵腔が小さく

なったことも考えられた。

さらに、MU 処置して囲卵腔が小さくなった卵母細胞に媒精すると、多精子受精の頻度が対照の卵母細胞のものに比べて有意に高いことが確かめられた。囲卵腔の大きさと媒精後の多精子受精の頻度との間には関係のあることがブタで示唆されているが(Funahashi ら, 1994; Wang ら, 1998; Kitagawa と Niimura, 2006)、本研究の結果から、ブタ以外の動物の卵母細胞でも、囲卵腔の大きさと媒精後の多精子受精の頻度との間には関係のあることが考えられた。

引用文献

- Buhi, W. C., B. O'Brien, I. M. Alvarez, 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. Suppl.*, **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., J. Aggeler and P. Talbot. 1992. Structure, distribution and composition of the extracellular matrix of human oocytes and cumulus masses. *Human Reprod.*, **7**: 391-398.
- 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 fertilization. *Biol. Reprod.*, **51**: 633-639.
- Gulyas, B. J. 1980. Cortical granules of mammalian eggs. *Int. Rev. Cytol.*, **63**: 357-392.
- Itano, N. 2004. Abnormal hyaluronan synthesis and cancer progression. *Trend Glycos. Glycotech.*, **16**: 199-210.
- Kakizaki, I., K. Kojima, K. Takagaki, M. Endo, R. Kannagi, M. Ito, Y. Maruo, H. Sato, T. Yasuda, S. Mita, K. Kimata and N. Itano. 2004. A novel mechanism for the inhibition of hyaluronan biosynthesis by 4-methylumbelliferone. *J. Biol. Chem.*, **279**: 33281-33289.
- Kan, F.W.K. 1990. High-resolution localization of hyaluronic acid in the golden hamster oocyte-cumulus complex by use of a hyaluronidase-gold complex. *Anat. Rec.*, **228**: 370-382.
- 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.
- Kapur, R. P. and L. V. Johnson. 1986. Selective sequestration of an oviductal fluid glycoprotein in the perivitelline space of mouse oocytes and embryos. *J. Exp. Zool.*, **238**: 249-260.
- Kimura, N., Y. Konno, K. Miyoshi, H. Matsumoto and E. Sato. 2002. Expression of hyaluronan synthases and CD44 messenger RNAs in porcine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation. *Biol. Reprod.*, **66**: 707-717.
- 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.
- Kongtawelert, P. and P. Ghosh. 1990. A method for the quantitation of hyaluronan (hyaluronic acid) in biological fluids using a labeled avidin-biotin technique. *Anal. Biochem.*, **185**: 313-318.
- Nakamura, T., K. Takagaki, S. Shibata, K. Tanaka, T. Higuchi and M. Endo. 1995. Hyaluronic-acid deficient extracellular matrix induced by addition of 4-methylumbelliferone to the medium of cultured human skin fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **208**: 470-475.
- Nakamura, T., M. Funahashi, K. Takagaki, H. Munakata, K. Tanaka, Y. Saito and M. Endo. 1997. Effect of 4-methylumbelliferone on cell-free synthesis of hyaluronic acid. *Biochem. Mol. Biol. Internat.*, **43**: 263-268.
- Salustri, A., M. Yanagishita, C. B. Undehill, T. C. Laurent and V. C. Hascall. 1992. Localization and synthesis of hyaluronic acid in the cumulus cells and mural granulosa cells of the preovulatory follicle. *Dev. Biol.*, **151**: 541-551.
- Sun, Q. Y. 2003. Cellular and molecular mechanisms leading to cortical reaction and polyspermy block in mammalian eggs. *Micro. Res. Tech.*, **61**: 342-348.
- Szollosi, D. 1967. Development of cortical granules and the cortical reaction in rat and hamster eggs. *Anat. Rec.*, **159**: 431-446.
- Talbot, P. and P. Dandekar. 2003. Perivitelline space: Does it play a role in blocking polyspermy in mammals? *Microsc. Res. Tech.*, **61**: 349-357.
- Talbot, P. and G. Dicarlantonio. 1984. Ultrastructure of opossum oocyte investing coats and their sensitivity to trypsin and hyaluronidase. *Dev. Biol.*, **103**: 159-167.
- 豊田 裕・横山峯介・星冬四郎. 1971. マウス卵子の体外受精に関する研究. I. 精巢上体精子による受精成績. 家畜繁殖誌, **16**: 147-151.
- 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.

The Amount and the Role of Hyaluronic Acid Secreted by Mouse Cumulus-Oocyte Complexes

Sayaka UENO¹ and Sueo NIIMURA^{2*}

(Received December 20, 2007)

Summary

Using competitive enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), the amount of hyaluronic acid secreted by mouse cumulus-oocyte complexes (COCs) was examined. The size of perivitelline space and the incidence of polyspermy in mouse oocytes of COCs treated with 4-methylumbelliferone (MU), an inhibitor of hyaluronic acid synthase, were observed, in order to examine the role of hyaluronic acid secreted by COCs in the size of perivitelline space of oocytes, and the relationship between the size of perivitelline space and the incidence of polyspermy of oocytes following insemination.

No hyaluronic acid was detected in COCs collected from antral follicles, while 8.40ng hyaluronic acid was demonstrated in a COC cultured for 14 hrs. The amount of hyaluronic acid in a COC cultured for 14 hrs with MU was 3.52ng, which was significantly smaller than 6.54ng in a control COC.

The mean size of perivitelline space of oocytes was significantly smaller in MU-treated COCs (4.36 μ m) than in control COCs (5.48 μ m). The fertilization rate of oocytes in MU-treated COCs after insemination (82.2%) did not differ from that in control COCs (88.6%). However, the incidence of polyspermy in oocytes was significantly higher in MU-treated COCs (37.8%) than in control COCs (16.1%).

From these results, it was suggested that hyaluronic acid secreted from COCs plays a role in enlargement of perivitelline space of mouse oocytes, and that there is a relationship between the size of perivitelline space and the incidence of polyspermy in the mouse.

Bull.Facul.Agric.Niigata Univ., 60(2):129-133, 2008

Key words : mouse, cumulus-oocyte complex, hyaluronic acid, perivitelline space, polyspermy

¹Graduate School of Science and Technology, Niigata University

²Faculty of Agriculture, Niigata University

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