

ブタ体外受精卵子の5日間の体外培養に及ぼす 卵管上皮細胞の効果

吉川 奈美・岩崎 泰造・戸津川 清

山形大学農学部生物機能調節学講座 山形県鶴岡市 〒997

要旨：ブタ体外受精卵子の発生に及ぼす卵管及び子宮の上皮細胞の影響を共培養によって検討した。共培養に使用した単層はブタの卵管膨大部及び子宮角の上皮から採取して形成させた。卵管上皮細胞と共培養した卵子の発生率は、対照区（培養液のみ）と比較すると有意に高かったが、子宮上皮細胞と共に培養した場合には、有意差は見られなかった ($P < 0.05$)。さらに卵管の膨大部、峡部及び子宮・卵管接合部それぞれの上皮の細胞から形成させた単層と卵子を共培養した。卵管の膨大部及び峡部上皮細胞と共に培養した場合の胚盤胞への発生率は、それぞれ15.3%及び15.3%であり、これらの値は、子宮・卵管接合部の上皮と共に培養したときの発生率(9.9%)及び対照区の発生率(6.7%)との間に有意差は認められなかった ($P < 0.05$)。以上の結果から、ブタにおいて卵管上皮細胞との共培養は体外受精卵の発生を促進することが明らかになった。

キーワード：ブタ体外受精卵子、共培養、卵管上皮細胞

体外受精は、人工授精、受精卵移植に続いて、現在盛んに行われている家畜生産手法の一つである。しかし、多くの哺乳動物の卵子は、体外培養するとある決まった段階で発生が停止する。マウスとハムスターでは2細胞期、ラットでは4細胞期、ヒツジとウシでは8細胞期で起こるこの現象は、体外受精法の確立を妨げる大きな原因の一つとなっており、この発生阻害を回避して胚盤胞まで発生させ得る培養系の確立が、重要な課題となっている。近年の研究では、特に、体細胞から分泌される未知の成長因子が注目されている[1-4]。そこでそれらを卵子の体外培養に利用する手段として、共培養法が盛んに試みられている[5-10]。これまでに胚由来栄養芽層細胞、卵管上皮細胞、子宮上皮細胞、卵巣由来の顆粒膜細胞など、種々の体細胞と卵子との共培養が、マ

ウス[5]、ヒツジ[6]、ウシ[7-10]で報告されている。

しかしながら、ブタに関する研究報告は他の動物に比べて非常に少なく[11-13]、その研究は大きく遅れている。ブタ受精卵子の体外発生における最大の障害は、4細胞期に生じる発生阻害であり、特に体外受精卵子を4 cell ブロックを越えて胚盤胞まで発生させることは極めて困難である。そこで、体外受精卵子の体外発生に関する検討がいくつか試みられている[14-18]。すなわち、Archibongら[15]は、1~2細胞期のブタ受精卵子の体外培養において、ブタ卵管液の添加が胚盤胞への発生率を高めることを報告した。また著者ら[18]は、成熟培養においてブタ卵胞液を、発生培養においてブタ卵管灌流液をそれぞれ培養液へ添加すると、ブタ体外受精卵子の胚盤胞への発生率が高まることを明らかにした。さらにWhiteら[16]は2~16細胞期胚の発生における卵管上皮細胞との共培養の効果を確認した。これらのことから、卵管液には胚の発生を促進する物質が含まれ、それは卵管上皮細胞から分泌されることが推察できる。しかし、体外受精卵子と卵管上皮細胞との共培養についての報告はみられず、体外受精卵子の発生に及ぼす卵管上皮細胞の影響は、いまだに不明である。

そこで本研究では、ブタ体外受精卵子の体外培養において、より高率に胚盤胞まで発生させ得る培養系を確立するために、ブタの卵管及び子宮の上皮細胞と体外受精卵子との共培養を試みた。

材料および方法

体外受精：卵胞内卵子は、屠場で入手した未経産雌ブタ卵巣の直径5 mm以下の卵胞から吸引採取し、PBS(Nissui)で3回洗浄し、細胞質が形態的に均一で卵丘細胞が緊密に付着した卵丘細胞複合体のみを選抜した。これらの卵子を成熟させるために、10% FCSを添加した修正TCM199液(pH 7.6)200 μ l当たり10~15個の卵子を投入し、5% CO₂、95% Air、38.5°Cで48~50時間

(受付 1994年8月22日／受理 1995年1月4日)

別刷請求先：〒997 鶴岡市若葉町1-23

山形大学農学部生物生産学科

培養した。精液は射出濃厚部精液を用い、PBSで3回洗浄した後、カフェイン0.4 µg/ml、10% FCSを添加した修正TCM199液(pH 7.4)で 2×10^7 cells/mlになるように希釈した。この精子浮遊液は、37°Cで4~5時間前培養した。媒精は、成熟させた卵子を含む10% FCSを添加した修正TCM199培地(pH 7.6)に前培養した精子を導入し、6~7時間培養して行った。なお、最終精子濃度は 2×10^6 cells/mlであった。

卵管及び子宮上皮細胞との共培養:共培養に用いた細胞は、ブタの卵管膨大部及び子宮角の上皮から採取した。卵管及び子宮は、3~4 cmの長さに切り取って切開した後、上皮細胞を削り取り、修正TCM199で5回洗浄した。細胞は、卵管あるいは子宮一本当たり2.5 mlの修正TCM199で希釈した。この細胞懸濁液を5% CO₂、95% Air、38.5°Cで3~5日間培養し、単層を形成させた。培養後、体外受精卵子はこれらの単層上で、10% FCSを含む修正TCM199培地において5日間培養した。なお、対照区として10% FCSを含む修正TCM199培地のみで培養した卵子を用いた。

卵管各部上皮細胞との共培養:ブタ卵管を卵管膨大部、卵管峡部、及び子宮・卵管接合部3つの部位に分類し、それぞれの上皮細胞から単層を形成させた後、ブタの体外受精卵子をこれら細胞の単層の上で培養し、胚盤胞への発生率を比較した。対照区には10% FCSを含む修正TCM199培地を用いた。

卵子の発生率の評価:卵子は発生培地に移し替えた

後、12時間毎に観察を行った。最終的に、5日目の発生段階を評価の対象とした。

統計処理:統計処理は χ^2 -testによって行った。

結果

共培養の効果:ブタの卵管上皮細胞及び子宮上皮細胞との共培養が、ブタ体外受精卵子の発生率に及ぼす影響を検討した結果をTable 1に示した。卵管及び子宮上皮細胞との共培養における体外受精卵の2細胞期への発生率は、それぞれ49.4と46.6%であり、上皮細胞を含まない修正TCM199培地のみで培養した対照区のもの(35.5%)に比べ有意に高かった($P<0.05$)。また、卵管上皮細胞との共培養における胚盤胞期への発生率は16.9%であり、子宮上皮細胞と共に培養したもの(9.2%)及び対照区のもの(6.6%)と比べて有意に高かった($P<0.05$)。

卵管各部の影響:卵管の膨大部上皮細胞と峡部上皮細胞及び子宮・卵管接合部上皮細胞との共培養が、ブタ体外受精卵子の発生に及ぼす効果を比較した結果をTable 2に示した。膨大部及び峡部との共培養における胚盤胞への発生率は、ともに15.3%であり、対照区のもの(6.7%)に比べて有意に高かった($P<0.05$)。一方、子宮・卵管接合部上皮細胞との共培養においても、胚盤胞への発生率は対照区のものに比べ高かったが、その差は有意なものではなかった。

Table 1. Developmental rate of porcine IVM/IVF embryos co-cultured for 5 days with the epithelial cells from porcine oviducts or uteri

Epithelial prepared from	No. of embryos cultured	No. (%) of embryos developed to			
		2-cell	4-cell	8-cell	Blastocyst
Oviduct	178	88 (49.4) ^{a*}	81 (45.5) ^a	69 (38.8) ^a	30 (16.9) ^a
Uterus	163	76 (46.6) ^a	69 (42.3) ^{ab}	48 (29.4) ^{ab}	15 (9.2) ^b
None(control)	228	81 (35.5) ^b	70 (30.7) ^b	59 (25.9) ^b	15 (6.6) ^b

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

Table 2. Developmental rate of porcine IVM/IVF embryos co-cultured for 5 days with the epithelial cells from porcine ampulla, isthmus or utero-tubal junction

Epithelial prepared from	No. of embryos cultured	No. (%) of embryos developed to			
		2-cell	4-cell	8-cell	Blastocyst
Ampulla	163	88 (54.0)	79 (48.5)	68 (41.7)	25 (15.3) ^{a*}
Isthmus	150	78 (52.0)	70 (46.7)	64 (42.7)	23 (15.3) ^a
Utero-tubal junction	142	68 (47.9)	56 (39.4)	46 (32.4)	14 (9.9) ^b
None (control)	150	65 (43.3)	57 (38.0)	49 (32.7)	10 (6.7) ^b

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

考 察

一般に、初期胚の発生培養にはFCSを添加した培養液が用いられているが、それは血清中には既知の蛋白質やアミノ酸、ホルモンの他に未知の成長因子やホルモン様物質が存在し、これらが胚の発生を促進すると考えられているためである[1-4]。しかし、FCSは製造時のロット間の変動が大きく、培養に用いる場合に大きな問題になっていることは否定できない。そのため胚の発生促進因子を追求し、無血清培養系の確立が今後の重要な課題であると思われる。すでにTakagiら[19]が、ウシ体外受精卵子を用いて、成長因子添加培地において胚盤胞へ発生させることに成功しており、無血清培養の可能性を示唆している。

一方体外培養において、胚発生を促進させる手段として、他の動物の卵管に仮移植する方法[20-24]や、卵管上皮細胞などの体細胞と共に培養する方法[5-13, 16]が用いられている。これらの研究から、胚の発生率を上昇させるには発生環境を卵管のものと近づけることが有効であると考えられる。ブタ胚の体外培養における卵管上皮細胞との共培養の効果についてはWhiteら[16]が2ないし16細胞期の胚を用いて確かめているが、体外受精卵子の発生に及ぼす卵管上皮細胞あるいは子宮上皮細胞との共培養の効果については、調べられていない。

本実験において、ブタ体外受精卵子の発生に及ぼす卵管及び子宮の上皮細胞との共培養の影響を調べたところ、子宮上皮細胞との共培養は胚盤胞への発生率を上昇させなかつたが、卵管膨大部及び卵管峡部の上皮との共培養は発生率を有意に上昇させた。一方、Weberら[26]はウマ受精卵子の体外培養において、子宮上皮との共培養は発生を促進させることを確かめており、本実験の子宮上皮を用いた結果とは異なっている。この相違の理由については明かではないが、受精卵子の発生に及ぼす卵管及び子宮の上皮細胞の影響は種によって異なるのか、あるいは、ブタでは受精卵子の発生に卵管要因を特に必要としていることも考えられた。また、子宮・卵管接合部の上皮細胞は受精卵子の発生に効果を及ぼさなかつたが、卵管上皮細胞の発生に及ぼす効果は、膨大部と峡部の間で相違のないことが確かめられた。子宮・卵管接合部の上皮細胞がブタ体外受精卵子の発生に効果が見られなかつたのは、この部分の上皮細胞が子宮のものと似た性質を示しているためか、あるいは、この部位から採取できた細胞の数が少なかつたことによると思われた。

本実験の結果から、卵管の膨大部と峡部の上皮細胞から卵子の発生促進因子が分泌されている可能性が考えら

れる。Kobayashiら[27]が、ウシの顆粒膜細胞から分泌される発生促進因子を同定しているが、ブタ卵管液中の発生促進因子の同定も早急に求められる。

文 献

- Hoshi, H., Takagi, Y., Kobayashi, K., Onodera, M. and Oikawa, T. (1991): Growth and function of bovine granulosa cells cultured in a serum-free medium. In: Animal Cell Culture and Producing of Biologicals (Sasaki, R. and Ikura, K., eds.), pp. 213-219, Kluwer Academic Publishers.
- Flood, M. R., Gage, T. L. and Bunch, T. D. (1993): Effect of various growth-promoting factors on preimplantation bovine embryo development *in vitro*. Theriogenology, 39, 823-833.
- Simmen, R. C. M., Ko, Y. and Simmen, F. A. (1993): Insulin-like growth factors and blastocyst development. Theriogenology, 39, 163-175.
- Yang, B. K., Yang, X. and Foote, R. H. (1993): Effect of growth factors on morula and blastocyst development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine oocytes. Theriogenology, 40, 521-530.
- Sakkas, D. and Trounson, A. O. (1990): Co-culture of mouse embryos with oviduct and uterine cells prepared from mice at different days of pseudopregnancy. J. Reprod. Fert., 90, 109-118.
- Gandolfi, F. and Moor, R. M. (1987): Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. J. Reprod. Fert., 81, 23-28.
- Eyestone, W. H. and First, N. L. (1989): Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or in conditioned medium. J. Reprod. Fert., 715-720.
- Heyman, Y., Menezo, Y., Chesne, P., Camous, S. and Garnier, V. (1987): *In vitro* cleavage of bovine and ovine early embryos: improved development using coculture with trophoblastic vesicles. Theriogenology, 27, 59-68.
- Goto, K., Kajihara, M., Kosaka, S., Koba, M., Nakanishi, Y. and Ogawa, K. (1988): Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes. J. Reprod. Fert., 83, 753-758.
- Durnford, R., Stubbings, R. B. and Ainsworth, L. (1994): Evaluation of culture systems containing bovine oviduct epithelial cells or granulosa cells to mature and maintain the developmental competence of bovine oocytes *in vitro*. Theriogenology, 42, 261-272.
- Reed, M. L., Illera, M. J. and Petters, R. M. (1992): *In vitro* culture of pig embryos. Theriogenology, 37, 95-109.
- Yoshida, M., Mizoguchi, Y., Ishigaki, K., Kojima, T. and Nagai, T. (1993): Birth of piglets derived from *in vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vitro*.

- Theriogenology, 39, 1303–1311.
- 13) Funahashi, H., Stumpf, T. T., Terlouw, S. L., Cantley, T. C., Rieke, A. and Day, B. N. (1994): Developmental ability of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. Theriogenology, 41, 1425–1433.
- 14) Lees, H. J. (1988): The formation and function of oviduct fluid. *J. Reprod. Fert.*, 82, 843–856.
- 15) Archibong, A. E., Petters, R. M. and Johnson, B. H. (1989): Development of porcine embryos from one- and two-cell stages to blastocysts in culture medium supplemented with porcine oviductal fluid. *Biol. Reprod.*, 41, 1076–1083.
- 16) White, K. L., Hehnke, K., Rickards, L. F., Southern, L. L., Thompson, D. L. Jr. and Wood, T. C. (1989): Early embryonic development *in vitro* by coculture with oviductal epithelial cells in pigs. *Biol. Reprod.*, 41, 425–430.
- 17) Nagai, T. and Moor, R. M. (1990): Effect of oviduct cells on the incidence of poly-spermy in pig eggs fertilized *in vitro*. *Molec. Reprod. Develop.*, 26, 377–382.
- 18) 戸津川清・今千賀子・斎藤英文(1992): 豚体外受精卵の発生に及ぼす豚血清、卵胞液及び卵管灌流液の影響。哺乳動物卵子学会誌, 9, 61–62。
- 19) Takagi, Y., Mori, K., Tomizawa, M., Takahashi, T., Sugawara, S. and Masaki, J. (1991): Development of bovine oocytes matured, fertilized and cultured in a serum-free, chemically defined medium. Theriogenology, 35, 1197–1207.
- 20) Lawson, R. A. S., Rowson, L. E. A. and Adams, C. E. (1972): The development of cow eggs in rabbit ovi-
- duct and their viability after retransfer to heifers. *J. Reprod. Fert.*, 30, 489–492.
- 21) Boland, M. P. (1984): Use of the rabbit oviduct as a screening tool for the viability of mammalian eggs. Theriogenology, 21, 126–137.
- 22) Sirard, M. A. and Lambert, R. D. (1985): *In vitro* fertilization of bovine follicular oocytes obtained by laparoscopy. *Biol. Reprod.*, 33, 487–494.
- 23) Willadsen, S. M. and Polge, C. (1981): Attempts to produce monozygotic quadruplets in cattle by blastomere separation. *Vet. Record*, 108, 211–213.
- 24) Eyestone, W. H., Leibfried-Rutledge, M. L., Norty, D. L., Gilligan, B. G. and First, N. L. (1987): Culture of one- and two-cell bovine embryos to the blastocyst stage in the ovine oviduct. Theriogenology, 28, 1–7.
- 25) Ellington, J. E., Carney, E. W., Farrell, P. B., Simkin, M. E. and Foote, R. H. (1990): Bovine 1–2-cell embryo development using a simple medium in three oviduct epithelial cell coculture systems. *Biol. Reprod.*, 43, 97–104.
- 26) Weber, J. A., Woods, G. L., Freeman, D. A. and Vanderwell, D. K. (1993): Oviductal and uterine influence on the development of day-2 equine embryos *in vivo* and *in vitro*. Theriogenology, 40, 689–698.
- 27) Kobayashi, K., Takagi, Y., Satoh, T., Hoshi, H. and Oikawa, T. (1992): Development of early bovine embryos to the blastocyst stage in serum-free conditioned medium from bovine granulosa cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 28A, 255–259.

Effect of Oviductal Epithelial Cells on In Vitro Cultured for 5 Days of Porcine IVF Embryos

Nami Yoshikawa, Taizo Iwasaki and Kiyoshi Totsukawa

Section of Bioprocess Engineering, Faculty of Agriculture, Yamagata University,
Tsuruoka, Yamagata 997, Japan

The objective of this experiment was to examine the effect of co-culture with epithelial cells on development of porcine IVF embryos. Monolayers of epithelial cells for the co-culture were prepared from porcine oviducts or uteri. The developmental rates to the blastocysts stage were significantly higher ($P<0.05$) in the embryos co-cultured with epithelial cells from oviducts (16.9%) than in the embryos cultured without epithelial cells (control; 6.6%). However, the developmental rates to the blastocysts stage were not significantly higher ($P<0.05$) in the embryos co-cultured with epithelial cells from uteri (9.2%) than the control. The effects of ampulla, isthmus

and utero-tubal junction on development of porcine IVF embryos were examined. The developmental rates to the blastocysts stage were significantly higher ($P<0.05$) in the embryos co-cultured with epithelial cells from ampulla (15.3%) and isthmus (15.3%) than in the embryos co-cultured with epithelial cells from utero-tubal junction (9.9%) and control (6.7%). These results suggest that the co-culture system with oviductal epithelial cells supports the development of porcine IVF embryos to blastocysts *in vitro*.

Key words: Porcine IVF embryo, Co-culture, Oviductal epithelial cell.