

ウシ核移植卵の体外発生能に及ぼす β -メルカプトエタノールの影響

大越 勝広¹・新田 良平^{1,2}・高野 博³・加藤 容子¹・角田 幸雄¹

¹近畿大学農学部 奈良県 〒631

²現所属：丸紅飼料株式会社技術センター 兵庫県

³奈良県畜産試験場 奈良県 〒633-21

要旨：体外受精卵をTCM199中で卵丘細胞とともに117時間共培養を行い、得られた8~16細胞期胚を2群に分けた。一方は対照群として、さらに5日間、TCM199中で卵丘細胞とともに共培養を行うか、あるいは共培養を行わずに10 μ M β -メルカプトエタノール(β -ME)を添加した培地を用いて培養し、胚盤胞への発育を調べた。他方は、核移植のドナー割球として用いた。核移植卵は、卵丘細胞とともにTCM199で共培養を行った。得られた8~16細胞期胚は2群に分けて、対照群の胚と同じように卵丘細胞と共に培養を行うか、あるいは共培養を行わずに β -ME添加培地を用いて培養し、胚盤胞への発育を調べた。その結果、対照群の8~16細胞期胚でも核移植由来の胚でも、 β -ME無添加の共培養と β -MEを添加した非共培養における胚盤胞への発育率に差異はなかった。しかし、どちらの培養系でも核移植胚の胚盤胞への発育率は、対照胚の発育率に比べて有意に低かった。

キーワード：核移植、ウシ受精卵、共培養、 β -メルカプトエタノール。

核移植卵を他の細胞と共に培養すると、培養日数が長くなるにつれて共培養細胞によって圧迫されて胚の一部が透明帯外へとび出し正常な発生が阻害される場合のあることや、成長因子などの影響を検討する際、正確な判断が困難であることから、非共培養系の確立が必要と考えられる。最近、Takahashi *et al.* [9] は、卵丘細胞との共培養で得られた体外受精由来6~8細胞期ウシ胚をチオール化合物である β -メルカプトエタノール(β -ME)を添加した非共培養培地で体外培養すると、共培養を継続した場合と同程度に胚盤胞へ発生することを明らかにした。また、2細胞期で β -ME添加非共培養培地へ移して培養すると、胚盤胞への発生率が低いことも知られている[10]。そこで、本実験は β -ME添加培地を用いて、非共培養条件下で核移植由来の8~16細胞期胚の体外培養が可能か否かを検討することを目的に実施した。

材料及び方法

1. 体外受精とドナー割球の作出

卵巢から採取した卵胞卵子を5%子牛血清(CS)添加TCM199液(Earle塩、Gibco)で22時間成熟培養後、3時間前培養を行った精子浮遊液(1×10⁷/ml)に5時間移して体外受精を行った[4]。ついで、10 μ lの卵丘細胞を含む5%CS加TCM199液へ移して117時間目まで培養し、8~16細胞期へ発育させた。一部の胚は、核移植に用いるため0.5%プロナーゼ加PBS液[11]へ移して透明帯を溶解後、ピベッティング操作をくり返して单一割球とした。

2. レシピエント卵子

卵胞卵子を22~24時間体外で成熟培養し、ヒアルロニダーゼ添加M2液[12](300IU/ml)で卵丘細胞を除去した。ついで、既報[5,7]に従って透明帯の一部に切

(受付 1995年2月6日／受理 1995年4月22日)

別刷請求先：〒631 奈良市中町3327-204

近畿大学農学部 角田幸雄

り込みを入れ、第2減数分裂中期染色体を第1極体とともに除去した。染色体除去後、5% CS 加 TCM199 液へ戻して成熟培養開始後33時間目 [13] までさらに培養後、単為発生刺激をあたえた。すなわち、除核卵子を Zimmerman 細胞融合液 [14] に浸して10分間平衡させた。ついで、スライドガラス上に2本のワイヤーを1mm幅で設置した融合チャンバーに融合液を満たし、そこへ卵子を移した後100V/mm, 50μsecの直流パルスを1秒間隔で2回通電した(島津製細胞融合装置SSH-1)。電気刺激後、既報[5,7]に従ってドナー割球1個を除核卵子の卵腔に注入し、5% CS 加 TCM199 液に戻して体外成熟培養開始後42時間 [13] に相当する時期までさらに培養した。なお、染色体除去ならびに電気刺激から割球の注入終了には、それぞれ3~4時間ならびに2~3時間を要したが、これらは培養時間に含めた。

3. ドナー割球とレシピエント卵子との膜融合

膜融合は、レシピエント卵子の成熟培養開始後42時間目に相当する時期に実施した。すなわち、操作卵を Zimmerman 液を満たした2本のワイヤー電極の間に、ガラスピベットを用いてドナー割球とレシピエント卵子の細胞膜接着面が電極と平行となるように静置した。ついで、100V/mm, 50μsecの直流パルスを1秒間隔で2回与えた。電気刺激後、サイトカラシンB(7.5μl/ml)を含む5% CS 加 TCM199 液で1時間培養後、融合の確認された卵子のみを卵丘細胞を含む10μlの発生培地 [4] に4~5個ずつ移した。

4. β-メルカプトエタノールの影響

対照群として用いた体外受精卵の場合は、卵丘細胞と117時間共培養後8~16細胞期へ発育している胚を、ヒアルロニダーゼ添加M2液中でピペッティングをくり返して卵丘細胞を完全に除去した。ついで、数回5% CS 加

TCM199 液に移しかえた後、10μMβ-メルカプトエタノールを添加した5% CS 加 TCM199 液へ移して5日間非共培養下で体外培養を行った。

核移植卵の場合は、卵丘細胞と共に培養後72時間目の検査で8~16細胞期へ発育している胚を用いて、体外受精卵の場合と同様に10μM β-ME 添加培地で7日間体外培養を行った。

なお、いずれの場合も、一旦周りに付着する卵丘細胞を除去したのち、卵丘細胞を含む同一の発生培地へ再び戻してさらに5または7日共培養を行う区を設けて、β-ME 添加区の胚盤胞への発育率と比較した。

また、得られた結果は、 χ^2 検定で有意差の有無を検査した。なお、体外成熟培養および体外受精卵ならびに核移植卵の培養はすべて5% CO₂, 95% 空気, 38.5°Cの条件で実施した。

結 果

本実験における体外受精卵の8~16細胞期への発生率は37% (108/295) であった。これらの胚を10μM β-ME 添加培地で培養したところ47%が胚盤胞期へ達し、これは共培養を継続した場合の発生率37%と大差がみられなかった(Table 1)。

また、本実験系におけるドナー割球と除核卵細胞質の融合率は74% (230/314) であり、このうち32% (74/230) が8~16細胞期へ発育した。Table 1に示すように、これらの核移植胚を非共培養下のβ-ME 添加培地へ移したところ胚盤胞への発生率は24%と共培養区(16%)に比べて有意差がみられなかった。

しかしながら、β-ME 添加非共培養区、無添加共培養継続区のいずれにおいても体外受精卵の発生率は、核移植卵の発生率に比べて有意($P<0.05$)に高かった(37%対16%, 47%対24%)。

Table 1. Effect of β -mercaptoethanol (β -ME) on the *in vitro* development of *in vitro* fertilized and nuclear transferred 8- to 16-cell stage bovine embryos

Group	with (+) or without (-) 10 μM β-ME	No. of 8 to 16-cell stage embryos cultured	No. of embryos developed to blastocysts (%)
<i>In vitro</i> fertilization	—	43	16 (37)
	+	45	21 (47)
Nuclear transfer	—	37	6 (16)
	+	37	9 (24)

The embryos were cultured with cumulus cells and without (-) β-ME or cultured without cumulus cells and with (+) β-ME.

考 察

本実験結果から、卵丘細胞との共培養下で8~16細胞期へ発育した核移植胚を β -ME添加培地へ移して非共培養下で培養すると、体外受精胚と同様に共培養下で培養を継続した場合と同程度の割合で胚盤胞へ発生することが判明した。非共培養下でウシ体外受精卵を体外培養すると8細胞期で発生が停止する[1]が、Takahashi *et al.* [9]は10~50 μ M β -ME添加培地で6~8細胞期胚を培養すると、その24~35%が胚盤胞へ発生すること、またこの効果は細胞質内のグルタチオン濃度の上昇と関係していることを報告した。体外受精由来の8~16細胞期胚の核を除核未受精卵へ核移植して“初期化”した核移植卵を用いた本実験でも、この効果が確認された。

本実験におけるドナー核と除核卵細胞質の融合率(74%)および核移植卵の8~16細胞期への発育率(32%)を計算に入れると、核移植に供試した除核卵子のうち、わずか5.7%しか胚盤胞へは発育しなかったことになる。また、核移植胚における8~16細胞期から胚盤胞への発育率は、対照とした体外受精由来8~16細胞期胚の胚盤胞への発育率に比べると、共培養でも β -MEを添加した非共培養でも有意に低い割合であった。したがって、核移植によるクローンウシ作出技術を実用化するためには、それぞれのステップごとの成功率を高めるとともに、核と細胞質との相互関係を解明することによって“正常胚”を複製するための核移植系を確立する必要があると考えられる。また、本実験で得られた核移植卵由来の胚盤胞が個体へ発生する能力を有するか否か、今後検討する必要があると思われる。

謝 辞

卵巢の採取にご協力頂いた奈良県食品衛生検査所の先生方ならびに凍結精液(KBS-38)を御供与頂いた小岩井農牧株式会社技術センターに深謝いたします。また、本研究の一部は、文部省科学研究費(05556050)、農林水産省先端技術シーズ培養研究助成金、農林水産省総合開発研究(繁殖技術)、伊藤記念財団研究助成金ならびに森永奉仕会研究奨励金によりおこなわれた。

文 献

- 1) Barnes, F.L. and First, N.L. (1991): Embryonic transcription in *in vitro* cultured bovine embryos. Mol. Reprod. Dev., 29, 117~123.
- 2) 福田芳詔(1992)：共培養によるウシ初期胚の発生—卵丘細胞との共培養—。家畜繁殖誌, 38, 157~164.
- 3) 梶原 豊・後藤和文・小坂昭三・中西喜彦・小川清彦(1987)：牛卵胞卵子の体外受精および体外培養によるふ化。家畜繁殖誌, 33, 173~180.
- 4) 新田良平・加藤容子・角田幸雄(1993)：牛体外受精卵の発生率に及ぼす培養液量と培養卵数の影響。日畜会報, 64, 904~908.
- 5) 加藤容子・新田良平・高野 博・角田幸雄(1993)：ウシ核移植卵の体外発生能に及ぼす融合時期ならびに培養液の影響。日畜会報, 64, 484~490.
- 6) 高野 博・新田良平・加藤容子・角田幸雄(1991)：核移植実験系における電気刺激時の温度条件の検討。繁殖技術会誌, 13, 15~19.
- 7) Takano, H., Koyama, K., Kozai, C., Kato, Y. and Tsunoda, Y. (1993): Effect of aging of recipient oocytes on the development of bovine nuclear transfer embryos *in vitro*. Theriogenology, 39, 909~917.
- 8) Yang, X., Jing, S., Farrell, P., Foote, R.H. and McGrath, A.B. (1993): Nuclear transfer in cattle: effect of nuclear donor cells cytoplasm age, co-culture and embryo transfer. Mol. Reprod. Dev., 35, 29~39.
- 9) Takahashi, M., Nagai, T., Hamano, S., Kuwayama, M., Okamura, N. and Okano, A. (1993): Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine embryos. Biol. Reprod., 49, 228~232.
- 10) Hamano, S., Kuwayama, M., Takahashi, M., Okamura, N., Okano, A. and Nagai, T. (1994): Effect of β -mercaptoethanol on the preimplantation development of bovine embryos fertilized *in vitro*. J. Reprod. Dev., 40, 355~359.
- 11) Dulbecco, R. and Volt, M. (1954): Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. J. Exp. Med., 99, 167 (abst).
- 12) Fulton, B.P. and Whittingham, D.G. (1978): Activation of mammalian oocytes by intracellular injection of calcium. Nature, 273, 149~151.
- 13) Kono, T., Sotomaru, Y., Aono, F., Takahashi, T., Ogihara, K., Sekizawa, T., Arai, T. and Nakahara, T. (1994): Effect of ooplast activation on the development of oocytes following nucleus transfer in cattle. Theriogenology, 41, 1463~1471.
- 14) Wolfe, B.A. and Kraemer, D.C. (1992): Methods in bovine nuclear transfer. Theriogenology, 37, 5~15.

Effects of β -Mercaptoethanol on the Developmental Ability of Bovine Nuclear Transferred Eggs In Vitro

Katsuhiro OHKOSHI¹, Ryohei NITTA^{1,2}, Hiroshi TAKANO³,
Yoko KATO¹ and Yukio TSUNODA¹

¹Laboratory of Animal Reproduction, College of Agriculture, Kinki University, Nara 631,

²Present address; Marubeni Feed Co., Ltd., and

³Nara Prefectural Livestock Experimental Station, Nara 633-21, Japan

Abstract: *In vitro* fertilized 8–16-cell stage embryos, co-cultured with cumulus cells for 117 hours, were divided into two groups. Embryos in one group (control group) were further co-cultured with cumulus cells or cultured in TCM199 supplemented with 10 μ M β -mercaptoproethanol (β -ME). Embryos in the other group were used as donor nuclei for nuclear transfer. The nuclear transferred eggs were co-cultured with cumulus cells to the 8–16-cell stage. They were divided into two; half of them were further co-cultured with cumulus cells and the others were cultured in TCM199 supplemented with β -ME to the bla-

stocyst stage as control group. The proportions of embryos which developed to blastocysts in β -ME supplemented medium in both groups were not significantly different from those obtained in the co-culture system. However, the proportions of nuclear transferred eggs which developed to blastocysts in both groups were significantly different from those obtained in *in vitro* fertilized eggs.

Key words: Nuclear transfer, Bovine eggs, Co-culture, β -mercaptoproethanol.