

## 培養ウシ卵管上皮細胞における中間径フィラメントの発現と胚発生支持能

下澤 律浩<sup>1</sup>・河野 友宏<sup>1</sup>・小野寺 政一<sup>2</sup>  
青野 文仁<sup>3</sup>・平井 八十一<sup>4</sup>・中原 達夫<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東京農業大学総合研究所 東京都世田谷区 〒156

<sup>2</sup>麻布大学獣医学部 相模原市 〒229

<sup>3</sup>協同飼料株式会社 横浜市保土ヶ谷区 〒240

<sup>4</sup>東京農業大学農学部 東京都世田谷区 〒156

**要旨:**本実験は、初代培養、継代培養および継代凍結保存ウシ卵管上皮細胞の中間径フィラメントの変化を明らかにし、初代培養細胞および継代凍結保存細胞の胚発生支持能を検討するために実施した。ウシ卵管より単離し、培養された細胞の形態的変化は、継代凍結保存細胞を含め、継代5代目まで観察されなかった。また、間接免疫蛍光染色法の結果より、初代培養細胞では、抗サイトケラチン抗体の蛍光が検出されるが、抗ビメンチン抗体および抗デスミン抗体の蛍光が検出されないことから、これらの細胞は上皮細胞であることが強く示唆された。しかし、2代目以降の細胞で、ビメンチンの反応も検出されたため上皮細胞の性質は変化したことが示唆された。ウシ卵管上皮細胞の発生支持能を、ウシ単為発生胚との共培養によって検討した結果、胚盤胞までの発生率は初代および継代凍結保存ウシ卵管上皮細胞を用いた場合、それぞれ29.8%および28.3%であり、両区の間に有意差のないことが示された。このことから、ビメンチンの発現とウシ単為発生胚の発生支持能は無関係であることが推察された。

**キーワード:**ウシ、卵管上皮細胞、中間径フィラメント、共培養、単為発生胚。

ウシ体外受精卵を、卵管上皮細胞 [1, 2]、卵丘細胞 [3]、栄養芽細胞 [4] あるいは子宮上皮細胞 [5] などの体細胞と共に培養することで、発生阻害を克服し胚盤胞までの発生を向上できることが報告された。しかし、共培養に用いられる細胞と初期胚との間における発生の有効性の優劣は明確にされておらず、共培養に用いられる細

胞の種類は様々である。一方、卵管は、配偶子移送、成熟、受精並びに初期胚発生などにとって最適な環境を作り出しており、生殖における重要な役割を担っている器官である。このため、卵管内には、胚の発生を促進する何らかの要因が存在するものと考えられる。完全体外培養系が確立していないウシ胚において、卵管上皮細胞の共培養細胞としての有効性が検討された結果、ウシ卵管上皮細胞との共培養 [1, 2, 6-8] および卵管上皮細胞を用いて調整された培養上清液 [1, 2, 6, 8] が、ウシ胚の体外発生を向上させることができた。また、ウシ卵管上皮の初代培養細胞と凍結保存細胞とではウシ胚の胚盤胞への発生率では同様な支持能を持つことが報告された [8]。しかし、これらの単離された細胞が上皮細胞であるかは確かめられていない。

卵管上皮細胞を単離する方法としては、卵管の内壁を剥離する方法 [1] が行われていたが、単離した細胞群の中に上皮細胞以外の細胞の混入を防ぐことは困難である。一般的に、上皮細胞は、細胞骨格系の1つである中間径フィラメントがサイトケラチンで構成されており [9, 10]、また、間葉系由来の細胞および筋細胞特有の中間径フィラメントは、それぞれビメンチン [11] およびデスミン [12] で構成されている。この性質を利用して卵管から採取した細胞の同定が試みられている。Ouhibi ら [13] は、仔ウシ卵管から単離した細胞の中間径フィラメントを間接免疫蛍光染色法により検出した結果、抗サイトケラチン抗体との反応を認めたが、その他の抗体での検討は行っていない。さらに、Hoshi ら [14] は、継代培養5代目の細胞において中間径フィラメントを検出した結果、抗サイトケラチン抗体および抗ビメンチン抗体との反応が認められたことを報告している。また、小

(受付 1995年7月3日／受理 1995年8月9日)

別刷請求先: 〒156 東京都世田谷区桜丘1-1-1

東京農業大学総合研究所 河野友宏

野寺と及川〔未発表〕は、in situ でウシ卵管の断片を酵素抗体法により染色した結果、上皮細胞において抗サイトケラチン抗体の反応が認められたが、抗ビメンチン抗体の反応は認められないと述べている。

一方、ウシ体外受精卵の in vitro における発生は、一般的に胚盤胞への発生率が 30% 程と低いことに加え、卵子および精子のドナー個体により著しく異なることが、培養系の検定を困難にしている。最近、ウシ未受精卵を高率に胚盤胞まで発生させる単為発生誘起法が報告されたことから [15]、精子側要因の排除したウシ単為発生卵を利用した体外培養系の検定が可能であるものと考えられた。

そこで本実験では、ウシ胚の体外培養系を生体内環境に近づけることが重要であると考えられるため、ウシ卵管上皮細胞の胚発生に対する有効性を明らかにすることを目的に、1) 初代培養細胞、継代培養細胞および凍結保存細胞の中間径フィラメントを間接免疫蛍光染色法により検出し、細胞性状を明かにし、2) ウシ単為発生胚を初代培養細胞あるいは凍結保存細胞と共に培養することで、両者の胚発生支持能を比較検討した。

## 材料および方法

### 卵管上皮細胞の単離、培養および凍結

**単離：**細胞の単離および培養は、Joshi [16] および小野寺ら [17] の方法に準じて行った。食肉市場でホルスタインウシ 4 個体から採取した 4 本の卵管 (A~D) を氷温中に保存して、研究室に輸送した。卵管は、滅菌紙上で、付着している脂肪や結合組織等を切除し、70% エタノールに 2~3 秒浸漬した後、MSS 液 [17] に 2 回浸し外側を洗浄した。次いで、卵管膨大部分側を結紩し、子宮角側から 20 G の注射針を接続した注射筒で、10 mM HEPES (Gibco) 添加 Hanks 液 (日本製薬) に 0.1% コラゲナーゼ (和光純薬) を加えた溶液を卵管内に注入し、鉗子で子宮角側をはさみ、39°C、5% CO<sub>2</sub>、95% Air の培養器内に 1 時間静置した。次に、卵管内を MSS 液で灌流して、細胞懸濁液を遠沈管に得た。この細胞懸濁液を 1,500 rpm、5 分間遠心分離し、上清を吸引除去した。続いて、細胞塊を MSS 液で洗浄後、5% ウシ胎仔血清 (Gibco) および 10 ng/ml 上皮成長因子 (湧永製薬) を添加した上皮細胞培養用培地 (DMEM/F12, 1:1; Sigma) に antibiotic-antimycotic (ペニシリン 100 unit/ml, ストレプトマイシン 100 µg/ml およびアンフォテリシン B 25 µg/ml 初代培養時のみ添加; Gibco) を添加したもので、再洗浄した。

**培養：**予め I 型コラーゲン (10 µg/ml; フナコシ) で 1 時間コーティングした 25 cm<sup>2</sup> 細胞培養用フラスコに、採

取した卵管細胞の 1/5 量を播き、5 ml の培養液にて、39°C、5% CO<sub>2</sub>、95% Air の培養器内で培養した。培地交換は培養開始後 4 日目に行い、以降は 2 日毎に行った。細胞がフラスコ底面を満たすコンフルエントの状態を呈したときに、MSS 液で洗浄し、次いで 0.025% XII-S 型トリプシン (Sigma)-0.02% EDTA 溶液で 15 分処理して、細胞を剥離、分散させた。回収した細胞は洗浄後、血球計算盤にて細胞数を計数し、0.2 × 10<sup>5</sup> 個/ml になるように上皮細胞培養用培地で調整し、25 cm<sup>2</sup> 培養用フラスコに 5 ml 注入して継代培養した。

**凍結保存：**細胞を DMEM/F12, 1:1 液、ウシ胎仔血清およびジメチルスルホキシド (Sigma) の 8:1:1 液中に懸濁し、-80°C の冷凍庫内に静置して行った。融解は 37°C の温湯を行った。

### 中間径フィラメントの間接免疫蛍光染色法

初代培養、継代培養および凍結保存細胞を 4 穴のチャンバー (Lab-Tek chamberslide; Nunc) に播き、既述の方法で培養を行った。各チャンバー底面の 70% 以上を細胞が占めた時点で、培養液を除去し、MSS 液で洗浄後、-20°C のアセトンにより 5 分間浸漬、固定した。次いで、抗サイトケラチンモノクローナル抗体 (PKK-2; Labsystems)、抗ビメンチンモノクローナル抗体 (clone V9; Boehringer Mannheim) および抗デスマシンモノクローナル抗体 (Boehringer Mannheim) の 3 種の抗体をリン酸緩衝液 (PBS) で、それぞれ 20 倍、50 倍および 50 倍に希釈し、これらを 1 次抗体とした。チャンバーの各穴をそれぞれ 1 種の抗体溶液で満たし、20 分間培養器内に静置した。洗浄は、チャンバーを PBS 中に 10 分間ずつ 3 回浸漬し行った。続いて、2 次抗体として、PBS で 40 倍希釈した FITC 蛍光標識ウサギ抗マウス免疫グロブリン G (Boehringer Mannheim) をチャンバーに滴下し、20 分間培養器内に静置した。洗浄は、1 次抗体の時と同様に行なった。さらに、無蛍光グリセリン:PBS (1:9) 溶液を少量滴下し、カバーガラスで封入した。

蛍光観察は、落射蛍光顕微鏡 (MICROPHOTO-FX; Nikon) 下で、B2A 励起フィルターを装着して行った。なお、コントロールとして、1 次抗体の曝露のない群を設けた。

### 体外成熟卵の作出

卵子の採取および体外成熟培養は、次のように行った。食肉市場で採取した卵巣の卵胞から、未受精卵を 18 G の注射針を付けた注射筒を用い、卵胞卵子を 2% ウシ胎仔血清を含む修正 PBS (mPBS) に吸引採取した。採取した未受精卵のうち、卵丘細胞が緊密に付着しているものを選別し、成熟培養に供した。卵子は、体外成熟培

養液である 10% ウシ胎仔血清添加 TCM-199 (Gibco) 液で数回洗浄した後、2.5 ml の培養液を満たした 3.5 cm プラスチックディッシュ (Falcon) にて、39°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% Air の培養器内で 22 時間成熟培養を行った。培養終了後、未受精卵を 300 unit/ml ヒアルロニダーゼ (Sigma) を含む mPBS 液で 3~5 分間処置して卵丘細胞を除去した。極体を放出している卵子を第二成熟分裂中期の成熟未受精卵として選別し、単為発生誘起処置まで、成熟培養を継続した。

#### 単為発生誘起

単為発生誘起処置は、青柳ら [15] の報告に準じて、電気刺激、サイクロヘキシマイド浸漬並びにカルシウムイオノフォア浸漬処置を順次行った。すなわち、成熟培養から 24 時間目に、供試卵を電気融合液 [18] (0.1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> および 0.01 mg/ml ウシ血清アルブミン (Sigma) を含んだ 0.3 M マンニトール溶液) を満たした電極幅 1 mm の平行電極型ステンレス製ワイヤーチャンバー (BTX) に浸し、細胞融合装置 (SSH-2; 島津) で、90 μsec · 1.00 KV/cm の条件で、直流パルスを 1 回通電し、電気刺激を与えた。次いで、10 μg/ml サイクロヘキシマイド (Sigma) および 5 μg/ml サイトカラシン B 添加成熟培養液にて 6 時間体外培養し、培養終了後、5 μM カルシウムイオノフォア A23I87 (CALBIOCHEM) を添加した CR1aa 液 [19] に 5 分間浸漬した。さらに、単為発生処置卵子は、5 μg/ml のサイトカラシン B を含む 5% 仔血清添加 CR1aa 培養液にて 12 時間培養し、2 倍体化して共培養試験に供試した。

#### 共培養試験

共培養試験には、4 穴マルチディッシュ (Nunc) を用い、コンフルエントの状態の初代卵管上皮培養細胞および継代 2 代~5 代目の凍結保存細胞により行った。なお、胚培養にはミネラルオイルで覆われた 0.5 ml の 5% 仔ウシ血清添加 CR1aa 培養液を用いた。

発生成績は、 $\chi^2$  検定により統計処理を行った。

## 結果

### 培養経過

コラゲナーゼ処理によって回収された細胞は、線毛を有する細胞と有さない細胞の 2 種が観察された。培養後のフラスコ底面への付着は、線毛を持たない細胞では培養開始から 24 時間以内に観察されたが、線毛を有する細胞では 2 日を要した。これらの細胞は、個々の細胞が分別可能な敷石状または伸長した形態で増殖を続け、7~8 日目にはフラスコ底面を満たす (コンフルエント) までに増殖した。線毛の動きは培養日数の経過とともに衰退し、10 日目までは認められなくなった。卵管 B, C および D では継代 7~8 代目で培養継続不可能となったが、卵管 A では継代 18 代目まで培養可能であった。また、凍結細胞では継代 2~4 代目では初代細胞と何ら変化なく増殖したが、継代 5 代目で増殖率が低下する傾向が認められた (Table 1)。

### 中間径フィラメントの変化

継代培養に伴う卵管上皮細胞の中間径フィラメントの存在を示す蛍光の変化を Table 2 に示した。

**サイトケラチン：**初代培養細胞では、全ての細胞において細胞質全体に強い蛍光が認められた (Fig. 1a)。ま

Table 1. The average days till bovine oviduct epithelial cells become confluent

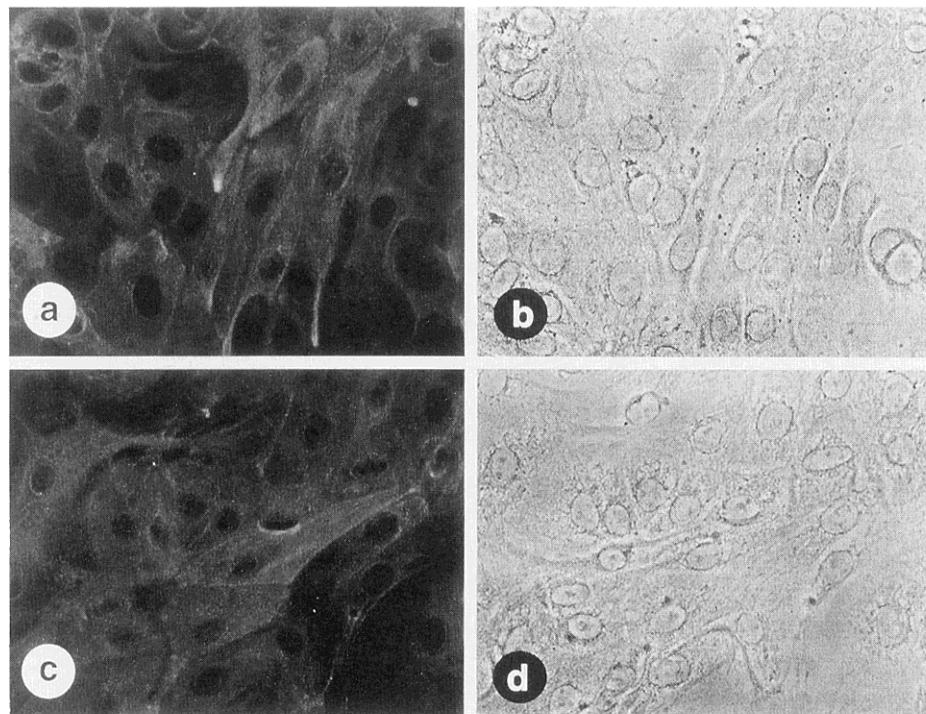
Oviduct	Epithelial cells	Generation					
		1	2	3	4	5	6
Subcultured (n=4)*		7.3	6.8	6.5	7.3	8.0	8.5
Cryopreserved (n=4)		—	6.0	7.0	8.0	10.8	—

\*n=4: Number of bovine oviducts examined.

Table 2. Reaction of intermediate filaments in subcultured and subcultured-cryopreserved oviduct epithelial cells

Generation	Immunofluorescence	Subcultured cells						Cryopreserved cells								
		1			2			5			2			5		
		C <sup>a</sup>	V <sup>b</sup>	D <sup>c</sup>	C	V	D	C	V	D	C	V	D	C	V	D
Oviduct	A	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
	B	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
	C	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
	D	+	±	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-

<sup>a</sup>C: Cytokeratin, <sup>b</sup>V: Vimentin, <sup>c</sup>D: Desmin. +: Reacted, -: Non reacted, ±: Faint.



**Fig. 1.** The immunofluorescent micrographs of bovine oviduct epithelial cells in monolayer culture reacted with anti-cytokeratin monoclonal antibody (a, c) and under phase-contrast microscopy of the same cells (b, d). a, b, Primary culture cells. c, d, Secondary culture cells.  $\times 400$ .

た、2代目以降10代目までの細胞において初代培養細胞と同様な反応が観察され、継代による変化は認められなかった (Fig. 1c)。また、凍結による影響も認められず、凍結された細胞においても、2代目および5代目で同様な傾向が認められた。

**ビメンチン：**初代培養細胞では、卵管Dの極一部の細胞においてのみ蛍光が認められたが、その他の卵管由来の細胞では全く認められなかった (Fig. 2a)。しかし、継代培養2代目の細胞では、約半数近くの細胞で強い蛍光が認められ (Fig. 2c)，さらに継代5代目以降では、すべての細胞で蛍光が認められた。凍結融解された細胞においても、同様な傾向が認められた。

**デスミン：**いずれの細胞においても、凍結の有無に係わりなく全ての世代の細胞で蛍光は全く観察されなかった。

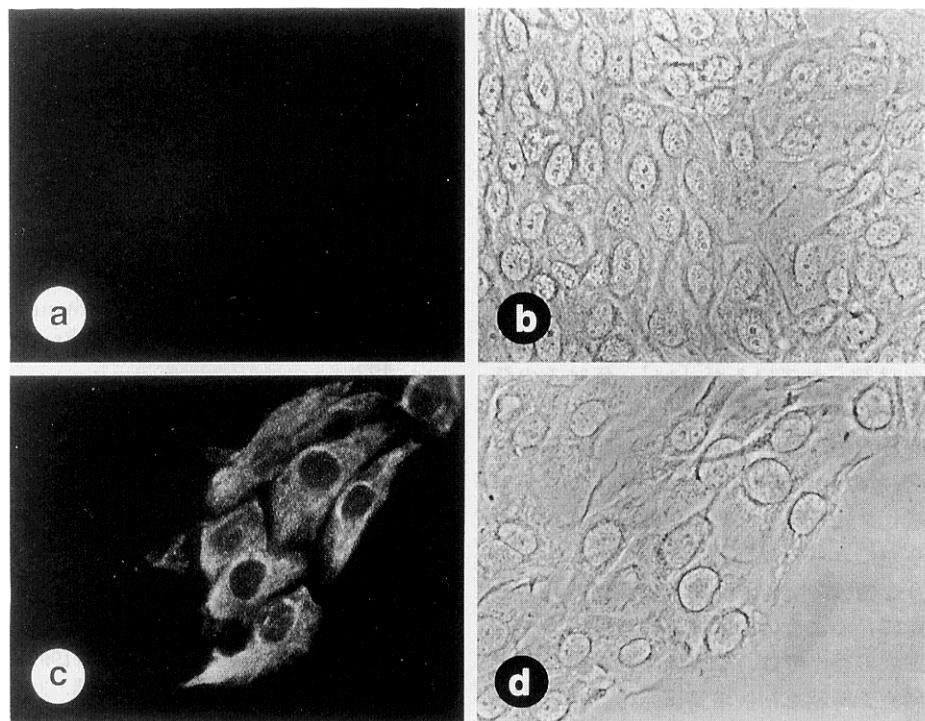
#### 胚発生支持能

卵管上皮細胞のウシ胚発生に対する共培養細胞としての有効性を検討するために、初代培養細胞および継代凍結保存細胞を共培養細胞として単離させたウシ卵子を体外培養して比較した (Table 3)。その結果、有意差

は認められなかつたが、8細胞期から非共培養区に比べ共培養区が高い発生率を示し、さらに、桑実胚および胚盤胞期への発生率は、共培養区が有意 ( $P < 0.01$ ) に高い値となつた。初代培養細胞区と継代凍結保存細胞区では、それぞれ29.8%および28.3%の胚が胚盤胞へ発生し、等しい胚発生支持能を示した。

#### 考 察

卵管上皮細胞がウシ胚の体外発生を支持することはすでに知られているが [1, 2, 6-8]、これは卵管上皮細胞が成長因子の mRNA を発現していることと関係があるものと考えられている [20, 21]。このため卵管上皮細胞との共培養では、卵管より単離された初代培養細胞が上皮細胞で占められていることが重要であると考えられるが、これまで行われた実験では明らかでない。また、卵管上皮細胞の継代あるいは凍結に伴う細胞性状の変化についても詳細な報告はない。そこで、本実験では先ず、初代培養、継代培養および凍結保存に伴う卵管上皮細胞の形態と細胞性状の一つとして中間径フィラメントについて観察した。その結果、単離した細胞は、Hoshi ら



**Fig. 2.** The immunofluorescent micrographs of bovine oviduct epithelial cells in monolayer culture reacted with anti-vimentin monoclonal antibody (a, c) and under phase-contrast microscopy of the same cells (b, d). a, b, Primary culture cells. c, d, Secondary culture cells.  $\times 400$ .

**Table 3.** Development of parthenogenetic embryos co-cultured with bovine oviduct epithelial cells

Oviduct epithelial cells	No. of replicates	No. of oocytes	Development to (%)			
			2-cell	8-cell	Morula	Blastocyst
Control <sup>1</sup>	7	200	145 (72.5)	56 (28.0)	30 (15.0) <sup>a</sup>	27 (13.5) <sup>a</sup>
Primary	7	181	131 (72.4)	72 (39.8)	63 (34.8) <sup>b</sup>	54 (29.8) <sup>b</sup>
Cryopreserved <sup>2</sup>	6	180	139 (77.2)	71 (39.4)	57 (31.7) <sup>b</sup>	51 (28.3) <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Control: Embryos were cultured without co-culture cells. <sup>2</sup>Cryopreserved: Second to fifth generation cells were used. <sup>a, b</sup>P<0.01.

[14], Joshi [16] および Hishinuma ら [22] の報告にあるように敷石状または伸長した形態を示し、継代5代目まで初代細胞と同様な形態を保持しながら活発に増殖した。しかし、継代6代目より細胞が小型化する形態の変化が現われ、さらに継代を継続すると細胞増殖率の低下に引き続いて、細胞の培養が困難になる傾向が示された。また、凍結保存した細胞では継代5代目において増殖率が低下する傾向がみられたが、継代4代目までは非凍結継代細胞と同様の形態および増殖を示した。このことから、凍結による細胞への障害は極めて少ないものと

考えられた。

サイトケラチンは上皮細胞 [9, 10] に、ビメンチンは間葉系由来細胞 [11, 23, 24] に、デスミンは筋細胞 [12] にそれぞれ特異的であることが知られている。本実験で中間径フィラメントの変化を調べた結果、初代培養細胞の全ての細胞で抗サイトケラチン抗体の反応が検出された。一方、抗ビメンチン抗体の反応は卵管Dにおいて一部の細胞で検出されたものの、抗デスミン抗体の反応はいずれの細胞においても検出されなかった。これらのことから、今回単離した細胞は上皮細胞で占めら

れていることが強く示唆された。さらに、継代2代目以降の細胞においても初代培養細胞と同様に抗サイトケラチン抗体の反応が検出されること、および抗デスミン抗体の反応はいずれの細胞においても検出されないことが判明した。しかし、抗ビメンチン抗体の反応は、継代2代目において大半の細胞で、また継代5代目のすべての細胞で検出された。このことは継代あるいは増殖により、ウシ卵管上皮細胞におけるビメンチンの発現が敏感に反応することを示していると思われる。これまで、継代5代目のウシ卵管上皮細胞で抗ビメンチン抗体の反応が検出されるることは知られていたが [14]、何時その発現が開始しているのかについては不明であった。本実験結果より、ウシ卵管上皮細胞のビメンチンは継代2代目から発現しているものと考えられた。これらのことから、少なくとも継代2代目で、卵管上皮細胞の性状が変化することが明らかになった。

一方、このような性状の変化が、共培養細胞としてのウシ胚発生支持能にどのように影響するかは明らかでない。そこで、本実験の後半では、単為発生胚を用い継代凍結保存細胞の発生支持能を初代培養細胞の成績と比較検討した。胚盤胞への発生成績をみると、非共培養区は13.5%であったのに対し、共培養区では29.8%（初代培養細胞）および28.3%（継代凍結保存細胞）であり、共培養による発生の改善が認められた。また、卵管上皮細胞の単為発生胚の発生支持能は発生率で判断する限り、継代凍結保存した細胞を用いても初代培養細胞と差がないことが判明した。以上から、培養ウシ卵管上皮細胞のビメンチン発現の有無と胚の発生支持能は無関係であることを示しているものと考えられた。卵管上皮の初代培養細胞と、継代し凍結保存後融解して培養された細胞との胚発生支持能に差のないことは、これらの細胞がウシ胚の体外培養に有効であることを示しているものと考えられた。継代凍結保存細胞の利用は、細胞の調整の手間が削減されるばかりでなく、同一卵管由来の上皮細胞を多量に長期間使用できることにより培養系の安定化が図られることなどの利点がある。

本実験では、ウシの発情周期による卵管上皮細胞の区別がなされておらず、今後、卵管を周期別に分け、各々の細胞の性質および発生支持能を調べることや、卵管の部位別に単離した細胞のウシ胚発生支持能、さらに、初代培養細胞と継代凍結保存細胞との胚に付与する効果を明確にするために、胚盤胞の細胞数を調べる必要があると思われる。

## 文 献

- 1) Eyestone, W. H. and First, N. L. (1989): Co-culture of early cattle embryo to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fert.*, 85, 715–720.
- 2) Fukui, Y. and Ono, H. (1988): *In vitro* development to blastocyst of in vitro matured and fertilised bovine oocytes. *Vet. Rec.*, 19, 282.
- 3) 梶原 豊・後藤和文・小坂昭三・中西喜彦・小川清彦 (1987) : ウシ卵胞卵子の体外受精および体外培養による孵化。家畜繁殖誌, 33, 173–180。
- 4) Camous, S., Heymann, Y., Meziou, W. and Menezou, Y. (1984): Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. *J. Reprod. Fert.*, 72, 479–485.
- 5) Voelkle, S. A., Amborsk, C. F., Hill, K. G. and Godke, R. A. (1985): Use of uterine-cell monolayer culture system for micromanipulated bovine embryos. *Theriogenology*, 24, 271–281.
- 6) Boccart, C., Mermilliod, P., Delecoeuillerie, C. and Dassy, F., (1991): Bovine oviduct cell monolayers for supporting the blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology*, 35, 187.
- 7) 後藤和文・岩井喜子・市川恭子・石原亜子・宅萬義弘・元石睦朗・徳丸元幸・中西喜彦(1992) : ウシ体外受精由来初期胚の体外培養。家畜繁殖誌, 38, 165–171。
- 8) Ellington, J. E., Carney, E. W., Farrell, P. B., Simkin, M. E. and Foote, R. H. (1990): Bovine 1-2cell embryo development using a simple medium in three oviduct epithelial cell coculture systems. *Biol. Reprod.*, 43, 97–104.
- 9) Frank, W. W., Appelhans, B., Schmid, E., Freudenstein, C., Osborn, M. and Weber, K. (1979): Identification and characterization of epithelial cells in mammalian tissues by immunofluorescence microscopy using antibodies to prekeratin. *Differentiation*, 15, 7–25.
- 10) Sun, T. -T., Shih, C. and Green, H. (1979): Keratin cytoskeletons in epithelial cells of internal organs. *Proc. Natl. Acad. USA*, 76, 2813–2817.
- 11) Frank, W. W., Schmid, E., Osborn, M. and Weber, K. (1978): Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 5034–5038.
- 12) Lazarides, E. and Balzer, D. R. (1978): Specificity of desmin to avian and mammalian muscle cells. *Cell*, 14, 429–438.
- 13) Ouhibi, N., Benet, G. and Menezo, Y. (1991): Fetal bovine oviduct epithelial cell monolayers: method of culture and identification. *J. Tiss. Cult. Meth.*, 13, 289–294.
- 14) Hoshi, H., Onodera, M. and Oikawa, T. (1992): Isolation, cell characterization and growth regulation of bovine oviduct epithelial cells *in vitro*. *TCRC*, 11, 5–11.
- 15) 青柳敬人・小西正人(1994) : ウシ体外成熟卵子の人為的活性化処理による胚盤胞への発育に関する研究—直流バルス、Caイオノホアおよびサイクロヘキシマイドを用いた複合活性化処理について—. *J. Reprod. Dev.*, 40, j5–j11.
- 16) Joshi, M. S. (1988): Isolation, cell culture and immu-

- nocytochemical characterization of oviduct epithelial cells of the cow. *J. Reprod. Fert.*, 83, 249–261.
- 17) 小野寺政一・星 宏良(1993)：卵管上皮、子宮内膜細胞の培養法。生殖機能細胞の培養法(菅原七郎・尾川昭三編), pp. 168–174, 学会出版センター, 東京。
- 18) Collas, P., Fissore, R., Robl, J., Sullivan, E. and Barnes, F. L. (1993): Electrically induced calcium elevation, activation and parthenogenetic development of bovine oocytes. *Molec. Reprod. Dev.*, 34, 212–223.
- 19) Rosenkrans, C. F. and First, N. L. (1991): Culture of bovine zygotes to the blastocyst stage: effect of amino acids and vitamins. *Theriogenology*, 35, 266.
- 20) Viuff, D., Hyttel, P. and Alexanderson, S. (1994): Expression and localization of growth factor mRNA in the bovine oviduct. *Theriogenology*, 41, 328.
- 21) Watson, A. J., Hogan, A., Hahnel, A., Wiemer, K. E. and Schultz, G. A. (1992): Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo. *Molec. Reprod. Dev.*, 31, 87–95.
- 22) Hishinuma, M., Takahashi, Y. and Kanagawa, H. (1989): Isolation and monolayer culture of bovine oviduct epithelial cells. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 51, 1201–1208.
- 23) Frank, W. W., Schmid, E., Osborn, M. and Weber, K. (1979): The intermediate-sized filaments of human endothelial cells. *J. Cell Biol.*, 81, 570–580.
- 24) Frank, W. W., Grund, C. and Schmid, E. (1979): Intermediate-sized filaments present in Sertoli cells are of the vimentin-type. *J. Cell Biol.*, 19, 269–275.

## **The Expression of Intermediate Filaments in Culturing Bovine Oviduct Epithelial Cells and the Sustaining Ability for the Embryo Development In Vitro**

Nobuhiro Shimozawa<sup>1</sup>, Tomohiro Kono<sup>1</sup>, Masakazu Onodera<sup>2</sup>  
Fumihiro Aono<sup>3</sup>, Yasuoichi Hira<sup>4</sup> and Tastuo Nakahara<sup>1</sup>

<sup>1</sup>NODAI Research Institute, Tokyo University of Agriculture, Setagaya-ku, Tokyo 156

<sup>2</sup>School of Veterinary Medicine, Azabu University, Sagamihara-shi 229

<sup>3</sup>Kyodoshiryo Co., Ltd., Hodogaya-ku, Yokohama 240

<sup>4</sup>Department of Agriculture, Tokyo University of Agriculture, Setagaya-ku, Tokyo 156, Japan

The present study was conducted to clarify changes of intermediate filaments, cytokeratin, vimentin and desmin, in primary, subcultured and cryopreserved bovine oviduct epithelial cells by subculture or cryopreservation and to assess their sustaining ability for the embryo development. Any morphological change of cells isolated from bovine oviducts and cultured *in vitro* was not observed up to the fifth generation, including cryopreserved cells. Result of indirect immunofluorescent staining study strongly suggested that the primary cells were epithelial cells because immunofluorescence to anti-cytokeratin antibody was detected but not observed anti-vimentin and anti-desmin antibody. From second generation, however, the reaction of vimentin

was become to be detected, suggesting that the nature of the epithelial cells changed. Sustaining ability of epithelial cells was assessed by co-culture of bovine parthenogenetic embryos with the oviduct epithelial cells. The results showed that sustaining ability of primary and subcultured-cryopreserved bovine oviductal cells was equivalent in which 29.8% and 28.3% of the parthenogenones in each cases developed to blastocysts. These results suggested that the expression of vimentin in culturing bovine oviduct epithelial cells and their sustaining ability for bovine parthenogenetic embryos had no relation.

**Key words:** Bovine, Oviduct epithelial cells, Intermediate filaments, Co-culture, Parthenogenetic embryos.