

単純組成培地において培養条件が ウシ体外受精由来胚の発生に与える影響

佐藤 秀俊¹・高田 直和¹・及川 俊徳¹
沼辺 孝¹・木船 厚恭¹・吉村 格²

¹宮城県畜産試験場 宮城県玉造郡岩出山町 〒989-64

²日本獣医畜産大学富士アニマルファーム 山梨県西八代郡上九一色村 〒409-37

要旨：単純組成培地（HECM）によるウシ体外受精由来胚の体外培養条件について検討した。HECM および TCM199 培地を用い、卵丘細胞との共培養、または非共培養をした場合、前者での培養が後者でのそれよりも胚盤胞への発生率が高かった。また、共培養系でない場合、HECM のほうが TCM199 より胚盤胞形成率が高かった。HECM を培養液とし、それに子ウシ血清と成長因子を添加すると胚盤胞の形成率を高め、胚盤胞の総細胞数を増加させた。以上の結果から、単純組成培地でウシ胚を発生させることが可能であり、さらに血清、成長因子の添加は発生率の向上に有効であった。

キーワード：ウシ胚、培養条件、血清、成長因子。

共培養している細胞から影響を直接受け易い。そのため、共培養細胞を必要としない培養系の開発が望まれる。これまで、完全組成培地における胚発生の報告 [9-12] があるが、培養条件の検討がなされた報告は少ない。そこで本研究では、体外受精由来胚および再構築胚を共培養することなく高率に発生させることを目的として、ウシ体外受精由来初期胚の発育に及ぼす気相、共培養の有無、血清と成長因子の添加の有無の影響を単純組成培地として報告されている HECM (Hamster embryo culture medium) [13] を用いて調べ、TCM199 と比較した。

材料および方法

体外成熟および体外受精

体外成熟および体外受精は既報 [17] に従って行った。食肉処理場で屠殺後、速やかに摘出した卵巣は、保温ジャーにて乾燥を避けながら、20~25°C で輸送した。

卵胞卵子は 21 G の注射針をつけた 10 ml 注射器で、8 mm 以下の小卵胞から吸引法により採取した。供試卵胞卵子は採取後の形態観察で卵丘細胞が十分に付着している卵子のみを選抜し、用いた。未成熟卵子は、あらかじめ CO₂ インキュベーター中で平衡しておいた培養ディッシュ (NUNC) のミネラルオイル (SQUIBB) 下の成熟培地 (500 μl)、すなわち 25 mM HEPES 緩衝 TCM199 (GIBCO) に 5% 非働化子ウシ血清 (CS: GIBCO) を添加した培養液に約 50 個導入し、CO₂ インキュベーター内 (2% CO₂, 98% 空気, 38.5°C) で 20~22 時間、成熟培養を行った。

精子の処理および媒精

精子には、当场で飼養の黒毛和種種雄牛の凍結精液の

(受付 1995 年 6 月 23 日／受理 1995 年 9 月 22 日)

別刷請求先：〒989-64 宮城県玉造郡岩出山町南沢字樋渡 1
宮城県畜産試験場 佐藤秀俊

精子を用いた。また、本実験では、同一個体の同じロットの精液を用いた。精子は10 mM カフェインを添加した BSA を含まない BO 液 [18] で2回遠沈洗浄後、精子濃度を $10 \sim 20 \times 10^6$ 精子/ml に調整し、10 mg/ml BSA (SIGMA, USA), 10 IU/ml ヘパリン (NOVO) を添加した修正 BO 液で等倍希釈して精子混濁液を作製した。培養デッショ (住友ベークライト) のミネラルオイル下に精子混濁液を 100 μl のマイクロドロップとし受精培地とした。それに成熟培養した卵子を30~50個導入し媒精した。卵子は媒精6時間後に発生培地に移した。

発生培養は以下の3実験区について行った。

実験1. 共培養細胞（卵丘細胞）を用いない体外発生培養：媒精直後に卵丘細胞を除去した卵子を、38.5°C, 5%CO₂, 95%空気の気相下の培養器中で、ミネラルオイル下 100 μl の5%子ウシ血清加HECMのマイクロドロップに10~20個ずつ移し、その後の発生を観察した。対照区として、媒精した卵子は卵丘細胞と共に培養した。さらに同様の方法で、5%子ウシ血清加TCM199で培養し、比較検討した。媒精3日後に胚の発生状況を観察するとともに、未分割卵を除去し、媒精後7~8日後に出出現した胚盤胞を記録した。同様の培地について38.5°Cで、気相を2%CO₂, 95%空気の条件で実験を行った。

実験2. 体外培養胚の発生に及ぼす酸素濃度の影響：媒精直後に卵丘細胞を除去した卵子を、酸素濃度を20%と7%の2区に設定した気相条件下で5%子ウシ血清加HECMに移し、その後の胚の発生率を観察した。対照区として、同じ気相下で卵丘細胞と共に培養した卵子を用いた。媒精後3日後に胚の発生状況を観察するとともに、未分割卵を除去し、媒精後7~8日後に発生した胚盤胞を記録した。

実験3. 発生培地への血清、成長因子の添加時期の検討：媒精直後に卵丘細胞を除去した卵子を、酸素濃度を7%に設定した条件下でポリビニルアルコール (PVA) 0.1%を添加したHECMで培養し、胚の発生率を検討した。媒精後3日後に胚の発生状況を観察するとともに、未分割卵を除去した。媒精後3日あるいは5日目に5%子ウシ血清、50 ng/mlのインスリン様成長因子1 (rIGF-1 : TOYOBO) を添加した培地に移し、さらに培養を続けた。媒精7~8日後に胚盤胞への発生率を調べるとともに、一部の胚については細胞数を計測した [19]。さらに媒精後10日目までに脱出した胚盤胞を記録した。

統計処理：すべての実験は、3回以上繰り返した。胚の発生率については χ^2 検定、細胞数については分散分析法により有意差検定を行った。

結 果

1) 共培養細胞を用いない体外発生成績について

HECMおよびTCM199の培地で体外培養した場合の胚の発生率をTable 1に示した。共培養区における分割率および8日目までの胚盤胞への発生率は、HECM区でそれぞれ67.0%と16.5%, TCM199区で60.1%と26.1%であった。非共培養区における分割率および8日目までの胚盤胞への発生率は、HECM区でそれぞれ61.2%と8.6%, TCM199区で60.4%と3.7%であった。卵丘細胞と共に培養した場合、胚の発生率はTCM199に比べHECMの方が低かった。卵丘細胞と共に培養しない場合、発生率は、どちらも低かったが、HECMの方がTCM199よりも高かった。

Table 1. Development of denuded embryos cultured in HECM or TCM199 and/or co-culture with granulosa cells

Medium	Gas phase	Culture condition		No. (%) of embryos developed to:		
		Denudation	No. of oocytes	>2-cell	>Blastocyst	
HECM	5%CO ₂ in	Co-culture	85	57 (67)	14 (17) ^{ab}	
		Denuded	116	71 (61)	10 (9) ^b	
	air	Co-culture	168	101 (60)	44 (26) ^a	
		Denuded	134	81 (60)	5 (4) ^c	
TCM-199	2%CO ₂ in	Co-culture	144	82 (57) ^a	13 (9) ^{ab}	
		Denuded	97	20 (21) ^b	5 (5) ^b	
	air	Co-culture	105	60 (57) ^a	19 (18) ^a	
		Denuded	100	37 (37) ^b	2 (2) ^b	

Values with different superscripts in the same column are significantly different between 5%CO₂ and 2%CO₂ part ($p < 0.05$).

2) 体外培養胚の発生に及ぼす酸素濃度の影響

気相を変え HECM 培地で体外培養した場合の胚の発生率を Table 2 に示した。共培養した場合、7%酸素区における卵割率および8日目までの胚盤胞への発生率は、それぞれ67.0%と16.5%，20%酸素区では60.1%と26.1%であった。非共培養の場合、7%酸素区における卵割率および8日目までの胚盤胞への発生率はそれぞれ67.0%と16.5%，20%酸素区では60.1%と26.1%であった。

3) 体外培養胚の発生に及ぼす培地への血清、成長因子の添加時期の影響

発生培地へ子ウシ血清を添加することにより胚盤胞への発生率は、対照区に比べ有意に高まったが、添加時期による差は認められなかった。同様に、発生率はIGF-1の添加区でも対照区に比較して有意に増加した。添加時期については、媒精後3日目に添加したときよりも5日に添加した区で発生率が上昇する傾向が認められた。また、胚盤胞の平均細胞数は血清添加により向上する傾向が認められた (Table 3)。

考 察

HECM を培地とした非共培養で、酸素分圧を制御しない場合の胚盤胞への発生率はTCM199を培地とした培養と比較して有意に高かった。HECM 培地は、グルコースが含まれず、アミノ酸、無機塩類の種類も少なく、TCM199 に比べ単純な組成である。このことから、TCM199 培地に含有される HECM に含まれない物質の影響が推測された。その一つのグルコースは、ウシ卵管内で0.05~0.2 mMの濃度であるが、TCM199 中の濃度が5.56 mMと異常に高いため、これが胚の発生を阻害する一因とされている [20]。

本実験において、共培養では胚の発生率が上昇した。共培養で発生率が上昇することについて、Gardner と Leese [21] は卵丘細胞がグルコースを消費しピルビン酸を生成することを示唆している。また、Kim ら [22] は、胚の発生の前半ではグルコースは必要ないが、その代謝物であるピルビン酸、乳酸、アミノ酸等が必須であ

Table 2. Effect of oxygen concentrations on bovine embryo development to the blastocyst stage in HECM medium *in vitro*

Gas phase	Culture condition	No. of oocytes	No. (%) of embryos developed to:	
			>2-cell	>Blastocyst
7%O ₂ in air	Co-culture	105	65 (62)	0 (0) ^a
	Denuded	102	75 (74)	21 (21) ^b
20%O ₂ in air	Co-culture	120	72 (60)	18 (15) ^b
	Denuded	113	75 (66)	13 (12) ^b

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

Table 3. Effect of calf serum and IGF-1 on denuded bovine embryo development to the blastocyst and hatched blastocyst stages in HECM medium *in vitro*

Culture condition	No. of oocytes	No. (%) of embryos developed to:			Blastocyst />2-cell	Mean cell No. ± SEM of Blastocyst
		>2-cell	>Blastocyst	Hatched blastocyst		
HECM +PVA	265	133 (50)	22 (8) ^a	8 (3) ^a	17% ^a	88.1±12.5 ^a
+CS (DAY3)	175	121 (69)	47 (27) ^b	20 (11) ^{ab}	39% ^b	116.6± 8.8 ^b
+CS (DAY5)	210	115 (55)	52 (25) ^b	28 (13) ^b	45% ^b	118.9± 9.8 ^b
+IGF (DAY3)	206	135 (64)	27 (13) ^a	6 (3) ^a	20% ^a	117.9±10.9 ^b
+IGF (DAY5)	200	129 (65)	38 (19) ^b	11 (6) ^{ab}	30% ^{ab}	115.8± 8.9 ^b

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

ることを報告している。これらのことから、共培養ではどちらの培地でも発生率が非共培養時よりも上昇した理由として、非共培養では卵丘細胞を除去したため過剰なグルコースが消費されず、必須であるビルビン酸等が生成されなかつたためであったと考えられた。PinyopummintrとBavister [11] は、培地中の阻害物質の成分は同定してはいないが、培地調整時に用いる水と、血清中の成分の可能性をあげている。また、阻害物質は、共培養することによって取り除かれることから [11]、非共培養時には共培養時以上に培養液の成分に注意する必要があると考えられた。

培養条件で炭酸ガス濃度を変えた場合、分割率は非共培養で2%CO₂区の方が5%CO₂区のものよりどの培地でも有意に低いものであったが、これは2%CO₂区では培地のpHが高く維持されたために分割時のエネルギー源の至適濃度に影響 [23, 24] を及ぼしたためと考えられた。

胚の発生に及ぼす酸素濃度の影響を検討したところ、非共培養では低酸素濃度で発生率が上昇することが確かめられた。哺乳類では生殖器道内の酸素濃度は低く、5%程度であるとされている [25]。マウス胚では20%の酸素濃度で培養された胚盤胞より5%で培養されたほうが細胞数が多いと報告されている [26]。胚盤胞の細胞数については、ウシでも同様な報告がなされている [5, 26, 27]。このように様々な研究がなされているが、低酸素の有用性については明確にされていない。近年、酸素が胚発生を阻害する原因の一つとして活性酸素の関与が考えられている [28, 29]。これらのことから、非共培養時のウシ胚の発生には低酸素濃度が至適であり、生殖器道内より高い酸素濃度での培養は胚発生に対して何らかの有害な影響を与える可能性が示唆された。しかし、共培養条件で低酸素にした場合、胚盤胞への発生が認められなかった。このような培養条件下で共培養された卵丘細胞が黒色化して剥離する現象が認められたので、卵丘細胞は酸素欠乏のために死滅するとともに、このような細胞から胚発生に有害な物質が漏出していることも考えられた。一方、共培養で酸素濃度が高い場合、卵丘細胞の代謝により酸素が消費されて適度な酸素濃度になるために胚の発生に好適な気相にいたり、その結果胚の発生が改善されたものと考えられた。

血清添加の時期を検討したところ、媒精後3日あるいは5日目に添加すると有意に胚盤胞以降への発生率が上昇した。媒精直後より添加した実験2の結果と比較しても高い傾向が認められた。胚盤胞の平均総細胞数も血清を添加すると多くなる傾向が認められた。この結果は、媒精直後では血清は分割を阻害し、それ以降では促進的に作用するとするPinyopummintrとBavister [30], Lim

ら [31] の結果と一致していた。血清添加が胚の発生に有効であった時期は、Kimら [22] のグルコースの添加時期の検討結果にあてはまるところから、血清が胚発生に有効である一因として血清中のグルコースの存在が考えられた。血清はグルコースなど既知の物質や、多数の未知物質を含有する。未知物質には、胚の発生に有効なホルモン、ビタミン、アミノ酸等が含まれているため、血清添加により胚の発生率が上昇するとともに、細胞数の増加を招いたと考えられた。血清中の未知物質のうちの一つであるインスリン様成長因子を同時期に添加したところ、血清添加には及ばないものの胚の発生率が上昇し、細胞数も増加した。マウスおよびウシ胚ではIGF-1は発生促進効果があることが報告されている [32-35]。以上の結果から、ウシ胚は、培養液に含まれる有害な物質の除去、および、気相条件等を検討することにより、卵丘細胞等と共に培養することなく体外で発生が可能であることが明らかになった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本論文の校閲を賜った東北大学農学部動物生殖科学教室菅原七郎教授に深謝致します。

文 献

- 1) Kuzan, F.B. and Wright, R.W. (1982): Observations on the development of bovine morulae on various cellular and noncellular substrata. *J. Anim. Sci.*, 54, 811-816.
- 2) Eyestone, W.H., Vignieri, J. and First, N.L. (1987): Co-culture of early bovine embryos with oviductal epithelium. *Theriogenology*, 27, 228.
- 3) Heyman, Y., Menezo, Y., Chesne, P., Camous, S. and Garnier, V. (1987): *In vitro* cleavage of bovine and ovine early embryos: Improved development using co-culture with trophoblastic vesicles. *Theriogenology*, 27, 59-68.
- 4) Kajihara, Y., Goto, K., Kosaka, S., Nakanishi, Y. and Ogawa, K. (1987): *In vitro* fertilization of bovine follicular oocytes and their development up to hatched blastocyst *in vitro*. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 33, 173-180.
- 5) Tervit, H.R., Whittingham, D.G. and Rowson, L.E.R. (1972): Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fert.*, 30, 493-498.
- 6) Wright, R.W. Jr, Anderson, G.B., Cupps, P.T. and Drost, M. (1976): Successful culture *in vitro* of bovine embryos to the blastocyst stage. *Biol. Reprod.*, 14, 157-162.
- 7) Shini, S. and Bavister, B.D. (1988): Two cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. *Biol. Reprod.*, 39, 1183-

- 1192.
- 8) Chatot, C.L., Lewis, J.L., Torres, I. and Ziomek, C.K. (1990): Development of 1 cell embryos from different strains of mice in CZB medium. *Biol. Reprod.*, 42, 432–440.
 - 9) McLanglin, K.J., McLean, D.M., Stevens, G., Ashman, R.J., Lewis, P.A., Bartsch, B.D. and Seamarck, R.F. (1990): Viability of one cell bovine embryos cultured in synthetic oviduct fluid medium. *Theriogenology*, 33, 1191–1199.
 - 10) Rosenkrans, C.F. and First, N.L. (1991): Culture of bovine zygotes to the blastocyst stage: effect of amino acids and vitamins. *Theriogenology*, 35, 166.
 - 11) Pinyopummintr, T. and Bavister, B.D. (1991): *In vitro*-matured/*in vitro*-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. *Biol. Reprod.*, 45, 736–742.
 - 12) Bavister, B.D., Rose-Hellekant, T.A. and Pinyopummintr, T. (1992): Development of *in vitro*-matured/*in vitro*-fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology*, 37, 127–146.
 - 13) Seshagiri, P.B. and Bavister, B.D. (1991): Relative developmental abilities of hamster 2- and 8-cell embryos cultured in hamster embryo culture medium-1 and -2. *J. Exp. Zool.*, 257, 51–57.
 - 14) Goto, K., Kajihara, Y., Kosaka, S., 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.
 - 15) Lu, K.H., Gordon, I., Chen, H.B., Gallagher, M. and McGovrn, H. (1988): Birth of twins after transfer of cattle embryos produced by *in vitro* techniques. *Vet. Rec.*, 122, 539–540.
 - 16) Fukuda, Y., Ichikawa, M., Naito, K. and Toyoda, Y. (1990): Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized and cultured with cumulus cells *in vitro* up to the blastocyst stage. *Biol. Reprod.*, 42, 114–119.
 - 17) Takada, N., Ohisa, N., Numabe, T. and Ishikawa, Y. (1991): Production of twin calves by transfer of embryos produced *in vitro*. *Vet. Rec.*, 128, 307.
 - 18) Brackett, B.G. and Olphant, G. (1975): Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 12, 260–274.
 - 19) Pursel, V.G., Wall, R.J., Rexroad, C.E. Jr., Hammer, R.E. and Brinster, R.L. (1989): A rapid whole mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. *Theriogenology*, 31, 687–691.
 - 20) Takahashi, Y. and First, N.L. (1992): *In vitro* development of bovine one cell embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology*, 37, 963–978.
 - 21) Gardner, D.K. and Leese, H.J. (1990): Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 88, 361–368.
 - 22) Kim, J.H., Funahashi, H., Niwa, K. and Okuda, K. (1993): Glucose requirement at different developmental stage of *in vitro* fertilized bovine embryos cultured in semi-defined medium. *Theriogenology*, 39, 875–886.
 - 23) Brinster, R.L. Study on the development of mouse embryos *in vitro*. I. The effect of osmolarity hydrogen ion concentration. 158, *J. Exp. Zool.*, 158, 49–58.
 - 24) Brinster, R.L. (1965): Study on the development of mouse embryos *in vitro*. II. The effect of energy source. *J. Exp. Zool.*, 158, 49–58.
 - 25) Mastrianni, L. Jr. and Jones, R. (1965): Oxygen tension within the rabbit fallopian tube. *J. Reprod. Fert.*, 9, 99–102.
 - 26) Quinn, P. and Harow, G.M. (1978): The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryo *in vitro*. *J. Exp. Zool.*, 206, 73–80.
 - 27) Wright, R.W. Jr, Anderson, G.B., Cupps, P.T. and Drost, M. (1976): Blastocyst expansion and hatching of bovine ova cultured *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, 43, 170–174.
 - 28) Tompson, J.G.E., Simpson, A.C., Pugh, P.A., Donnelly, P.E. and Tervit, H.R. (1990): Effect of oxygen concentration on *in-vitro* development of preimplantation sheep and cattle embryos. *J. Reprod. Fert.*, 89, 573–578.
 - 29) Betterbet, B. and Wright, R.W., Jr. (1985): Development of one-cell ovine embryos in two culture media under two gas atmospheres. *Theriogenology*, 23, 547–553.
 - 30) Pinyopummintr, T. and Bavister, B.D. (1994): Development of embryos in a cell-free culture medium. Effect of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. *Theriogenology*, 41, 1241–1249.
 - 31) Lim, J.M., Okita, O., Okuda, K. and Niwa, K. (1994): Effect of calf serum on culture medium on development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 41, 1091–1098.
 - 32) Harvey, M.B. and Kaye, P.L. (1991): Mouse blastocysts respond metabolically to short term stimulation by insulin and IGF-I through the insulin receptor. *Mol. Reprod. Dev.*, 29, 253–258.
 - 33) Harvey, M.B. and Kaye, P.L. (1992): Insulin-like growth factor-1 stimulates growth of mouse preimplantation embryos *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 31, 195–199.
 - 34) Kaye, P.L., Bell, K.L., Beebe, L.F.S., Dunglison, G.F., Gardner, H.G. and Harvey, M.B. (1992): Insulin and insulin-like growth factors (IGFs) in preimplantation development. *Reprod. Fertil. Dev.*, 4, 373–386.
 - 35) Seidel, G.E., Glass, T. and Olsen, S.E. (1991): Culture of 1-cell bovine embryos to blastocysts in chemically defined media. *Biol. Reprod.*, 44, 927–936.

Effect of Culture Conditions on the Development of In Vitro Fertilized Bovine Embryo in the Simply Defined Medium, HECM

*Hidetoshi Satoh¹, Naokazu Takada¹, Toshinori Oikawa¹,
Takashi Numabe¹, Atutaka Kifune¹ and Itaru Yoshimura²*

¹Miyagi Prefectural Animal Industry Experiment Station, Iwadeyama, Miyagi 989-64 and

*²Nippon Veterinary and Animal Science University, Fuji Animal Farm, Kamikuishiki,
Yamanashi 409-37, Japan*

Culture conditions of *in vitro* fertilized bovine eggs denuded or surrounded with cumulus cells were examined in order to effectively use the simply defined medium, HECM. In experiment 1, the rate of development to the blastocyst stage of denuded eggs was lower than that of eggs co-cultured with cumulus cells. The rate of development to the blastocyst stage of denuded eggs in the HECM medium was higher than that in the medium TCM199. In experiment 2, the effects of oxygen concentrations on the development of denuded and co-cultured eggs were examined in the HECM medium. The rate of development to the blastocyst stage in denuded ova was significantly higher in the 7% O₂ condition (21%) than in

the 20% O₂ condition (0%). In experiment 3, the effect of calf serum (CS) and insulin like growth factor 1 (IGF-1) on the development of denuded eggs cultured in HECM with 7% O₂ was examined. The rate of development of CS and IGF-1 improved significantly (13–27%) compared with the control (PVA) (8%). This suggested that the bovine embryo could be effectively cultured in the simply defined medium *in vitro* when the culture conditions were sufficiently examined, including the elimination of inhibiting factors from the culture medium and gas (O₂, CO₂) pressure.

Key words: Bovine embryo, Culture condition, Serum, Growth factor.