

ダルベッコ変法イーグル培地を用いた キメラマウス胚の培養成績

高橋 正浩・石原 由美・高橋寿太郎・安田 泰久

岩手大学農学部応用生物学科動物機能開発学教室 岩手県盛岡市 〒020

要旨：培養液としてDMEMを使用して体外培養におけるマウスキメラ胚の発生について検討した。キメラ胚（BALB/c ⇄ C57BL/6J）の統合胚盤胞以降への発生率は、4細胞期胚同士の集合胚で82.2%，8細胞期胚同士で89.1%，16細胞期胚同士で84.7%となった。8細胞期胚同士の集合胚の発生を経時的に観察すると、統合胚盤胞以降への発生率は培養12時間で0%，24時間で25.4%，36時間で80.4%となり、培養24時間における胚盤胞と培養36時間における拡張胚盤胞への発生率において、単一胚と比較して有意差があり、発生速度の遅延が認められた。

キーワード：キメラ胚、DMEM、胚発生。

集合法によるキメラ作出技術は、Tarkowski [14] がマウスを使用した哺乳類における最初の集合キメラの作出に成功して以来、さまざまな改良が行われ、より簡便な手法となつた。我々は一連の集合キメラ胚作出に関する研究を実施してきており、マウス、ラット胚における8細胞期から胚盤胞までの体外培養や、集合法によるキメラ胚の発生の検討 [3, 13]、キメララットの作出 [11] を報告している。ラットのキメラ胚作出時にはダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 以下 DMEM) を用いて高い培養成績が得られているため、本研究では、マウスキメラ胚の効率的な作出を試みるための基礎研究として、特に胚の集合と発生に有効であると考えられるDMEMを用いてRatと同一の実験系による初期発生段階における体外培養でのマウスキメラ胚の発生について検討を試みた。

材料と方法

本実験には、当教室において繁殖させた4週齢のBALB/c系ならびにC57BL/6系マウス雌300匹を使用した。これらのマウスは室温24±1°C、湿度50~60%，12時間点灯、12時間消灯の条件下で飼育した。交配は管理交配とし、PMSGとhCGを48時間間隔で5IU投与し、hCG投与後直ちに同系成熟雄マウスと同居させた。交配の確認は腔栓の有無によって行い、交配の確認日を妊娠1日目とした。妊娠3日目の16時(hCG投与後74時間目)に卵管および子宮から4~

16細胞期胚を灌流法で回収した。胚の回収にはDMEMを使用した。培養は0.3% BSA (Sigma Chemical Co.) 含有DMEMを用いて、37.0±1°C、湿度100%，5% CO₂の混合空気相の培養器内で行った。透明体除去は0.5% pronase(科研製薬)含有DMEM内で行い、胚の集合は0.3% phytohemagglutinin P (Difco Laboratory)含有DMEM内で行った。全ての胚の操作は温度の低下による胚の発生率の低下を防ぐため、37°Cに調節されたスライド加温装置上で実施した。胚は培養開始から12時間毎に60時間まで実体顕微鏡下で観察を行い、発生状態の記録を行った。

結果

単一の胚についてBALB/c胚とB57BL/6J胚の発生率を比較すると、同じstageではほぼ同じ発生率を示したが、stage別に比較すると8-cellと16-cellに対して4-cellの発生率がやや低い傾向を示した(Table 1)。同様に、孵化についても8-cellと16-cellではいずれも42から45%であり、4-cellでは20~24%と低い値を示し、有意な差が認められた(P<0.05)。BALB/c系マウスの8-cellからの培養による胚発生の経時的な観察を行い、集合胚の発生率との比較に用いた(Table 2)。

また、透明帯除去胚との比較では有意な差は認められなかった(Table 3)。

キメラ8-cell ⇄ 8-cellの発生過程は、単一胚における8-cellの場合と同様に、培養12から18時間後に2つの胚は統合して初期桑実胚に発生し、24から30時間後には後期桑実胚へと発生した。さらに、36から42時間後に胚盤胞、42から48時間後には拡張胚盤胞へと発生した(Table 6)。一方、16-cell同士は8-cell同士とほぼ同じ時間で発生が進行したが、4-cell同士は12時間程遅れて発生が進行し発生率も低い傾向を示した。4-cell同士、8-cell同士、16-cell同士における最終的な胚盤胞への発生率は、それぞれ82.2% (60/73)、89.1% (123/138)、84.7% (61/72) となった(Table 5)。

BALB/c ⇄ BALB/c胚、C57BL/6J ⇄ C57BL/6J胚では、8-cell同士における統合胚盤胞までの発生率はそれぞれ88.1% (52/59)、88.6% (62/70)となり、その90.4% (47/52)、91.9% (57/62)が統合拡張胚盤胞に発生し(Table 4)、BALB/c ⇄ C57BL/6J胚と比較して有意な差は認められなかった。

(受付 1994年11月21日／受理 1996年10月7日)

別刷請求先：〒020 盛岡市上田3-18-8

岩手大学農学部応用生物学科動物機能開発学教室

Table 1. Development of intact embryos cultured in DMEM for 60 hrs *in vitro*

Type of embryos	No. of embryos	No. (%) of embryos developed to:				Total no. of blastocysts (%)	Degenerated embryos (%)
		Morula (%)	Blastocyst (%)	Expanded blastocyst (%)	Hatched embryo (%)		
BALB/c							
4-cell	44	3 (6.8)	5 (11.4)	24 (54.6)	9 (20.5) ^a	38 (86.4)	3 (6.8)
8-cell	75	6 (8.0)	4 (5.3)	32 (42.7)	32 (42.7) ^b	68 (90.7)	1 (1.3)
16-cell	60	3 (5.0)	3 (5.0)	26 (43.3)	27 (45.0) ^c	56 (93.3)	1 (1.7)
C57BL/6J							
4-cell	37	3 (8.1)	4 (10.8)	19 (51.4)	9 (24.3) ^a	32 (86.5)	2 (5.4)
8-cell	66	5 (7.6)	4 (6.1)	27 (40.9)	29 (43.9) ^c	60 (90.9)	1 (1.5)
16-cell	72	4 (5.6)	4 (5.6)	31 (43.1)	33 (45.8) ^c	68 (94.4)	0 (0.0)

Significantly different between ^a and ^b ($P<0.025$), between ^a and ^c ($P<0.05$).

Table 2. Development of intact 8-cell embryos cultured for 12 to 60 hrs *in vitro*

Type of embryos	No. of embryos	Culture period (Hrs)	No. (%) of embryos developed to:				Total no. of blastocysts (%)
			Morula (%)	Blastocyst (%)	Expanded blastocyst (%)	Hatched blastocyst (%)	
BALB/c	75	12	58 (77.3)	—	—	—	0 (0.0)
		24	42 (56.6)	32 (42.7) ^a	—	—	32 (42.7)
		36	9 (12.0)	31 (41.3)	34 (45.3) ^a	—	65 (86.7)
		48	6 (8.0)	8 (10.7)	80 (80.0)	—	68 (90.7)
		60	6 (8.0)	4 (5.3)	32 (42.7)	32 (42.7)	68 (90.7)

^a; Significantly different compared with BALB/c↔C57BL/6J(8-cell↔8-cell) in Table 6 ($P<0.025$).

Table 3. Development of zona-free embryos cultured *in vitro*

Type of embryos	No. of embryos	No. (%) of embryos developed to:				Total no. of blastocysts (%)	Degenerated embryos (%)
		Morula (%)	Blastocyst (%)	Expanded blastocyst (%)	Hatched blastocyst (%)		
BALB/c							
4-cell	50	5 (10.0)	5 (10.0)	37 (74.0)	42 (84.0)	3 (6.0)	
8-cell	82	7 (8.5)	5 (6.1)	68 (82.9)	73 (89.0)	2 (2.4)	
16-cell	55	5 (9.1)	4 (7.3)	46 (83.6)	50 (90.9)	0 (0.0)	
C57BL/6J							
4-cell	42	4 (9.5)	4 (9.5)	31 (73.8)	35 (83.3)	3 (7.1)	
8-cell	86	7 (8.1)	5 (5.8)	72 (83.7)	77 (89.5)	2 (2.3)	
16-cell	50	4 (8.0)	3 (6.0)	43 (86.0)	46 (92.0)	0 (0.0)	

Table 4. Development of 8-cell↔8-cell embryos in culture

Type of aggregated embryos	No. of aggregated embryos	No. (%) of embryos developed to:				Total no. of blastocysts (%)	Degenerated embryos (%)
		Morula (%)	Blastocyst (%)	Expanded blastocyst (%)	Hatched blastocyst (%)		
BALB/c↔C57BL/6J							
BALB/c↔BALB/c	138	12 (8.7)	13 (9.4)	110 (79.7)	123 (89.1)	3 (2.2)	
C57BL/6J↔C57BL/6J	59	5 (8.5)	5 (8.5)	47 (79.7)	52 (88.1)	2 (3.4)	
	70	8 (11.4)	5 (7.1)	57 (81.4)	62 (88.6)	0 (0.0)	

Table 5. Development of BALB/c \leftrightarrow C57BL/6J embryos *in vitro* culture

Type of aggregated embryos	No. of aggregated embryos	No. (%) of embryos developed to:			Total no. of blastocysts	Degenerated embryos (%)
		Morula (%)	Blastocyst (%)	Expanded blastocyst (%)		
4-cell \leftrightarrow 4-cell	78	9 (12.3)	19 (26.0) ^a	41 (56.2) ^a	60 (82.2)	4 (5.5)
8-cell \leftrightarrow 8-cell	138	12 (8.7)	13 (9.4) ^b	110 (79.7) ^b	123 (89.1)	3 (2.2) ^d
16-cell \leftrightarrow 16-cell	72	3 (4.2)	9 (12.5) ^c	52 (72.2) ^c	61 (84.7)	8 (11.1) ^{e*}

Significantly different between ^a and ^b ($P<0.01$) and between ^d and ^e ($P<0.025$). *; These embryos did not develop into integrated blastocyst.

Table 6. Development of BALB/c \leftrightarrow C57BL/6J embryos in culture

Type of aggregated embryos	No. of aggregated embryos	Culture period (hrs)	No. (%) of embryos developed to:			Total no. of blastocysts (%)
			Morula (%)	Blastocyst (%)	Expanded blastocyst (%)	
8-cell \leftrightarrow 8-cell	138	12	95 (68.8)	—	—	0 (0.0)
		24	100 (72.5)	35 (25.4) ^a	—	35 (25.4)
		36	24 (17.4)	71 (51.5)	40 (29.0) ^a	111 (80.4)
		48	12 (8.7)	28 (20.3)	95 (88.8)	123 (89.1)
		60	12 (8.7)	13 (9.4)	110 (79.7)	123 (89.1)

a; Significantly different compared with normal 8-cell embryos in Table 2 ($P<0.025$).

考 察

現在、マウス 8-cell の試験管内培養については Whitten [15] が完全合成培地によって 98 から 99% が胚盤胞まで発生すると報告し、マウスキメラ胚については Mintz [7] が胚盤胞へ 95% という発生率を報告している。本研究において胚の最終的な発生率は、単一の胚と透明帯除去胚の双方で、BALB/c, C57BL/6J とともに、16-cell が相対的に高い発生率 (90.9 から 94.4%) を示し、4-cell が低い発生率 (83.3 から 86.5%) を示した。胚を体外で操作、培養する場合には胚の発生能力を損なわない条件でなければならない。8-cell の発生過程を検討してみると、最終的には高い発生率が得られたが胚盤胞までの発生に時間を使い、胚の生存性に影響を及ぼした可能性も考えられる。これは DMEM の成分や添加した BSA の改良などにより修正可能と考えられる。

DMEM はイーグルの最小必須培地 (Eagle's Minimum Essential Medium) を修正した栄養源が豊富な培地であるが、桑実胚以降の発生が優れた要因としては豊富なアミノ酸の存在が考えられる。この点に関しては、胚盤胞の培養ではアミノ酸を必要とすること [9] や、8-cell までの着床前胚はグルコースの利用効率が低く、エネルギー源としてピルビン酸と乳酸を必要とすること [4] が報告されている。生体内の胚を取り巻く環境は、胚の発生に伴って卵管から子宮へと変化し、胚の体外培養に必要な成分や環境条件も

各発生段階に応じて異なるものと考えられる。卵管液は主要なタンパク質と電解質の組成は血清と同様であるが、乳酸・ピルビン酸・グルコースを含み、卵子および精子の代謝源として機能すると考えられ、子宮液は胚の透明帯からの脱出と着床に必要な成分を含んでいるものと考えられている [10]。

本研究ではキメラ胚 (BALB/c \leftrightarrow C57BL/6J) においても単一の胚と同様に発生速度の遅延が認められた。キメラ胚の発生を経時的に検討すると、胚盤胞への発生率は培養 12 時間で 0%, 24 時間で 25.4%, 36 時間で 80.4% となり、24 時間後における胚盤胞と、36 時間後における拡張胚盤胞への発生率において、単一胚と比較して有意な差 ($P<0.025$) が認められ、発生速度の遅延が認められた。また、BALB/c 胚同士および C57BL/6J 同士の集合胚の発生率もキメラ胚と同様な結果を示し、2 系統間において胚の発生段階が同じであれば、集合の組み合わせによる発生率に差は生じないと見える。

集合法による生体キメラマウスの作出は、特に、8-cell 同士の集合が一般的に行われているが、これは、8-cell 以降の特徴である細胞の接着性 (cell adhesiveness) の増加 [5] や、間隙結合 (gap junction) [2, 6] などにより急速に集合が起こり易くなるためと説明されている [1, 8]。マウス胚では 8-cell 以降に胚の収縮 (compaction) が生じ [12]、集合そのものが阻害されるようになる。本実験で行った 16-

cell 同士の集合では、11.1%の胚が統合せずに発生し、統合胚への発生率を低下（84.7%）させた。4-cell 同士の集合胚については単一の胚と同様に培養時間の長いことが影響して発生率が低下したと考えられる。

最終的な胚の発生率は高率であったが、他の培地の報告と比較して発生に時間を要した [7, 15]。使用した DMEM は 8-cell 以前の胚の培養では発生速度の遅延が生じ、16-cell 以降の胚の培養には適することが示唆された。

文 獻

- 1) Burgoine, P.S. and Ducibella, T. (1977): Changes in the properties of the developing trophoblast of preimplantation mouse embryos as revealed by aggregation studies. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 40, 143–157.
- 2) Goodall, H. and Johnson, H. (1982) : Use of carboxyfluorescein diacetate to study formation of permeable channels between mouse blastomeres. *Nature, Lond.*, 295, 524–526.
- 3) 乾 嘉孝, 高橋寿太郎, 安田泰久 (1989) : マウスにおける非同調キメラ胚の発生能, 哺乳卵研誌, 6, 113–118.
- 4) Iyengar, M.R., Iyengar, C.W.L., Chen, H.Y., Brinster, R.L., Bornslaeger, E. and Schultz, R.M. (1983): Expression of creatine isoenzyme during oogenesis and embryogenesis in the mouse. *Dev. Biol.*, 96, 263–268.
- 5) Kimber, S.J., Surani, M.A.H. and Barton, S.C. (1982): Interaction of blastomeres suggest changes in cell surface adhesiveness during the formation of inner cell mass and trophectoderm in the preimplantation mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 70, 133–152.
- 6) McLachlin, J.R., Caveney, S. and Kidder, G.M. (1983): Control of gap junction formation in early mouse embryos. *Dev. Biol.*, 98, 155–164.
- 7) Mintz, B. (1971): In method in mammalian embryology (Daniel J.C. Jr., ed.), pp. 186–214, Freeman, San Francisco.
- 8) Mulnard, J.G. (1971): Manipulation of cleaving mammalian embryo with special reference to a time-lapse cinematographic analysis of centrifuged and fused mouse eggs. *Adv. Biosci.*, 6, 255–274.
- 9) Sellens, M.H., Stein, S. and Sherman, M. (1981): Protein and free amino acid content in preimplantation mouse embryos and blastocysts under various culture conditions. *J. Reprod. Fert.*, 61, 307–315.
- 10) 妹尾左知丸, 加藤淑裕, 入谷 明, 鈴木秋悦, 舘 邦 (1981) : 哺乳動物の初期発生 基礎理論と実験法. pp. 134–136, 215–221, 理工学社, 東京.
- 11) 添田 聰, 高橋寿太郎, 安田泰久 (1989) : 集合胚の移植によるキメララットの作出. 日本畜産学会東北支部会報, 3, 116–118.
- 12) Sutherland, A.E. and Calarco-Gillam, P.G. (1983): Analysis of compaction in the preimplantation mouse embryo. *Dev. Biol.*, 100, 328–338.
- 13) 高橋文明, 藤代克彦, 高橋寿太郎, 安田泰久 (1986) : ラットとマウスにおける集合キメラ胚の作成. 哺乳卵研誌, 1, 30–31.
- 14) Tarkowski, A.K. (1961): Mouse chimaeras developed from fused eggs. *Nature, Lond.*, 190, 857–860.
- 15) Whitten, W.K. (1957): Culture of tubal ova. *Nature, Lond.*, 179, 1081–1082.

Culture of Chimeric Mouse Embryos in a Dulbecco's Modified Eagle Medium

Masahiro Takahashi, Yumi Ishihara, Jutaro Takahashi and Yasuhisa Yasuda

Laboratory of Animal Breeding and Reproduction, Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka 020, Japan

In the present study, preimplantation development of chimeric mouse embryos cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) was examined by using 4 to 16-cell stage aggregated embryos. Three types of embryos, embryos with intact zona, zona-free embryos and aggregated chimeric embryos (BALB/c↔C57BL/6J), were cultured for 60 h *in vitro*. Aggregated embryos, 4-cell↔4-cell, 8-cell↔8-cell and 16-cell↔16cell developed into an integrated blastocyst at percentages of 82.2, 89.1 and

84.7, respectively. Development of chimeric embryos into morula was delayed about 12 h more than that of intact embryos, but high rates of developmental of chimeric embryos from morula into blastocyst were obtained. These results suggested that DMEM was suitable for the *in vitro* culture of chimeric mouse embryos.

Key words: Chimeric mouse embryos, DMEM, Development of embryos.