

種々の組織培養液を用いたウシ体外受精胚の作出

馬場 彩・鈴木 達行

山口大学農学部獣医学科畜臨床繁殖学研究室 山口市 〒753-8515

要旨:本研究ではこれまで報告してきた各種の組織培養液を用いてウシ体外受精を行い、胚の発生率を比較検討した。ウシ卵母細胞の体外成熟と発生を目的にTCM-199, Brinster, Ham'sF-10, mCR1aa, mBavister, mSOFの各培地を用い、BO液を媒精に用いた。その結果TCM-199, mBavisterとmSOFにおける分割率と胚盤胞率がそれぞれ80.6%と33.2%, 49.5%と25.7%, 59.8%と19.0%の割合になった。これに対してBrinster, Ham'sF-10とmCR1aaでは、それぞれ31.6%と0%, 38.3%と0%, 36.0%と9.9%となり前者のグループに比べて低かった。次にmBavister液を用い、グルコースの添加、無添加別に胚の発生を比較したところ、胚盤胞率がそれぞれ25.7%と15.7%となり前者で有意($p < 0.05$)に高かった。またBO液又はmSOFを媒精液として用いた実験での胚の分割率と胚盤胞率はそれぞれ59.8%と70.0%, 19.0%と20.6%となり両者に差異はみられなかった。このことからTCM-199, mBavister並びにmSOFは体外成熟、体外発生に有効であること、mBavisterの発生培地へのグルコース添加はその後の胚の発生に有効であること、mSOFは体外受精においてBO液と同様の効果のあることが明らかにされた。

キーワード:グルコース、培養液、ウシ胚、IVF、Bavister。

一般に、ウシ体外受精における操作過程では組織培養液のTCM-199 (Earle's塩) [8] が用いられるが、研究室によってはSOF (Chemically defined medium) [17] や核融合胚の発生培地として開発されたCR1aa [12] などが用いられている。このように哺乳類の体外成熟、受精、発生を目的として様々な培養液が用いられているが、これらの組織培養液を用いてウシ胚の発生を比較検討した報告は数少ない。そこで本研究では一般に組織培養液として用いられているTCM-199, SOF, CR1aa, Ham'sF-10と、これまでウシの体外成熟、発生培地として用いられた例のないBavisterやBrinster培地 [2] を修正して用い、ウシ胚の体外発生の有効性を比較検討した。また修正したBavister培地の発生培地内にグルコースを添加した例と添加しない例での胚の発生状況を比較した。さらに修正SOF液を用い、体外成熟、受精、発生の全行程を同一の培地で行った場合と、媒精液とし

てBO液 [3] を用いた場合の体外発生の割合を比較検討したので、その概要を報告する。

材料と方法

食肉処理場で得られた卵巢を生理食塩水に浸し、約30°Cに保温して研究室に持ち帰り、18G針付き注射器で直径2~7mmの大卵胞より卵母細胞を吸引した。採取した卵胞液は10mlセラピック (小野薬品工業製)に集めてエンブリオテック液 (日本全薬工業製)で洗浄後、静置して得られた沈殿物を90×20mmシャーレ (ニッスイ製薬製)に移し、実体顕微鏡下で卵母細胞を採取した。卵母細胞は卵丘細胞が付着し細胞質が形態的に均一で良値なものを選別して用いた。成熟培養液として5%の不活性過剰排卵処置ウシ血清 (superovulated cow serum; SCS) [1, 7] と0.01mg/mlブタ由来卵胞刺激ホルモン (Follicle stimulating hormone, FSH), 50μg/mlゲンタマイシンを添加した各種組織培養液を3.5×5mmのプラスチック製シャーレ (FALCON社製)内に準備した。次いで卵母細胞をこれらの各種成熟培養液内に入れ、38.5°C, 5%CO₂気相条件下で22時間培養した。媒精はキメラウシ [14] 凍結精液を融解後5mMカフェイン、0.6%BSA (bovine serum albumin), 10μg/mlヘパリン、50μg/mlゲンタマイシンを含むBO液で希釈し、精子濃度が2×10⁶/mlになるよう調整した。この精子液を用いて100μlの精子ドロップを作成し、成熟卵母細胞を1精子ドロップにつき約10個入れて38.5°C, 5%CO₂気相条件下で5時間媒精した。

発生培養は各種組織培養液に5%SCS, 5μg/mlインシュリン、50μg/mlゲンタマイシンを添加し、4-well multidish (NULUCRON, Denmark)の各wellに500μlずつ入れ、これに媒精を終えた卵母細胞を20~30個ずつ入れて行った。この時点で細胞質が特に異常と思われる卵母細胞は培地から除去した。媒精48時間後、ビベッティングによりシャーレ底面に付着した卵丘細胞層より胚を遊離し、共培養した [9]。各試験区とも受精を行った日を0日として48時間後に分割率、9日目に胚盤胞率を確認した。

統計処理: 分割率並びに胚盤胞への発生率についてはそれぞれ χ^2 検定を行った。また期待値が5以下のものにはFisherの直接確率法で検定を行った。

実験1: 成熟培養液、発生培養液として25mM HEPES緩衝Earle型TCM-199 (TCM-199) (GIBCO製), m-SOF, m-CR1aa, m-Bavister (Table 1), 25mM HEPES緩衝Ham'sF-

(受付 1997年12月22日／受理 1997年12月26日)

別刷請求先: 〒753-8515 山口市吉田1677-1

山口大学農学部獣医学科畜臨床繁殖学研究室

Table 1. Composition of m-Bavister

Component	Concentration (mg/l)
NaCl	7,032
KCl	176
CaCl ₂ ·2H ₂ O	233
KH ₂ PO ₄	50
MgSO ₄ ·7H ₂ O	95
NaHCO ₃	2,250
Sodium pyruvate	21
MEM (EAA)	10 ml (100 ml 中)
MEM (NEAA)	10 ml (100 ml 中)

10 (Ham'sF-10) (GIBCO 製), Brinster's BMOC-3 (GIBCO 製) (Brinster) を用い、各組織培養液の有効性を確認した。

実験2: 成熟、発生培地として m-Bavister を用い、発生培地へのグルコース (4.9 mM) 添加区と無添加区を設け、グルコースが胚の発生に及ぼす影響を調べた。

実験3: 成熟、受精、発生培地として m-SOF を用い、体外受精において BO 液と m-SOF を媒精液とした場合の胚発生の比較を行った。

結果

実験1: 胚の分割率は TCM-199 が他の区に比べて有意 ($p < 0.01$) に高かった。m-SOF と m-Bavister 間には差異が認められなかったが、m-CR1aa, Ham'sF-10, Brinster に比べて有意 ($p < 0.01$) に高かった。m-Bavister と Ham'sF-10 間には分割率に差異は認められなかったが、m-CR1aa, Brinster に比べて有意 ($p < 0.05$) に高い結果となった (Fig. 1)。

胚の胚盤胞率は TCM-199 と m-Bavister 間、m-Bavister と m-SOF 間においては有意差はみられなかったが、この 3 区は他の区に比べ有意に高い結果となった。Ham'sF-10, Brinster では胚盤胞の発生がみられなかった (Fig. 2)。

実験2: 分割率ではグルコース添加区と無添加区との間に有意差は認められなかったが、胚盤胞率においてグルコース添加群が有意 ($p < 0.05$) に高い結果となった (Fig. 3)。

実験3: 分割率と胚盤胞率では m-SOF と BO 液間に差異は認められなかった (Fig. 4)。

考察

実験1で示したように、血清を添加した組織培養液では TCM-199 培地が他の区に比べて分割率が高く安定であった。このことは受精に至る卵母細胞の成熟プロセスが有効に機能したことを見えている。卵母細胞の成熟にアミノ酸の関わっていることが報告 [12, 15] されており、このことがアミノ酸を含まない Brinster 液における分割率の低下や胚盤胞率への未発生の原因になったと思われる。しか

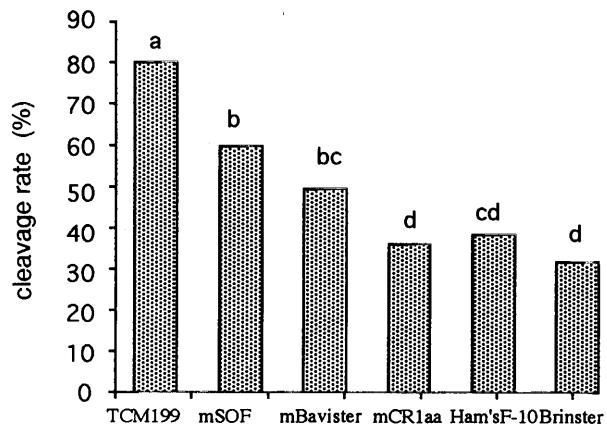


Fig. 1. The effect of various media on the cleavage rate. Values with different superscripts are significantly different (a-b, b-c, b-d; d-c; p<0.01, c-d; p<0.05).

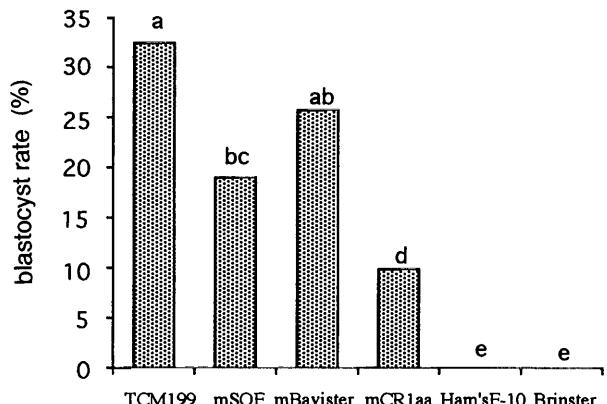


Fig. 2. The effect of various media on the blastocyst rate. Values with different superscripts are significantly different (a-d, a-e, b-d, b-e, d-e; p<0.01, a-b, c-d; p<0.05).

し m-CR1aa や Ham'sF-10 にはアミノ酸が含まれているにもかかわらず分割率や胚盤胞率への発生が低かった。CR1aa は無血清培地として、特に核融合後の培養に有効に活用されている [12, 15] が、TCM-199 培地に比べれば胚発生能力が劣る結果であった。小西と青柳 [5] は発生培地として CR1aa 培地と TCM-199 培地に 5% 子ウシ血清を添加して核融合胚の発生を比較したところ、前者で有意に高い胚盤胞率を得ており、本研究とは違った結果を得ている。いずれにせよ本研究での胚盤胞の発生をみると TCM-199 が安定して高く、次いで m-Bavister, m-SOF の順であった。これらのことから TCM-199 培地に含まれ、他の培地に含まれていないアデニンなどの核酸誘導体、グルタチオンなどの組成が胚の成熟や発生に関与しているものと推測され、その添加によって各組織培養液の発生を高めることができる

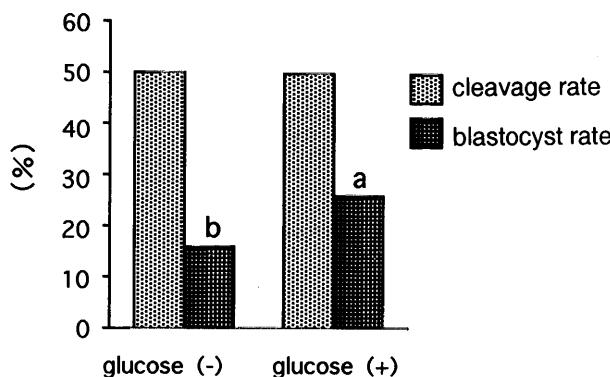


Fig. 3. The effect of glucose in m-Bavister medium on embryo development. Values with different superscripts are significantly different (a-b; p<0.05).

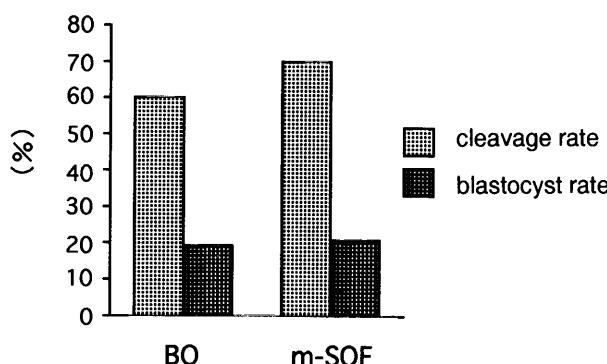


Fig. 4. The effect of m-SOF medium on embryo development after IVF in BO and m-SOF medium.

と考えられた。

Takahashi と First [15] は TCM-199 培地に含まれる 5.56 mM のグルコースはマウスの卵管内濃度に近く、ウシの卵管内濃度 (0.05 ~ 0.2 mM) より高いため、初期胚の発生を阻害すると報告している。Robl ら [11] は受精後 72 時間でのグルコースの添加は胚盤胞への発生を促進したと述べており、Javed と Wright [4] はウシ胚のグルコース利用は 6 ~ 16 細胞期では低いが、桑実胚で著しく増加したと報告している。本研究では実験 2 に示すように、m-Bavister 培地に添加した 4.9 mM のグルコースは胚盤胞への発生ステージの進行を支持し、これらの報告に一致するものであった。しかしエネルギー源としてのグルコース利用は 8 細胞から桑実胚以降に活発になると思われるため、グルコースを添加する時間を詳細に検討する必要があると考えられた。

胚におけるグルコースの代謝メカニズムは Rieger [10] によって報告されており、主なグルコース代謝は pentose-phosphate pathway (PPP) と Embden-Meyerhof pathway (EMP) で行われている。初期胚では好気性反応である PPP

で主にグルコースが代謝されるが、胚発生が進むにつれて PPP 活性は下がり、嫌気性反応である EMP 活性が増加する。グルコースはヒポキサンチン、酸素とともに胚発生に有害な O₂ ラジカルの細胞内生産を増加させるといわれておらず、これには PPP が関与していると思われる。このため研究者によれば 5% O₂ など低酸素条件下で共培養なしに胚発生を行い、良好な成績を得ている [16]。本研究では 5% CO₂, 21% O₂ 濃度での実験を行っており、今後は酸素濃度の違いによるグルコースのエネルギー代謝についても検討を加えたい。

体外受精での組織培養液は通常成熟と発生培養では同一のものが用いられるが、媒精液には一般に BO 液が用いられる。理想としては媒精液も成熟と発生に用いられるものと同一のものが望ましい。実験 3 では m-SOF を体外成熟、受精、発生の全プロセスを一貫して用いた場合と媒精のみを BO 液に変更して用いた場合とを比較した。その結果、分割率や胚盤胞率に差異は見られなかった。しかし Suzuki ら [13] は体外成熟、受精、発生の各プロセスを TCM-199 培地を用いて行った場合と、受精のみを BO 液で行った場合とを比較したところ、TCM-199 にはグルコースが含まれていたためか分割率、胚盤胞率において後者が有意に高かったと報告している。このように媒精液にグルコースの含まれることが受精率を低める [6] のであれば、TCM-199 培地を基礎培養液とした場合グルコース無添加の同一培地で媒精が可能と思われる。今後これらの培地を用いてさらに詳細な検討を加えたい。

文 献

- Boediono, A., Takagi, M., Saha, S. and Suzuki, T. (1994): Influence of Day-0 and Day-7 Superovulated cow serum during development of bovine oocytes *in vitro*. *Reprod. Fertil. Dev.*, 6, 261–264.
- Brinster, R.L. (1965): Studies on development of mouse embryos *in vitro*, IV. Intraction of enegy source. *J. Reprod. Fertil.*, 10, 227–280.
- Brackett, B.G. and Oliohant, G. (1975): Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. of Reprod.*, 12, 260–274.
- Javed, M.H. and Wright, R.W., Jr. (1991): Determination of phosphate and enbden—meyerhof pathway activities in bovine embryos. *Theriogenorogy*, 35, 1029–1037.
- 小西正人・青柳敬人 (1994)：ウシ体外受精由来胚の胚盤胞への発育に関する合成培地の検討. *J. Reprod. dev.*, 40 (5), 1–4.
- Leifried-Rutledge, M.L., Crister, E.S. and First, N.L. (1985): Fertilization potential of follicular oocytes classified by stage of cycle and size of follicle. *Theriogenorogy*, 23, 753–759.
- Matsuoka, K., Sakata, S., Ichino, K., Shimaya, Y. and Suzuki, T. (1992): Effect of superovulated cow serum for culture of bovine oocytes to the blastocyst stage. *Theriogenorogy*, 37, 254.
- Morgan, J.F., Morton, H.J. and Parker, R.C. (1950):

- Initial studies on a synthetic medium Proc. of the Society for Experimental Biology Medicine, 73, 1–8.
- 9) Nakano, H. and Nakatsuji, N. (1990): Effects of co-culture, medium components and gas phase on *in vitro* culture of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine embryos. *Theriogenology*, 33 (3), 591–600.
 - 10) Rieger, D. (1992): Relationships between energy metabolism and development of early mammalian embryos. *Theriogenology*, 37 (1), 75–93.
 - 11) Robl, J.M., Dobrinsky, J.R. and Duby, R.T. (1991): The effect of protein supplements, phosphate and glucose on the *in vitro* development of IVM-IVF bovine oocytes. *Theriogenology*, 35 (1), 263.
 - 12) Rosenkrans, C.F., Jr. and First, N.L. (1991): Culture of bovine zygotes to the blastocyst stage: Effect of amino acids and vitamins. *Theriogenology*, 35 (1), 266.
 - 13) Suzuki, T., Yamamoto, M., Ooe, M., Nishikata, T., Okamoto, K. and Tsukihara, T. (1991): Effect of media on fertilization and development rates on *in vitro* fertilized embryos and, of age and freezing of embryos on pregnancy rates. *Theriogenology*, 35 (1), 278.
 - 14) 鈴木達行 (1996) : 野生動物の家畜化と改良. 養賢堂.
 - 15) 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.
 - 16) Takahashi, Y., Hishinuma, M., Matsui, M., Tanaka, H. and Kanagawa, H. (1996): Development of *in vitro* matured/fertilized bovine embryos in a chemically defined medium: Influence of oxygen concentration in the gas atmosphere. *JVMS*, 58 (9), 897–902.
 - 17) Tervit, H.R., Whittingham, D.G. and Rowson, L.E.A. (1972): Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fertil.*, 30, 493–497.

Production of Bovine IVF Embryos with Various Culture Media

Aya Baba and Tatsuyuki Suzuki

Department of Veterinary Science, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yamaguchi 753-8515, Japan

The objective of this study is to produce bovine IVF embryos by using various culture media. Cumulus oocyte complexes (COCs) were matured (22 h) in TCM-199, Ham'sF-10, Brinster, m-CR1aa, m-SOF and m-Bavister, respectively. The COCs were transferred into BO medium, and exposed to sperm for 5 h. Fertilized COCs were cultured for 9 days in the various culture medium mentioned above (Experiment 1). The proportions of embryos cleaved and blastocysts were higher with TCM-199 (80.6% vs 33.2%), m-Bavister (49.5% vs 25.7%) and m-SOF (59.8% vs 19.0%) than Ham'sF-10 (38.3% vs 0%), Brinster (31.6% vs 0%) and m-CR1aa (36.0% vs 9.9%), respectively. The use of m-Bavister with glucose

for IVC were associated with a significantly higher ($p<0.05$) rate of blastocyst development (25.7% vs 15.7%) (Experiment 2). COCs were matured in m-SOF. The COCs were fertilized in BO or m-SOF medium for IVF (Experiment 3). The proportions of embryos cleaved and blastocysts were not significantly different (59.8 vs 70.0% and 19.0 vs 20.6%). These results indicated that TCM-199, Bavister and m-SOF are effective media for IVM and IVC, glucose is necessary for the development of embryos in IVC media, and m-SOF is favorable to BO for IVF.

Key words: Glucose, Culture media, Bovine oocytes, IVF, Bavister.