

精子の前培養時間がウシ胚の分割、発生と性差に及ぼす影響

野村 雅史・Sumantri Cece・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22時間体外成熟させたウシ卵母細胞を0, 5, 10, 15, 20時間前培養した精子で体外受精し、胚の分割、発生と性差について検討した。卵母細胞はFSH、過剰排卵処置ウシ血清（SCS）加TCM-199培地内で38.5°C, 5%CO₂の条件下で22時間成熟培養した。精子はカフイエンとヘパリンを含むBrackett and Oliphant's液で前培養後、卵母細胞を入れて媒精を5時間行い、5 μg/ml Insulin, 5%SCS加TCM-199のドロップ内で発生培養した。分割率は受精後48時間目に、胚盤胞率は8日目に調べた。性判別は凍結融解胚を1/2に分割し、XYセレクターを用いたPCR後、電気泳動像から性判定した。受精後の分割率は精子を0, 5時間前培養したグループが他のグループよりも有意（P < 0.01）に高く、胚盤胞率では、前培養時間を0時間としたグループが他のグループよりも有意（P < 0.01）に高かった。発生ステージ別に分けた胚盤胞、拡張、脱出中、脱出胚盤胞の各割合は各前培養時間別に差がなかった。また、精子前培養の0, 5, 10, 15時間別に発生した胚盤胞の性別は雄雌別にそれぞれ5:7, 5:7, 5:7, 6:6となり性差はなかった。これらの結果から精子の老化が受精に不利な影響をもたらすこと、精子の前培養時間の長短で胚に性差が誘起されないことが明らかにされた。

キーワード：ウシ胚、精子、体外受精、PCR、性差。

これまでウシの人工授精において発情後、受精が起こる時間帯の相違が性差となって現れるか否かを検討した報告はみあたらない。本研究では精子の受精の早いものが雄に、遅いものが雌になるという仮説をたてて性差が生じるか否かを体外受精により検討した。一般に、受精の場では、遊走性が高く受精能獲得の早い精子の卵母細胞への侵入によって受精が誘起される。このように胚の発生が遊走性が高く、かつ受精能獲得の早い精子の受精に由来すると仮定するならば、受精時間を遅らせることで遊走性が低く、かつ受精能獲得の遅い精子との受精を可能にするはずである。

そこで、本研究では、体外で卵母細胞の成熟時間に合わせて精子の前培養時間を調整することで、性差に変化が生じるか否かを検討し、またこれらの精子の前培養が、受精後の分割と胚盤胞率に及ぼす影響について検討した。

材料と方法

卵母細胞の採取

と畜場由來のウシ卵巣を35°Cに加温した生理食塩水内に採取し、7時間以内に実験室まで搬送した。これらの卵巣は35°Cで保温しておいた10万単位/lベニシリン、0.2 g/lストレプトマイシン加生理食塩水で洗浄後、同液内に保持した。

直径2~5 mmの卵胞から卵母細胞を18G針付5 mlシリジにより吸引採取し、上澄を吸引除去後、修正PBS（エンブリオテック、日本全薬工業製）で1回洗浄後沈降部分をシャーレ内に移し、顆粒層細胞と細胞質の正常な卵母細胞を実験に供した。

成熟培養

成熟培養液として5%SCS (superovulated cow serum) [1], 0.002 AU/ml卵胞刺激ホルモン (FSH, デンカ製薬製), 50 μg/mlゲンタマイシン (Sigma社製) 加TCM-199 (Earle's salt, Gibco社製) を用いて、卵母細胞を2回洗浄後、同液の2 mlを含むシャーレに浸漬し、38.5°C, 5%CO₂の気相条件下で22時間培養した。

体外受精

凍結融解したキメラウシ精子を5 mMカフェイン (Sigma社製), 3.6 単位/mlヘパリン (清水製薬製), 50 μg/ml ゲンタマイシン加 Brackett and Oliphant's (BO) 液 [2] で洗浄 (1,800回転, 5分) 後上澄を除去した。

媒精液として2.5 mM カフェイン, 0.3%BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma社製), 3.6 単位/mlヘパリン, 50 μg/ml ゲンタマイシン加 BO 液を用いて、洗浄したキメラウシ精子を2 × 10⁶ 個/mlに調整後、35 × 10 mm シャーレ内に100 μlドロップを作製し、ミネラルオイル (Sigma社製) で覆い38.5°C, 5%CO₂の気相条件下で0, 5, 10, 15および20時間の5群に分けて前培養を行った。

成熟卵母細胞を、0.3%BSA, 3.6 単位/mlヘパリン, 50 μg/ml ゲンタマイシン 加BO液で2回洗浄後、前述の精子ドロップ内に移し (10個/ドロップ), 5時間媒精を行った。

体外発生培養

体外発生培養液として5%SCS, 5 μg/ml Insulin (和光製薬製), 50 μg/ml ゲンタマイシン加 TCM-199 を用いた。媒

(受付 1997年12月22日／受理 1998年1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

精後、上記培養液で卵母細胞を2回洗浄し、4ウェルマルチディッシュ（NUNCLONTM, Nalge Nunc社製）の1ウェル当たり同液の0.5 mlを含む中に、20～30個移し、38.5°C, 5%CO₂の条件下で8日間培養を行った。体外受精の48時間後に分割率、8日後に胚盤胞率を調べた。またステージ別に、胚盤胞、拡張、脱出中、脱出胚盤胞の各発生割合を調べた。

胚盤胞の凍結保存と融解

受精後8日目の胚盤胞を0.3%BSA、1.8 Mエチレングリコール（Ethylene glycole, EG）加PBS（Gibco社製）で3回洗浄後、0.25 mlプラスチックストロー内に封入し、プログラムフリーザー（ET-1, Fujihira社製）の0°Cに保持したアルコール液相に入れ、-7°Cまでを毎分1°Cの速さで冷却し、植水後同温度で10分間保持した後、-30°Cまでを毎分0.3°Cの速さで冷却し、液体窒素内に保存した。胚の融解はストローを5秒間室温に保持した後、30°Cの微温水中に10秒間浸漬する方法により行った。

性判別

融解した胚を5%polyvinylpyrrolidone（PVP、デンカ製薬社製）加PBS（+）で3回洗浄後、同液の50 μlドロップ内に移し、各胚盤胞をナリッジージマイクロマニピュレーター付きニコンマイクロインジェクター顕微鏡下でマイクロフェザーブレード（フェザー社製）を用いて2, 3等分し、同液の10 μlを含む0.5 ml PCRチューブ内に移し、5 μlのミネラルオイルで覆い、1分間煮沸した後、-20°Cに保存した。

サンプルを融解後、各サンプルにつきA液を9.9 μl、B液を0.1 μlの割合で調整した酵素混合液を9.5 μlずつ加えた。酵素混合液（A,B液）は市販のウシ胚性判別キット、XYセレクター（伊藤ハム社製）を用いた。

遺伝子增幅はPCR装置（Thermal Sequencer TSR-300, 岩城硝子社製）を用いて行った。

ステップ1…95°C, 2分

ステップ2…95°C, 30秒

ステップ3…50°C, 40秒

ステップ4…70°C, 10秒

最初にステップ1→2→3→4の順に進め、次にステップ2→3→4を44サイクル繰り返した。

8 μlのPCR産物と8 μlの色素液（Gel loading dye；25% Glycerol, 0.05% Bromphenol blue, 0.05% Xylene gyanol FF 加蒸留水）をパラフィルム上で混合した後、アガロースゲル（2%Agarose；Nu Sieve, 0.5 μg/ml Ethidium Bromide 加TBE）の穴に注入し、約70分間電気泳動を行った。泳動後、ゲルをUV照射装置にのせて写真撮影した。雄特異的PCR産物と雌雄共通PCR産物の2本のバンドが得られた場合には雄と判定し、雌雄共通PCR産物の1本のバンドのみが得られた場合には雌と判定した[3]。

実験1：受精後48時間の分割率と8日目の胚盤胞率を調べ、各精子の前培養時間の間に差が生じるか否か検討した。

実験2：受精後8日目に各精子の前培養時間別に発生した全胚盤胞のうち発生ステージ別に胚盤胞、拡張、脱出中、脱出胚盤胞の占める割合を求め、各精子の前培養時間別に差が生じるか否か検討した。

検定はいずれも χ^2 検定により行った。

実験3：各精子の前培養時間の0, 5, 10, および15時間別に発生した胚盤胞の性に差があるか否か調べた。検定は比率の検定を行った。

結果

実験1：卵母細胞の分割率は精子前培養時間の0, 5時間別にそれぞれ80.5 (276/343), 77.5% (258/333)となり10, 15時間の61.5 (230/374), 65.7% (157/239)に比べて有意（P < 0.01）に高く、20時間では24.7% (74/299)となり有意（P < 0.01）な低下を示した。胚盤胞率は、0時間で32.1% (110/343)となり5, 10と15時間の22.8 (76/333), 18.4 (69/374), 20.1% (48/239)に比べて有意（P < 0.01）に高かった。また、20時間では8.4% (25/299)となり有意（P < 0.01）な低下がみられた。なお、本実験では分割した卵母細胞に対する胚盤胞率において、各精子前培養時間の間に有意差（P < 0.01）がみられなかったので、胚盤胞率は実験に供した卵母細胞に対する割合で示すことにした（Table 1）。

実験2：胚盤胞への発生割合は20時間で88.0%となり、他の時間区よりも有意（P < 0.01）に高かったが、脱出胚盤胞はみられなかった。拡張胚盤胞は5時間で7.9%の割合でみられ、10 (27.5%)と15時間 (25.0%)に比べて有意（P < 0.01）な低下がみられた。脱出中胚盤胞では各グループ間に有意差はみられず、脱出胚盤胞は20時間の0.0%を除けば、0, 5, 10, 15時間でそれぞれ19.1, 23.7, 8.7, 22.9%となり有意差（P < 0.01）はなかった（Table 2）。

実験3：精子の前培養時間別にみた胚盤胞の性は0, 5, 10および15時間別に雄と雌の割合（実数値）が、それぞれ5:7, 5:7, 5:7, 6:6となり各試験区で性差は認められなかった（Table 3）。

考察

本研究で示したように、精子の前培養を0, 5時間行ったグループでは胚の分割率がそれぞれ80.5%, 77.5%となり、他のグループ（10時間：61.5%，15時間：65.7%，20時間：24.7%）に比べて有意（P < 0.01）に高かった。また胚盤胞率も精子の前培養の0時間のグループでは32.1%となり、他のグループ（5時間：22.8%，10時間：18.4%，15時間：20.1%，20時間：8.4%）よりも有意（P < 0.01）に高かったことから、体外での精子の前培養は短いほど受精率の向上や胚盤胞発生に有利であることが明らかにされた。また、分割した卵母細胞が胚盤胞になる割合には、精子の前培養時間の影響を受けないことが分かった。

臨床の現場における人工授精や過剰排卵処置をした供卵

Table 1. The number of oocytes cleaved and developed into blastocysts

Pre-incubation time (hour)	No. of oocytes examined	No. of oocytes cleaved (%)	No. of blastocysts (%)
0	343	276 (80.5) ^a	110 (32.1) ^a
5	333	258 (77.5) ^a	76 (22.8) ^b
10	374	230 (61.5) ^b	69 (18.4) ^b
15	239	157 (65.7) ^b	48 (20.1) ^b
20	299	74 (24.7) ^c	25 (8.4) ^c

Values with different superscripts are significantly different (^{a-b}, ^{a-c} and ^{b-c}; P<0.01).

Table 2. The rates of development of embryos

Pre-incubation time (hour)	Percentage of blastocyst developed to			
	Young blastocyst	Expanded	Hatching	Hatched
0	58.2 ^b	12.7 ^{ab}	10.0	19.1 ^{ab}
5	63.2 ^{ab}	7.9 ^b	5.3	23.7 ^a
10	56.5 ^b	27.5 ^a	7.2	8.7 ^{ab}
15	47.9 ^b	25.0 ^a	4.2	22.9 ^a
20	88.0 ^a	8.0 ^{ab}	4.0	0.0 ^b

Values with different superscripts are significantly different (^{a-b}; P<0.01).

Table 3. Number of sexed embryos

Pre-incubation time (hour)	Male	Female
0	5	7
5	5	7
10	5	7
15	6	6

ウシへの人工授精で、良好な受胎率や正常胚を得るには、発情後の人工授精の最適期を探し出す必要がある。本研究では精子の前培養を短時間で行った場合に胚の発生が高かったことから体内においても同様に、排卵した卵母細胞と精子の受精時間が長時間に及ばない方が良好な成績となって現れてくるのは明白である。このように、精子の老化が受精率の低下となって現れることから、体外受精における前培養はできるだけ短時間にとどめるべきだと考える。

精子の前培養時間別の胚の発生速度では、各グループ間にばらつきがあるが、精子前培養の20時間を受けた、各間に大きな差異 (P<0.01) はなかった。これは胚の発生速度は精子の前培養時間に影響されないことを示唆している。また各グループで発生した胚盤胞の性判別において性差がみられなかったことから、遊走性と受精能の高い精子が雄になり、その逆の場合には雌になるという我々の仮説は否定された。しかし、DominkoとFirst [4] は体外受精時のウ

シ卵母細胞の受精では分割のかなり早い段階で雄に偏っていると述べており、受精の早い精子が雄に偏る可能性も捨てきれない。

Marquant-Le Guienne ら [5] はウシ胚発生の初期ステージの4~8細胞期では胚の発生の早いもので雄になる確率が高く、後期ステージの小型化桑実胚~拡張胚盤胞の段階でも発生の早いものが雄になる確率が高かったと述べている。またXu ら [6] は受精後8日目における胚のうち初期胚盤胞では雌になる確率が高く、脱出胚盤胞では雄になる確率が高かったと述べている。しかし、体内受精胚では胚の発生で雌雄差は認められなかったという報告 [7, 8] もあり、胚の発生過程でその置かれた環境が性差となって現われてくることが示されている。このように胚の発生速度と性差については、未だ十分に解明されているとは言い難い。本研究では各グループごとの胚について、その発生速度の違いから性別を確認しなかったが、今後、各グループにみる胚の発生速度と性差について詳細な検討が必要と考える。

文 献

- 1) 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. Theriogenology, 37, 254.
- 2) Brackett, B.G. and Oliphant, G. (1975): Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. Biology of Reprod., 12, 260-274.

- 3) Kudo, T., Sato, S. and Sutou, S. (1993): Sexing of bovine embryos with male-specific repetitive DNA by polymerase chain reaction: and cloning and characterization of bovine male-specific repetitive DNA. *J. Reprod. Develop.*, 39, 55–63.
- 4) Dominko, T. and First, N.L. (1997): Relationship between the maturational stage of oocytes at the time of insemination and sex ratio of subsequent early bovine embryos. *Theriogenology*, 47, 1041–1050.
- 5) Marquant-Le Guienne, B., Nibart, M., Guyader, C., Kohen, G., Esposito, L., Thuard, J.M. and Thibier, M. (1992): DNA probe sexing of young *in vitro* fertilized bovine embryos. *Theriogenology*, 37, 253.
- 6) Xu, K.P., Yadav, B.R., King, W.A. and Betteridge, K.J. (1992): Sex-related differences in developmental rates of bovine embryos produced and cultured *in vitro*. *Molecular Reprod. Develop.*, 31, 249–252.
- 7) Gutierrez-Adan, A., Behboodi, E., Anderson, G.B., Medrano, J.F. and Murray, J.D. (1996): Relationship between stage of development and sex of bovine IVF-IVM embryos cultured *in vitro* versus in the sheep oviduct. *Theriogenology*, 46, 515–525.
- 8) King, W.A., Yadav, B.R., Xu, K.P., Picard, L., Sirard, M.-A., Verini Supplizi, A. and Betteridge, K.J. (1991): The sex ratios of bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro*. *Theriogenology*, 36, 779–788.

The Effects of Sperm Pre-Incubation Times on the Cleavage, Development and Sexing of Bovine Embryos

Masashi Nomura, Cece Sumantri and Tatsuyuki Suzuki

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

We assessed the effect of various sperm pre-incubation times (0, 5, 10, 15 and 20 h) on the cleavage, blastocyst rate and sexing of bovine embryos. Cumulus oocyte complexes (COCs) were cultured in maturation medium containing TCM-199 supplemented with 5% superovulated cow serum (SCS), 0.002 AU/ml FSH and 50 µg/ml gentamicin for 22 h at 38.5°C with 5% CO₂. Frozen-thawed spermatozoa were pre-incubated in Brackett and Oliphant's medium containing 2.5 mM caffeine and 3.6 IU/ml heparin at various times. After 5 h of fertilization, the COCs were cultured in culture medium containing TCM-199 supplemented with 5% SCS, 5 µg/ml insulin and 50 µg/ml gentamicin. The cleavage and blastocyst

rates were observed on days 2 and 8. Frozen-thawed blastocysts were bisected and analyzed for sexing by using PCR and XY selector. The cleavage rate was higher ($P<0.01$) in the groups of sperm which were cultured for 0 (80.5%) and 5 h (77.5%) than in the other groups (10 h; 61.5, 15 h; 65.7 and 20 h; 24.7%). The blastocyst rate was higher ($P<0.01$) in the group of sperm which was cultured for 0 h (32.1%) than in the other groups (5 h; 22.8, 10 h; 18.4, 15 h; 20.1 and 20 h; 8.4%). In addition, the sexing rates of blastocysts were not directly related to the *in vivo* sperm culture period.

Key words: Bovine embryo, Spermatozoa, *In vitro* fertilization, PCR, Sexing.