

修正合成卵管液 (m-SOF) に添加した乳酸とグルコースが牛体外受精胚の発生に及ぼす効果

松本 光晴・音井 威重・鈴木 達行

山口大学農学部獣医学科家畜臨床繁殖学教室 山口市 〒753-8515

要旨：本研究ではウシ体外受精の全過程で同一の培養液（修正SOF液）を用い、乳酸とグルコースが胚の発育に及ぼす効果を検討した。実験1では体外成熟、受精、発生培地に乳酸の0, 3.3, 5, 10, 15 mMを、実験2ではグルコースの0, 1.5, 3, 5 mMを添加した。実験3ではグルコースの1.5 mMを体外受精後それぞれ48, 72, 96, 120時間後に添加した。乳酸の添加区間では胚の分割率に差はみられなかったが、胚盤胞率は3.3 mM添加区で34.8%となり、10, 15 mM添加区の18.9, 15.7%に比べて有意($p < 0.05$)に高かった。グルコースは無添加区が66.9%の分割率となり、1.5, 3, 5 mM添加区の41.2, 46.5, 40.3%に比べて有意($p < 0.02$)に高かった。また胚盤胞率は無添加区が35.6%となり、3, 5 mM添加区の16.7, 19.6%に比べて有意($p < 0.02$)に高かった。グルコースの1.5 mMを96, 120時間後に添加した試験区では胚盤胞率がそれぞれ51.6, 50.8%となり、48, 72時間後に添加した試験区の32.0, 33.3%に比べて有意($p < 0.05$)に高かった。

キーワード：グルコース、ラクトース、修正合成卵管液、牛胚、胚発育。

今日、家畜繁殖の研究分野では食肉処理場から得られた牛卵巣から卵母細胞を採取し、*in vitro*での成熟、受精、発生培養によって移植可能な胚盤胞にまで発育させる技術開発が活発に行われている。こうして作出された胚の品質は凍結融解後の生存性や過大胎仔の誕生に大きく係わっている。実際に Galli と Lazzari [1] は体外受精させた牛の初期胚をめん羊の卵管に仮移植することによって胚の品質を高めている。このように体外受精胚が体内受精胚に比べて品質が低下する主な原因是、体外培養条件が体内での胚の発生環境と異なることが考えられる。このため *in vitro*において体外受精した卵母細胞のうち胚盤胞にまで発育する割合は低く、これらの培養系には未だ改善すべき点が多く残されている。一般に *in vitro*における成熟、発生培養の各操作過程では、組織培養液の TCM-199 (Earle's 塩) [2] や SOF (完全合成培養液) [3]、核融合胚の発生培地として開発された CR1aa [4] などが用いられ、体外受精の過程では

Brackett and Oliphant 液 (BO 液) [5] が用いられる。すなわち受精の段階では組成の異なる培養液に卵母細胞と精子が一定時間さらされる。このような環境の変化は少なからず初期胚の発生に影響を及ぼす可能性がある。そのため初期胚のおかれた環境をできるだけ一定に保ち、技術的な煩雑さを避けるためには、同一の培養液で体外受精の全過程を行うことが望ましい。さらに成熟、受精、発生の各過程で胚に必須の成長因子やエネルギー源が体内胚の発生条件に類似した形で添加できれば、胚の分割率や胚盤胞率が向上し、移植により効率的に正常な産仔が得られる可能性がある。そこで本研究では、体外受精の全過程を同一の培養液、修正SOF液を用い、胚の発育にとって重要なエネルギー源である乳酸やグルコースの添加濃度を調整することによって、牛胚の体外発生に及ぼす効果を検討し、さらにグルコースの添加時期が胚の発育に及ぼす効果も併せて検討した。

材料と方法

食肉処理場で得られた牛卵巣を滅菌した生理食塩水に浸し、34～35°Cに保温して研究室に持ち帰った。卵巣を抗生物質 (ストレプトマイシン: 0.2 g/ml, ベニシリン: 100 IU/ml) を添加した滅菌生理食塩水で2～3回洗浄後、滅菌した紙タオル上に取り出し 18 G針付 5 ml 容量のシリンジを用いて、2～5 mm 大の小卵胞より卵母細胞を吸引採取した。全卵巣からの卵母細胞の吸引採取処理が終わるまで、卵母細胞を含む卵胞液は温浴槽内で 35.6°C に置かれた。採取した卵母細胞を含む卵胞液は 10 ml セラピット (小野薬品工業製) 中に集めて 10 分間静置し、上清を除去した後に 50 µg/ml ゲンタマイシンを含むエンブリオテック液 (日本全薬工業製) で洗浄し、さらに 10 分間静置した。次にセラピットの底に集まった沈殿物を格子を描いた 90 × 20 mm 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ており細胞質が形態的に均一で良好なもののみを選別した。体外成熟では、組織培養液として modified synthetic oviduct fluid medium (m-SOF) を用い、この液に 5% の不活性過剰排卵処置牛血清 (superovulated cow serum; SCS) [6, 7] と 0.01 mg/ml 卵胞刺激ホルモン (Follicle stimulating hormone; FSH, アントリノ・10, デンカ製薬製), 50 µg/ml ゲンタマイシンを添

(受付 1999年1月20日／受理 1999年2月2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家畜臨床繁殖学教室

Table 1. Composition of m-SOF

Component	Concentration (mg/l)
NaCl	6,290
KCl	534
KH ₂ PO ₄	162
CaCl ₂	190
MgCl ₂ ·6H ₂ O	100
NaHCO ₃	2,106
Sodium lactate	0.55 ml
Sodium pyruvate	33
Glutamine	375
Insulin	5 (μg/ml)
BME (EAA)	2 ml (100 ml中)
BME (NEAA)	1 ml (100 ml中)
Phenol red	0.1 (mg/ml)

加し、0.22 μm フィルター（MILLIPORE 社製）で濾過滅菌して、3.5×5 mm シャーレ（FALCON 社製）内に約2 ml 入れ、その上面をミネラルオイル（SIGMA 社製）で覆った。卵母細胞を各種成熟培養液で2回洗浄後、これらの成熟培養液に入れ、38.5°C、5%CO₂、95%空気の気相条件下で22時間培養した。体外受精では、液体窒素中に保存したキメラ牛[9]と黒毛和牛の精液を含む凍結ストローを30～32°Cの温水で解凍後、5 mM カフェイン、10 μg/ml ヘパリン、50 μg/ml ゲンタマイシンを含むm-SOF液を添加し、1800×rpm、5分間の遠心分離により精子を洗浄した。洗浄後上清を除去して上記のm-SOF液と、0.6%牛血清アルブミン（bovine serum albumin; BSA）、10 μg/ml ヘパリン、50 μg/ml ゲンタマイシンを含むm-SOF液で等量希釈し、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シャーレ内に100 μl の精子ドロップを作成し、上面をミネラルオイルで覆った。成熟卵母細胞を0.3%BSA、10 μg/ml ヘパリン、50 μg/ml ゲンタマイシンを含むm-SOF液で2回洗浄後1つの精子ドロップにつき約10個の卵母細胞を入れて、38.5°C、5%CO₂、95%空気の気相条件下で5時間媒精を行った。発生培養では、m-SOF液に5%SCS、50 μg/ml ゲンタマイシンを添加した後、4-well multidish（NULUCRON, Denmark）の1wellに0.22 μm フィルターを通して約0.5 ml ずつ入れ、上面をミネラルオイルで覆って発生培養用いた。媒精後、卵母細胞を発生培地で2回洗浄し再び発生培地に移して、38.5°C、5%CO₂、95%空気の気相条件下で培養した。媒精48時間後、ピ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た。この時点で卵丘細胞層はシャーレ底面で単層を形成しており、遊離した胚はさらにこの単層上で継続培養した。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 Stat View 4.0 (Macintosh Software : Abacus Concepts 社) を用いて分析を行った。分析はそれぞれ分散

Table 2. Effect of lactate on development of bovine oocytes fertilized in vitro

Concentration of lactate (mM)	No. of oocytes (%)	No. of cleaved (%)	No. of blastcysts (%)
0	93	47 (50.5)	11 (23.4)
3.3	119	66 (55.5)	23 (34.8) ^a
5	104	52 (50.0)	16 (30.8)
10	123	74 (60.2)	14 (18.9) ^b
15	99	51 (51.5)	8 (15.7) ^b

Values with different superscripts are significantly different (a-b; p<0.05).

Table 3. Effect of glucose on development of bovine oocytes fertilized in vitro

Concentration of glucose (mM)	No. of oocytes (%)	No. of cleaved (%)	No. of blastcysts (%)
0	130	87 (66.9) ^a	31 (35.6) ^c
1.5	136	56 (41.2) ^b	17 (30.4)
3	129	60 (46.5) ^b	10 (16.7) ^d
5	139	56 (40.3) ^b	11 (19.6) ^d

Values with different superscripts are significantly different (a-b, c-d; p<0.02).

分析法を用い、Fisher's PLSD Test により行った。

実験1：体外成熟、受精、発生培養液としてm-SOF液(Table 1)、受精にはキメラ牛の凍結精液を用い、すべての過程において、乳酸を0, 3.3, 5, 10, 15 mMの割合で添加し、胚の発生に与える効果を調べた。

実験2：体外成熟、受精、発生培養液としてm-SOF液、受精にはキメラ牛の凍結精液を用い、すべての過程において、グルコースを0, 1.5, 3, 5 mMの割合で添加し、胚の発生に与える効果を調べた。

実験3：体外成熟、受精、発生培養液としてm-SOF液、受精には黒毛和牛の凍結精液を用い、体外受精後、卵母細胞を発生培地に移した時を0時間としてグルコースの1.5 mMをそれぞれ48, 72, 96, 120時間後に添加して胚の発生に与える効果を調べた。

結 果

実験1：胚の分割率は各試験区間に有意差はみられなかった。分割した胚に対する胚盤胞率では、乳酸の3.3 mM添加区で34.8%となり、10, 15 mM添加区の18.9, 15.7%に比べて有意 ($p < 0.05$) に高かった (Table 2)。

実験2：胚の分割率は、グルコース無添加区が66.9%となり、1.5, 3, 5 mM添加区の41.2, 46.5, 40.3%に比べて有意 ($p < 0.02$) に高く、胚盤胞率は無添加区が35.6%となり、3, 5 mM添加区の16.7, 19.6%に比べて有意 ($p < 0.02$) に高かった (Table 3)。

Table 4. Effect of glucose supplemented at various time after IVF on development of bovine oocytes fertilized in vitro

Time of glucose addition (hours)	No. of oocytes (%)	No. of cleaved (%)	No. of blastocysts (%)
-	112	73 (65.2)	29 (39.7) ^b
48	76	50 (65.8)	16 (32.0) ^b
72	80	51 (63.8)	17 (33.3) ^b
96	96	64 (66.7)	33 (51.6) ^c
120	92	59 (64.1)	30 (50.8) ^c

Values with different superscripts are significantly different (b-c; p<0.05). ^aConcentration of glucose; 1.5 mM.

実験3：分割した胚に対する胚盤胞率は、グルコースの1.5 mMを96, 120時間後に添加した試験区がそれぞれ51.6, 50.8%となり、グルコース無添加区および48, 72時間後に添加した試験区の39.7, 32.0, 33.3%に比べて有意(p<0.05)に高かった(Table 4)。

考 察

一般に、体外受精を目的とした組織培養液に添加される乳酸やピルビン酸、アミノ酸などは初期胚の発生に直接関与するエネルギー源として重要視されてきたが、グルコースは成長した胚がコンパクションを生ずるまでは発生にあまり関与していないことがいわれている[10, 11]。本研究で示したように、胚発生に係る乳酸の効果は、分割率においては濃度の違いによる差はみられなかったが、胚盤胞への発生率は3.3 mM添加区が10, 15 mM添加区に比べて有意に高い成績となった。このことは10 mM以上の乳酸の濃度は、胚の発生を抑制することを示唆している。Edwardら[12]は牛胚について、乳酸が10 mM以上の濃度であっても胚盤胞への発生が阻害されないと述べており、本研究とは異なった結果を示している。しかし、これらの成績の違いは培地を構成する組成の違いから微妙な差となって表われてくるので更に詳細な比較検討が必要と思われる。

修正合成卵管液へのグルコースの添加は、牛初期胚の発生を阻害する結果となった。これはグルコースが牛初期胚の発生に対し有害な作用をもたらすという報告[13]と一致している。本実験での胚盤胞への発生率はグルコース無添加区とグルコース1.5 mM添加区とでは有意差は認められなかつたが、3 mM以上を添加した試験区では胚盤胞へ発生した割合が有意に低下したことから、グルコースの添加濃度が3 mM以上になると胚の発生が顕著に阻害されることが明らかにされた。一方、グルコースの1.5 mMを受精後96時間以降に添加した実験では、胚盤胞へ発生する割合の向上することが確認できた。胚発生培地へのグルコースの添加時期において、Robleら[14]は、受精後72時間、Kimら[15]は、受精後120時間以降での添加が胚盤胞への発生を促進したと述べている。これらの報告と本実験結果における

添加時期の微妙な差は、培養液の組成の違いによって、胚の発生する速度に若干の差が生じたことによるものと思われる。本実験における体外受精後96時間では、前期桑実胚に達しているものが多く観察されており、胚の発生段階における桑実胚の時期において、グルコース要求量が増加し発生に有効に作用しているものと考えられた。また、胚が8細胞期前後の発生段階においては、グルコースは胚の発生に対し抑制的に働いていることが明らかにされた。これは、JavedとWright[16]が牛体外受精胚のグルコースの利用は8-16細胞期では低いが、桑実胚で著しく増加したという報告から支持される。胚におけるグルコースの代謝メカニズムはRieger[17]によって報告されており、そのうち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、胚の発生が進むにつれPPP活性は下がり、嫌気性反応であるEMP活性が増加する。グルコースはヒボキサンチンや酸素などと同様に胚の発生に有害であるO₂⁻の細胞内生産を増加させる[17]といわれており、これにはPPPが関与しているものと思われる。このことから推測すると、牛初期胚のグルコース代謝は胚自体に有害な物質を多く產生し、胚の発育を阻害しているものと思われる。これに対して胚の発生が進んだ段階では有害な物質の产生は抑制され、同時に胚は多くのエネルギー源を必要としてくる。このタイミングに合わせてグルコースを供給すれば、胚盤胞への発生が促されるものと思われる。

文 献

- Galli, C. and Lazzari, G. (1996): Practical aspects of IVM/IVF in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, 42, 371-379.
- 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.
- 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.
- Rosenkrans, C.F. Jr. and First, N.L. (1991): Culture of bovine zygotes to the blastocyst stage: Effect of amino acid and vitamins. *Theriogenology*, 35, 266 (Abstr).
- Brinster, R.L. (1965): Studies on development of mouse embryos in vitro, IV. Intraction energ source. *J. Reprod. Fertil.*, 10, 227-280.
- 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, 261-4.
- 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. *Theriogenology*, 37, 254 (Abstr).
- 鈴木達行・下平乙平 (1985): 発情後7-8日目に採取した供卵牛血清加培養液によるウシ受精卵の体外培養。家畜

- 繁殖誌. 31, 1-4.
- 9) Boediono, A., Takagi, M., Saha, S. and Suzuki, T. (1993): Chimeric blastocysts production using IVF bovine embryo (Holstein-Japanease brown) and cultured in vitro without zonae pellucidae. *Theriogenology*, 40, 1221-1230.
 - 10) Gardner, D.K. and Lane, M. (1993): Embryo culture systems. In: *Handbook of In Vitro Fertilization* (Trounson, A. and Gardner, D.K., eds.), pp 85-114.
 - 11) Bavister, B.D. (1985): Culture of preimplantation embryos: fact and artifacts. *Hum. Reprod. Up.*, 1, 91-148.
 - 12) Edwards, L.J., Batt, P.A., Gandolfi, F. and Gardner, D.K. (1997): Modifications made to culture medium by bovine oviduct epithelial cells: Changes to carbohydrates stimulate bovine embryo development. *Mol. Reprod. Dev.*, 46, 146-154.
 - 13) Furnus, C.C., Matos, D.G., Martinez, A.G. and Matkovic, M. (1997): Effect of glucose on embryo quality and post-thaw viability of in-vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*, 47, 481-490.
 - 14) Roble, 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, 266 (Abstr).
 - 15) Kim, J.H., Funahashi, H., Niwa, K., Okuda, K. (1993): Glucose requirements at different development stages of in vitro fertilized bovine embryos cultured in semi-defined medium. *Theriogenology*, 39, 875-886.
 - 16) Javed, M.H. and Wright, R.W. Jr. (1991): Determination of phosphate and Embden-Meyerhof pathway activities in bovine embryos. *Theriogenology*, 35, 1029-1037
 - 17) Rieger, D. (1992): Relationships between energy metabolism and development of early mammalian embryos. *Theriogenology*, 37, 75-93.

Effect of Glucose and Lactate on Development of In Vitro Produced Bovine Embryos in a Modified Synthetic Oviduct Fluid Medium

Mitsuharu Matsumoto, Takashige Otoi and Tatsuyuki Suzuki

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

The present study was carried out to evaluate the effect of glucose and lactate on in vitro produced bovine embryos using m-SOF medium. In the first and second experiments, cumulus oocyte complexes (COCs) were matured (22 h), fertilized (5 h) and cultured (9 days) in medium containing 0, 3.3, 5, 10, 15 mM lactate or 0, 1.5, 3, 5 mM glucose in m-SOF for in vitro production of embryos. In the third experiment, 1.5 mM of glucose was suspended in m-SOF at 0, 48, 72, 96 and 120 h after IVF. The cleavage rates of embryos were not significantly different among the concentrations of lactate, however the blastocyst production rate was significantly higher ($p<0.05$) with a concentration of 3.3 mM (34.8%) than those of 10 and 15 mM (18.9 and 15.7%, respectively). The cleavage rate of embryos was significantly higher ($p<0.02$) with a concentration of 0 mM of glucose

(66.9%) than those of 1.5, 3, and 5 mM (41.2, 46.5 and 40.3%, respectively). The blastocyst production rate was significantly higher ($p<0.02$) with concentration of 0 mM (35.6%) than those of 3 and 5 mM (16.7 and 19.6%, respectively). When the embryos were cultured in m-SOF suspended with 1.5 mM of glucose at 48, 72, 96 and 120 h after IVF, the blastocyst production rates were significantly higher ($p<0.05$) at 96 and 120 h (51.6 and 50.8%) than those of 48 and 72 h (32.0 and 33.3%). These results indicate that 3.3 mM of lactate was more effective than that of other concentrations for in vitro embryo production, and that glucose inhibited embryonic development in early stage embryos, but sustained their post-morula stage.

Key words: Glucose, Lactate, m-SOF, Bovine embryo, Embryonic development.