

体外受精後の培養条件がその後のウシ初期胚 発生率に及ぼす影響

福島護之*・野田昌伸*・太田垣 進**

要 約

共培養を行わない培養条件で、授精72時間目までの培養液 (M-199, SOF及びHECM-3) と血清添加の有無が、その後のウシ体外受精胚の発生率及び構成細胞数に及ぼす影響を比較検討した。

- 1 授精72時間目までの培養液にSOFあるいはHECM-3を用いることにより分割率、8細胞及び胚盤胞への発生率は、M-199区を用いる場合と比較して有意に向上した。また、授精72時間目までの培養液が授精72時間日以降の胚発生にも影響を及ぼした。
- 2 胚盤胞の総細胞数と内部細胞塊を構成する細胞数は、SOF区とHECM-3区がM-199区より多く、授精72時間目までの培養液としてこれら2種が利用できることが確認された。

Effects of Culture Conditions on Developmental Ability of Bovine IVM-IVF-IVC Embryos

Moriyuki FUKUSHIMA, Masanobu NODA and Susumu OHTAGAKI

Summary

This study describes the effects of culture medium (M-199, SOF and HECM-3) and addition of serum on the developmental ability, the total cell number and proportion of inner-cell mass cells in IVM-IVF-IVC bovine blastocysts without co-culture.

- (1) At 72 hrs after insemination, the embryos cultured in SOF or HECM-3 developed to the 8-cell stage at a significantly higher ($P < 0.05$) rate than that in M-199.
- (2) The total cell number and the inner-cell mass cell number of blastocysts cultured in SOF and HECM-3 were significantly different from in M-199 ($P < 0.05$). We conclude that SOF and HECM-3 can support the early development of bovine embryos to the 8-cell stage.

キーワード：牛卵母細胞，体外受精，体外培養，胚盤胞，内部細胞塊細胞数，合成卵管液

緒 言

前報³⁾で、卵丘細胞との共培養条件で媒精72時間目までの培養液を合成卵管液 (以下SOFと呼ぶ) にすると8細胞期の発生率が上昇し、その後の胚盤胞率も向上すること及び媒精72時間目以後に組織培養液M-199を用いることによって、ウシ体外受精由来胚盤胞の総細胞数に対する内部細胞塊 (以下ICMと呼ぶ) 細胞数の割合が増加することを報告した。一方、ウシ初期胚の体外培養には卵丘細胞あるいは卵管上皮細胞などとの共培養が必要とされていた。しかしながら近年、ほ乳動物初期胚の培養において共培養を用いない条件あるいは血清を含まない完全合成培地を用いた条件が検討され^{1, 5, 8-11, 15)},

胚発生にかかわる要因の解析が行われるようになってきた。このような共培養条件の要因解析や、各種成長因子の効果判定のためには、共培養を行わず、血清などのunknown factorを含まない培養条件を確立しておくことが必須となる。

本研究では共培養を行わない培養条件で、授精72時間目までの培養液が、その後のウシ体外受精胚の発生に及ぼす影響を比較検討した。特に、胚の発生率と同時に、胚の品質の指標となる胚盤胞のICM細胞数及び総細胞数に対するICM細胞の割合を計測し、血清の添加の有無と培養液による影響を比較した。

本研究を実施するにあたり御協力いただいた兵庫県食肉センターの関係各位に感謝する。

1996年8月30日受理

* 北部農業技術センター ** 現中央農業技術センター

材料及び方法

未成熟卵母細胞の体外培養, 体外受精条件は既報^{3, 4)}に準じた。

初期胚の体外培養については以下のとおりとした。

SOFは, Tervitら¹⁴⁾のSOFからブドウ糖を除き, ウシ血清アルブミン(以下BSAと呼ぶ)とピルビン酸ナトリウム量を修正したTakahashi and First¹²⁾の用いた培養液を使用した。合成培養液HECM-3は, Barnett and Bavister¹¹⁾がハムスター胚の培養に用いた培養液のうちポリビニルアルコール(以下PVAと呼ぶ)を1.0 mg/ml BSAに修正して用いた。SOF及びHECM-3の組成は, Table 1に示すとおりで, 培養には非働化した1%子牛血清(三菱化成)を添加して用いた。

体外受精後5時間目に卵子透明帯直径よりもやや小さい約130 μ mの滅菌パスツールピペットを用いて, ピペッティングにより卵丘細胞を裸化し, 5種類の培養液に移し換えた。使用した培養液は, SOFとHECM-3に1%子牛血清を添加あるいは無添加としたものと, M-199に1%子牛血清を添加したものの5種類とした。授精後72時間目に, M-199に1%子牛血清を添加した培養液に交換し, その後48時間毎に同じ培養液で培地交換して, 授精後8日目まで培養した。

その間, 授精72時間目の胚発育状況と授精6~8日目の胚盤胞数を記録し, 一部の胚盤胞の総細胞数と将来胎児を構成するICMの細胞数を計測した。なお, ICMの細胞数の計測法についてはIwasakiら⁷⁾の方法により実施した。

胚の発生率の統計処理には, Dancan's new multiple range test⁶⁾を用いた。

結 果

Table 2に胚の発生結果を示した。それぞれ129~131個の卵を供試した。授精72時間目の胚の分割率は, SOF

の血清無添加区が他区に比較して有意に高い発生率であった($P<0.05$)。また, M-199は, SOFの両区とHECM-3の無血清区と比較して有意に低い分割率を示した($P<0.05$)。HECM-3とSOFの両培養液で, 血清添加によって分割率が低下した。

8細胞への発生率は, M-199の32%が他区の47~55%と比較して有意に低い結果であった($P<0.05$)。

授精6~8日目の胚盤胞の発生率においても, M-199区が16%と他区の31~40%と比較して有意に低い値であった($P<0.05$)。

各試験区による授精7日目の胚盤胞の総細胞数とICM細胞数をTable 3に示した。総細胞数ではHECM-3の血清添加区が142 \pm 29個とM-199区とSOFの血清無添加区に比較して有意に多く, M-199区が80 \pm 32個と他区よりも有意に少なかった($P<0.05$)。

ICMの平均細胞数はHECM-3の両区とSOFの血清添加区が33~37個とM-199区の21個に比較して有意に多かった($P<0.05$)。しかしながら, ICMの総細胞数に対する割合は, 24.8~27.8%で各区间で有意差は認められなかった。

考 察

これまで, 体外培養の基礎培養液としてはM-199が多く使用されてきた。他の培養細胞との共培養条件下においてFukuiら²⁾は, Tervitら¹⁴⁾がヒツジ用に調整した合成卵管液(SOF)が, ウシ初期胚の基礎培養液として良好であることを報告した。Fukuiら²⁾は, 胚の発生率と細胞数を計測した結果, SOFがM-199とは差異がないとしている。一方, Fukushimaら⁴⁾は, 胚の発生率と細胞数の計測にあわせて, Iwasakiら⁷⁾の方法でICMの細胞数と総細胞数に対するICM細胞数の割合も考慮して培養系の評価をした。その結果, SOFのみで培養した場合, 総細胞数では他の区と有意差はないものの, ICM細

Table 1. Composition of SOF and HECM-3

Component	SOF	HECM-3
NaCl	107.70mM	113.8mM
KCl	7.16	3.0
KH ₂ PO ₄	1.19	—
CaCl ₂	1.71	1.9
MgCl ₂	0.49	0.46
NaHCO ₃	25.07	25.0
Sodium lactate	3.30	3.5
Sodium pyruvate	0.30	—
L-glutamine	—	0.2
BSA	3.0mg/ml	1.0mg/ml

Table 2. Effects of SOF, HECM-3 and M-199 on the developmental ability of bovine embryo fertilized in vitro

Culture medium	Serum	No of embryos	No (%) of embryos		
			Cleaved	8-cell<	Bl.
M-199	+	129	87 (67.4) ^c	41 (31.8) ^b	20 (15.5) ^b
HECM-3	+	131	102 (77.9) ^{b,c}	70 (53.4) ^a	41 (31.3) ^a
HECM-3	-	131	111 (84.7) ^b	61 (46.6) ^a	50 (38.2) ^a
SOF	+	129	105 (81.4) ^b	66 (51.2) ^a	51 (39.5) ^a
SOF	-	129	120 (93.0) ^a	71 (55.0) ^a	52 (40.3) ^a

a, b, c: The different superscripts are significantly different in the same column ($P<0.05$).

Table 3. Total cell number and proportion of inner cell mass (ICM) of bovine blastocyst derived from each culture system.

Culture medium	Serum	No. of embryos	No. of cells (Mean \pm S.D.)	
			Total	ICM (%)
M-199	+	6	80 \pm 32 ^c	21 \pm 4 ^b (25.8)
HECM-3	+	18	142 \pm 29 ^a	37 \pm 10 ^a (26.2)
HECM-3	-	18	134 \pm 40 ^{a,b}	33 \pm 12 ^a (24.8)
SOF	+	17	123 \pm 26 ^{a,b}	34 \pm 14 ^a (27.8)
SOF	-	15	114 \pm 31 ^b	31 \pm 10 ^{a,b} (26.8)

a, b, c: The different superscripts are significantly different in the same column ($P < 0.05$).

胞数の総細胞数に対する割合がM-199のみで培養した場合に比較して有意に少ないことから、培養条件を比較する場合には、単に総細胞数の比較のみではなく、細胞構成も同時に把握する必要があることを示唆している。また、胚の発生率については授精の72時間目までの培養液が大きく影響を及ぼし、分化の始まった胚の細胞構成、特にICMの形成には授精の72時間目以後の培養液が大きく関与していることから、良質の胚を効率良く作出するには、初期胚の培養において、胚のステージに応じて培養液を変更する必要があるとしている⁴⁾。また、牛においては、8細胞期の頃に蛋白合成のためのm-RNAが母性由来から胎児由来にきりかわることが報告されており¹³⁾、培養液を変更することは、有効と考えられた。

そこで、本試験では培養液の効果を明確にするため、共培養を用いない条件下での授精72時間目までの培養液がその後の胚発生に及ぼす影響を比較検討した。授精72時間目の分割率は、SOFの血清無添加区が他区に比較して有意に高く、M-199区が他区に比較して有意に低かった。

PinyopummintrとBavister⁹⁾は血清の添加は、初回の分割においては抑制効果があるものの、桑実期のコンパクションと胞胚腔形成においては促進効果のあるという2面性を持つことを報告している。彼らが用いた10%子牛血清に比較して本試験での血清濃度は1%と、少量の添加であったが、HECM-3とSOFの両培養液で、血清添加区の初回分割の抑制が認められた。

8細胞以上及び胚盤胞への発生率は、M-199区が他区に比較して有意に低かった。Takahashi and First¹²⁾は、ブドウ糖の添加量を0.56mM以上とすることにより桑実胚又は8細胞期胚の胚発生が抑制されることを報告している。一方、Matsuyamaら⁸⁾は、授精1～3日目胚では0.188mMが、授精4～8日目では1.5mMが最適としている。今回、対照区としたM-199には、ブドウ糖

無添加のSOF及びHECM-3と比較してブドウ糖が5.56mM含まれており、これが他区との発生率の差の原因の1つと考えられた。また、72時間目までの培養条件がその後の胚発生率に影響を及ぼしていた。8細胞期以上胚と胚盤胞の発生率では、HECM-3とSOFの間に差は認められなかった。また、血清添加による効果も明確ではなかった。

授精7日目の胚盤胞の総細胞数では、血清添加HECM-3区が血清無添加SOF区とM-199区に比較して有意に多かった。ICM細胞数では、血清添加・無添加の両HECM-3区と血清添加SOF区が、M-199区に比較して有意に多かった。授精72時間目までの培養液への血清の添加は分割率を低下させる傾向はあるもののその後の発生率及び胚の品質には影響を及ぼさなかった。一方、HECM-3の血清添加区における総細胞数及びICM細胞数が特に多い原因としては、HECM-3に含まれるグルタミンの影響が考えられるが今回の実験からは明らかでなかった。しかしながら、体内受精、体内発生胚盤胞の平均とされる総細胞数が、100～120個⁷⁾であることを考えると正常な分割であるか検討する必要があると考えられた。

総細胞数に対するICM細胞数の割合には各区間に有意差はなかった。このことは、胚盤胞のICM細胞数の総細胞数に対する割合は授精72時間目以降の培養液に影響しているという、Fukushimaら⁴⁾の報告を支持した。

共培養を行わない培養条件において、授精72時間目までの培養液にSOFあるいはHECM-3を用いることにより分割率、8細胞及び胚盤胞への発生率は、M-199区を用いる場合と比較して有意に向上した。授精72時間目までの培養液が、授精72時間目以降の胚発生にも影響を及ぼしていた。

また、胚盤胞の総細胞数とICMを構成する細胞数についてもSOF区とHECM-3区がM-199区より多く、授精72時間目までの培養液としてこれら2種が利用できることが示された。しかし、HECM-3を使用した場合の細胞数は体内受精・体内発生胚盤胞に比較してやや多い傾向があることからその正常性を検討すると同時に、今後、これらの培養液を基礎として、共培養条件の要因解析や、各種成長因子の効果判定のために、共培養を行わず、血清やBSAなどのunknown factorを含まない培養条件の確立の可能性が示唆された。

引用文献

- 1 Barnett D. K. and B. D. Bavister (1992) : Hypotaaurine requirement for in vitro development of

- golden hamster one cell embryos into morulae and blastocyste, and production of term offspring from in vitro-fertilized ova: *Biol. Reprod.*, **47**, 297-304
- 2 Fukui Y., L. T. McGowan, R. W. James, P. A. Pugh and H. R. Tervit (1991) : Factors affecting the in-vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized in vitro : *J. Reprod. Fert.*, **92**, 125-131
- 3 福島護之・富永敬一郎・秦谷 豊 (1994) : ウシ体外受精における個体別胚生産 : 兵庫農技研報 (畜産), **30**, 33-38
- 4 Fukushima M., K. Tominaga, S. Iwasaki and K. Utsmi (1993) : The total cell number and the proportion of inner cell mass cells of IVM-IVF bovine blastocysts co-cultured with the bovine cumulus cells mono-layer in synthetic oviduct fluid (SOF) or in tissue culture medium 199 (M-199) : *J. Assisted Reprod.*, **10**, 130 (Abstr.).
- 5 Gardner D. K., M. Lane, A. Spitzer and P. A. Batt (1994) : Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes culture to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells : Amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development : *Biol. Reprod.*, **50**, 390-400
- 6 Harter H. L. (1960) : Critical values for Duncan's new multiple range test : *Biometrics* **16**, 671-685.
- 7 Iwasaki S., N. Yoshida, H. Ushijima, S. Watanabe and T. Nakahara (1990) : Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized in vitro and in vivo : *J. Reprod. Fert.*, **90**, 279-284
- 8 Matusyama K, H. Miyakoshi and Y. Fukushima (1993) : Effect of glucose levels during the in vitro culture in synthetic oviduct fluid medium on in vitro development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro : *Theriogenology* **40** : 595-605
- 9 Pinyopummintr T. and B. D. Bavister (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
- 10 Morgan P. M. and M. T. Kane (1993) : Protein content of rabbit embryos : one cell to peri-implantation blastocyst : *J. Reprod. Fert.* : 101-106
- 11 Shamsuddin M., B. Larsson, H. Gustafsson and H. Rodriguez-Martinez (1994) : A serum-free, cell-free culture system for development of bovine one-cell embryos up to blastocyst stage with improved viability : *Theriogenology* **41**, 1033-1043
- 12 Takahashi Y. and N. L. First (1992) : In vitro development of bovine one-cell embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins : *Theriogenology*, **37**, 963-978
- 13 Telford N. A., A. J. Watson and G. A. Schultz (1990) : Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development : A comparison of several species : *Mol. Reprod. Dev.*, **26** : 90-100
- 14 Tervit, H. R., D. G. Whittingham and L. E. A. Rowson (1972) : Successful culture in vitro of sheep and cattle ova : *J. Reprod. Fert.* **30**, 493-497
- 15 Thibodeaux J. K., R. P. Del Vecchio, J. R. Broussard, J. F. Dickey and W. Hansel (1993) : Stimulation of development of in vitro-matured and in vitrofertilized bovine embryos by platelets : *J. Anim. Sci.* **71** : 1910-1916