

発生培地の違いが牛体外成熟・受精卵の初期発生に及ぼす影響

下司 雅也・坂口 実・米内 美晴・永井 卓

(東北農業試験場)

Influence of Different Basic Culture Media on Early Development of Bovine Embryos Cultured In Vitro

Masaya GESHI, Minoru SAKAGUCHI, Mihar YONAI and Takashi NAGAI
(Tohoku National Agricultural Experiment Station)

1 はじめに

牛体外受精卵の体外培養用の合成培地には TCM199 が広く用いられている。しかし、TCM199 は数多くの無機塩類、アミノ酸、ビタミンを含む組成の複雑な培地であり、しかも体外受精卵の胚盤胞への発生には卵丘細胞などの共培養が必要であるために牛胚の初期発生に関与する因子の検索用基本培地には適していない。一方、牛体外受精卵の胚盤胞への発生において各種細胞との共培養を必要としない合成培地として報告された CR1aa¹⁾ は、数種の塩類とアミノ酸等からなる比較的単純な組成の培地である。そこで、これらの培地を用いて発生培養に用いる基本培地の違いが牛体外成熟・受精卵の胚盤胞への発生に及ぼす影響を調べた。

2 試験方法

(1) 卵子の体外成熟・受精法

培養はすべて 5% 炭酸ガス、95% 空気、39℃ の炭酸ガス培養器で行った。食肉処理場より採取した卵巣より未成熟卵胞卵子を吸引採取し、卵丘細胞が緊密に付着した卵子を選別、洗浄後、成熟培地 (25mM ヘブス緩衝 TCM199 + 10% 牛胎仔血清 + 0.02 AU/ml 卵卵刺激ホルモン) で 20 時間成熟培養後に媒精に供した。媒精には同一種雄牛の凍結・融解精液を用い、10mM カフェイン加 BO 液 (Brackett and Oliphant's Medium)¹⁾ で 2 回洗浄後、 2×10^7 精子/ml の濃度に調製し、さらに 10IU/ml ヘパリン、20mg/ml 牛血清アルブミン (BSA) 加 BO 液で等倍希釈した。この精子浮遊液を 100 μ l のドロップの形に分注し、30 分間の前培養後に各ドロップへ体外成熟卵子を約 10 個ずつ導

入した。

(2) 実験 1: 基本培地の違いあるいは共培養細胞の有無が牛体外成熟・受精卵の胚盤胞への発生に及ぼす影響

媒精 6 時間後に卵子を発生培地に移し、ピペッティングにより卵子を裸化し、卵丘細胞との共培養あるいは発生培地のみの条件下で発生培養を行った。発生培地として 5% 過排卵処置牛血清添加 25mM ヘブス緩衝 TCM199 あるいは mCR1aa (CR1aa から BSA を除いたもの) を用い、媒精 54 時間後に卵割率等を調べた。培地の交換は 48 時間毎に行い、媒精後 10 日間の体外受精卵の胚盤胞への発生状況を調べた。

(3) 実験 2: mCR1aa への BSA あるいは血清の添加が、非共培養系での牛体外受精卵の胚盤胞への発生に及ぼす影響

媒精 6 時間後に卵子を裸化し、卵丘細胞が存在しない状態で実験 1 と同様の発生試験を行った。発生培地には ① 1 mg/ml Polyvinyl alcohol (PVA) 添加 mCR1aa ② 3 mg/ml BSA 添加 mCR1aa (CR1aa) ③ 5% 過排卵処置牛血清添加 mCR1aa を用いた。

3 試験結果及び考察

基本培地の違いあるいは共培養細胞の有無が、媒精 54 時間後における受精卵の初期発生率及び胚盤胞への発生率に及ぼす影響を調べた結果を表 1 に示した。受精卵を卵丘細胞と共培養した場合、基本培地による発生率の差は認められなかった。しかし、共培養しない場合には受精卵の胚盤胞への発生率は共培養した場合に比較して有意に低下し、しかも基本培地による差が認められ、TCM199 を用いた場合に mCR1aa と比較して有意に低い発生率を示した。

表 1 発生用基本培地の違い及び卵丘細胞の有無が牛体外成熟・受精卵の発生に及ぼす影響

発生培地	卵丘細胞	供卵数	初期発生率 % (胚数) *			胚盤胞への発生率 % (胚数) **	
			2細胞期以上	4細胞期以上	8細胞期以上	DAY8まで	DAY10まで
CS-mR1aa	無	206	72 (148) ^{a,b}	55 (114)	32 (66) ^{a,b}	7 (14) ^a	9 (19) ^a
CS-mCR1aa	有	199	76 (152) ^{a,b}	58 (116)	37 (73) ^{a,b}	23 (45) ^b	24 (47) ^b
CS-TCM199	無	153	69 (105) ^a	56 (85)	28 (43) ^a	1 (2) ^c	2 (3) ^c
CS-TCM199	有	167	80 (134) ^b	63 (106)	41 (68) ^b	22 (37) ^b	26 (44) ^b

注. *: 媒精後 54 時間目に観察

CS-mCR1aa: 5% 過排卵処置牛血清添加 mCR1aa

a-c: 異符号間に有意差あり ($p < 0.05$)

** : 媒精後 8 日間あるいは 10 日間に胚盤胞まで発生した数

CS-TCM199: 5% 過排卵処置牛血清添加 25mM ヘブス緩衝 TCM199

表2 発生培地へのBSAあるいは血清の添加が非共培養系での牛体外成熟・受精卵の発生に及ぼす影響

発生培地	供卵数	初期発生率%(胚数)*			胚盤胞への発生率%(胚数)**	
		2細胞期以上	4細胞期以上	8細胞期以上	DAY8まで	DAY10まで
PVA-mCR1aa	281	65 (184)	38 (107) ^a	19 (54) ^a	0 (0) ^a	0 (0) ^a
BSA-mCR1aa	268	73 (195)	54 (146) ^b	28 (74) ^b	2 (6) ^b	4 (12) ^b
CS-mCR1aa	280	73 (203)	55 (154) ^b	30 (85) ^b	9 (24) ^c	11 (30) ^c

注*: 媒精後54時間目に観察

PVA-mCR1aa: 1mg/mlPVA添加mCR1aa

CS-mCR1aa: 5%過排卵処置牛血清添加mCR1aa

** : 媒精後8日間あるいは10日間に胚盤胞まで発生した数

BSA-mCR1aa: 3mg/mlBSA添加mCR1aa (CR1aa)

a-c: 異符号間に有意差あり (p<0.05)

mCR1aaへのBSAあるいは血清の添加が体外受精卵の発生に及ぼす影響について調べた結果を表2に示した。媒精54時間後における4細胞期以上への発生率は、PVA添加区が他の2区に比べて有意に低かった。胚盤胞への発生率は、血清添加区が他の区と比較して有意に高く、無血清培地であるPVA添加区では胚盤胞への発生は認められなかった。

CR1aaはTCM199に比べるとグルコースやビタミンを含まず、アミノ酸やその他の無機塩類の種類も少ないより単純な組成の培地である。TCM199に含まれる5.56mMのグルコースは牛卵管内のグルコース濃度に比較して非常に高く、高濃度のグルコースは牛初期胚の発生を8~16細胞の時期に阻害するとの報告⁵⁾がある。また、卵丘細胞は培地中のグルコースを消費してビルビン酸を産生することが報告²⁾されており、卵丘細胞との共培養条件ではTCM199中でグルコース濃度が低下することによって、胚発生が高濃度のグルコースによって阻害されない可能性が考えられる。さらに、CR1aaへのビタミン添加は胚盤胞への発生率をやや低下せるとの報告⁴⁾もあることから、TCM199に含まれるビタミンが牛胚の初期発生を抑制する可能性が示唆された。

RosenkransとFirst⁴⁾は、CR1aa培地を用いて、血清添加及び細胞との共培養を行うことなく体外受精由来胚が胚盤胞に発生すると報告している。しかし、今回の結果では、mCR1aaにBSAあるいは血清を添加した両区において初期発生に差は見られなかったものの、BSA添加区では胚盤胞への発生率は有意に低く、先の報告と一致しなかった。また、小西と青柳³⁾は、CR1aaに血清を添加することにより細胞との共培養の有無にかかわらず胚盤胞への発生率はかわらないと報告しているが、今回の試験においては共培養無しでは胚盤胞への発生率は低下した。小西と青柳³⁾は媒精14~16時間後に卵丘細胞を裸化し、CR1aaに血清を添加した培地を用いたのに対し、今回の実験では媒精6~8時間後に卵丘細胞を除去し、CR1aaからBSAを除いたmCR1aaに血清を添加して培養に用いた。従っ

て、卵丘細胞除去時間の違いやBSAの有無が体外受精卵の胚盤胞への発生率に影響した可能性も考えられる。また、BSAをPVAらにおきかえた無血清培地では初期発生が悪く、胚盤胞への発生は認められなかったことから、ある種の栄養素や成長因子の欠如が考えられた。

4 ま と め

牛体外成熟・体外受精卵の体外培養において、血清添加、卵丘細胞との共培養条件では基本培地による差は認められなかったが、共培養細胞の無い状態では、mCR1aa区の方がTCM199区に比べて、明らかに胚盤胞への発生率が高かった。mCR1aaを基本培地として用いた場合においても、血清成分の添加を必要とすること、また、血清添加においても卵丘細胞との共培養なしの条件下では胚盤胞への発生率は低下することが明らかとなった。

引 用 文 献

- 1) Brackett, B. G.; Oliphant, G. 1975. Capacitation of rabbit Spermatozoa in vitro. Biol. Reprod. 12: 260-274.
- 2) Gardner, D. K.; Leese, H. J. 1990. Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism in vitro. J. Reprod. Fertil. 88: 361-368.
- 3) 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. Develop. 40: j1-j4.
- 4) Rosenkrans, C. F. Jr.; First, N. L. 1991. Culture of bovine zygotes to the blastocyst stage: Effects of amino acids and vitamins. Theriogenology 35: 266.
- 5) Takahashi, Y.; 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.