

体外受精技術を用いたウシ胚の
効率的生産及び利用に関する研究

下 司 雅 也

体外受精技術を用いたウシ胚の 効率的生産及び利用に関する研究

下 司 雅 也

目次

第一章 緒論	1
第二章 発生培地への添加血清の種類がウシ体外成熟・受精卵子の胚盤胞への発生率に及ぼす影響	3
第一節 緒言	3
第二節 発生培地への添加血清の種類がウシ体外成熟・受精卵子の胚盤胞への発生率に及ぼす影響	4
第三節 考察	7
第四節 摘要	8
第三章 培養気相中の二酸化炭素濃度あるいは発生培地へのβ-メルカプトエタノールの添加が共培養条件下でのウシ未成熟卵子の成熟率・受精率あるいはその後の胚盤胞への発生率に及ぼす影響	10
第一節 緒言	10
第二節 培養気相中の二酸化炭素濃度が共培養条件下でのウシ未成熟卵子の成熟率・受精率あるいはその後の胚盤胞への発生率に及ぼす影響	11
第三節 発生培地へのβ-メルカプトエタノールの添加が共培養条件下でのウシ体外成熟・体外受精由来4～8細胞期胚の胚盤胞への発生率に及ぼす影響	15
第四節 考察	16
第五節 摘要	19
第四章 発生培地の種類あるいは培養気相中の酸素分圧が胚盤胞への発生率に及ぼす影響	20
第一節 緒言	20
第二節 基本培地の違いあるいは共培養細胞の有無がウシ体外成熟・受精卵の胚盤胞への発生率に及ぼす影響	20
第三節 mCR1aaへのBSAあるいは血清の添加が、非共培養系でのウシ体外成熟・受精卵の胚盤胞への発生率に及ぼす影響	23
第四節 酸素分圧が非共培養系でのウシ体外受精卵の胚盤胞への発生率に及ぼす影響	25
第五節 考察	26
第六節 摘要	29

第五章	ウシ未成熟卵子の成熟培養方法が成熟率・受精率及びその後の胚発生に及ぼす影響	30
第一節	緒言	30
第二節	成熟培地への血清添加の有無がウシ未成熟卵子の成熟率・受精率及びその後の胚発生に及ぼす影響	31
第三節	無血清成熟培地へのシステアミンの添加がウシ未成熟卵子の成熟率・受精率及びその後の胚発生に及ぼす影響	34
第四節	考察	39
第五節	摘要	40
第六章	ウシ裸化未成熟卵子の体外成熟培養法に関する検討	42
第一節	緒言	42
第二節	基本培地の違いあるいは卵丘細胞の有無がウシ未成熟卵子の成熟率に及ぼす影響	43
第三節	成熟培地(mTCM199)へのピルビン酸ナトリウムの添加あるいは卵丘細胞の有無がウシ体外成熟卵子の体外受精後の受精率及び胚発生率に及ぼす影響	47
第四節	裸化未成熟卵子由来胚盤胞の移植試験	52
第五節	考察	55
第六節	摘要	57
第七章	ウシ体外受精由来胚盤胞の短期保存における β -メルカプトエタノールの添加効果に関する検討	58
第一節	緒言	58
第二節	ウシ体外受精由来胚盤胞の短期保存における β -メルカプトエタノールの添加効果に関する検討	58
第三節	短期保存胚盤胞の正常性の検討	60
第四節	考察	63
第五節	摘要	64
第八章	総括	65
	謝辞	69
	引用文献	70

第一章 緒論

牛胚移植技術は、肉用牛や乳用牛の改良・増殖手段として成果をあげつつあり、ウシ胚の需要は年々増加している。しかしながら、過剰排卵処理による体内受精胚の回収には時間とコストがかかるために、このままの勢いでウシ胚の需要が伸びてゆけば、需要を満たすことは難しいと思われる。そこで、移植に用いる安価で良質な胚を多量に作出する技術として体外受精技術の確立が望まれている。

体外受精技術は、本来、食肉処理場において廃棄される卵巣内にある多数の未成熟卵子を用いるため、胚を安定して大量にしかも安価に供給できると期待されている。また、近年、超音波診断装置を用いて生体から個体ごとに卵子を採取する技術が開発され、この技術と体外受精技術を適応することにより体外受精胚を牛群の遺伝的改良にも利用可能となる。さらに、老齢や卵管等の疾患のために過剰排卵処理による体内受精胚の採取が困難な個体や性成熟前の若齢牛からの胚生産が可能となるとともに、同一個体から継続的に卵子を採取し、優良牛から安価で多量の胚生産が可能となれば、体外受精が、従来の過剰排卵処理による胚回収に取って代わる可能性もある。また、体外受精技術は、核移植や遺伝子導入技術などの土台となる技術であり、今後、これらの先端技術を確立するうえでなくてはならない技術である。

体外受精技術は、未成熟卵子の採取及び成熟培養技術、体外受精技術（精子の受精能獲得）、及び体外受精後の発生培養技術の3つに大きく分けることができる。ウシの体外受精に関する研究は1970年代に急速に発展し、体外受精卵の移植による最初の産子は1981年に〔Brackettら, 1982〕、体外成熟・受精卵子由来の最初の産子は1986年に日本で生まれた〔花田ら, 1986〕。

牛初期胚の体外培養には種々の培養液が用いられているが、当初、体外受精後の体外培養では8～16細胞期を越えて発生させることが困難であり、一時的に偽妊娠ウサギ〔塩谷ら, 1988〕やヒツジ〔Eyestoneら, 1987〕の卵管内に仮移植を行い、胚盤胞にまで発生させる必要があった。しかし、梶原ら〔1987〕は、体外成熟・体外受精後の牛受精卵を卵丘細胞と共培養することにより脱出胚盤胞まで発生させ得ることを報告し、それ以後、次々と完全体外培養系による牛胚盤胞の作出及び子牛の生産の報告がなされるようになった〔Fukudaら, 1990; Gotoら, 1988; Gotoら, 1989; Luら, 1988〕。生体内環境により近い培養環境を整えるための数多くの培養手法の開発がなされてきたものの、完全体外培養系で移

植可能な胚盤胞の時期まで発育する卵は供試卵の数十%であり、その受胎率も生体由来胚に比べて低い。体外における胚の培養環境には、温度、培養気相、培養液の組成、pHあるいは浸透圧等の様々な要因が複雑に影響しており、これらの環境要因が代謝に及ぼす影響及び作用機序を明らかにする必要がある。

体外受精に用いる卵子は、卵巣内にある未成熟卵子を用いるため、まず体外で成熟させて受精可能な第2成熟分裂中期の時期まで発育させる必要がある。成熟培養方法についての研究も進められており、近年、核の成熟のみならず細胞質の成熟の重要性が指摘されるようになった。また、未成熟卵子を取り巻く卵丘細胞は、透明帯を貫通して卵子と結合装置を介して連絡しており [Allworth & Albertini, 1993]、未成熟卵子の成熟やその後の胚発生に重要な役割をはたすことが知られている [Buccione, 1990; Nagaiら, 1993] もの、卵子の成熟にどのような役割を担っているのかについては未だ不明な点が多い。つまり、良質な移植可能胚を効率的に生産するためには、成熟時に重要な役割を果たす卵丘細胞の機能を解明し、よりよい培養条件を作り出す必要がある。

さらに、受精卵移植による子牛生産を効率的に行うためには、胚の安定供給が重要となる。牛胚の長期保存法としては凍結保存法があるが、高額な機械を必要とすること、また凍結胚の受胎率は一般に新鮮胚に比べて低いという問題点がある [Schneiderら, 1980]。ところが、宅急便等の物流システムの発達した今日では、短期間のうちに胚を全国に輸送できることから、新鮮胚の保存が短期間でも可能となれば胚の利用期間を長くすることができ、遠隔地への胚の輸送が可能となるとともに、低温条件下での胚の発育調節（抑制）によって、胚の発育ステージと受卵牛の性周期を一致させて移植することが可能となり、受精卵移植の実用化をより一層推進することができる。

本研究では、ウシ体外受精技術を用いた効率的な胚生産方法の確立を目指すために、まず体外受精胚の発生培養方法について添加血清の種類、培養液の組成や培養環境が胚盤胞への発生率に及ぼす影響を検討した。次に、胚盤胞期への発育率のさらなる向上を目指して、体外成熟培養方法の検討を加えるとともに、成熟培養時の卵丘細胞の役割についても検討した。さらに、作出胚盤胞の有効活用を目指して短期保存法の検討を行った。また、裸化未成熟卵子由来の胚盤胞あるいは低温保存胚の正常性を検討するために、移植試験を実施した。

第二章 発生培地への添加血清の種類がウシ体外成熟・受精卵子の胚盤胞への発生率に及ぼす影響

第一節 緒言

ウシの体外受精に関する研究は1970年代に急速に発展し、体外受精卵の移植による最初の産子は1981年に [Brackettら, 1982] , 体外成熟・受精卵子由来の最初の産子は1986年に日本で生まれた [花田ら, 1986] 。牛の体外受精においては、当初、体外受精後の体外培養では8細胞期を越えて発生させることが困難であり、一時的に偽妊娠ウサギ卵管内に仮移植を行い、胚盤胞にまで発生させる必要があった [塩谷ら, 1988] 。しかし、梶原ら (1987) は、体外成熟・体外受精後の牛受精卵を卵丘細胞と共培養することにより脱出胚盤胞まで発生させ得ることを報告し、それ以後、次々と完全体外培養系による牛胚盤胞の作出及び子牛の生産の報告がなされるようになった [Fukudaら, 1990; Gotoら, 1988; Gotoら, 1989; Luら, 1988] 。しかしながら、添加する血清の種類により未成熟卵胞卵子の成熟率、その後の卵割率や胚盤胞への発生率に大きな差があることが知られており、血清の比較では、Younisら (1989) は、成熟及びその後の発生において性周期20日目の血清添加が優れていると報告している。一方、Fukuiら (1991) はヒト血清より牛胎仔血清を用いた場合の方が発生率が良いと報告している。また、過排卵処置により回収した桑実胚の体外培養において、羊血清添加培地に比べて過排卵処置牛血清添加培地による培養が胚盤胞への発生能に優れているとの報告 [鈴木ら, 1982] がある。しかし、一般に、発生培地への添加血清としては牛胎仔血清や子牛血清が用いられており、成雌牛血清を用いた検討は少ない。

本章においては、5種類の非働化血清（牛胎仔血清、新生子牛血清、子牛血清、雌牛血清及び過剰排卵処置牛血清）を用い、発生培地への添加血清の種類がウシ体外成熟・体外受精卵の胚盤胞への発生に及ぼす影響について検討し、安定した体外培養系の確立をめざした。

第二節 発生培地への添加血清の種類がウシ体外成熟・受精卵子の胚盤胞への発生率に及ぼす影響

本節においては、5種類の非働化血清（牛胎仔血清，新生子牛血清，子牛血清，雌牛血清及び過剰排卵処置牛血清）を用い，発生培地への添加血清の種類がウシ体外成熟・体外受精卵の胚盤胞への発生に及ぼす影響について検討した。

1. 材料および方法

(1) 未成熟卵の採取と体外成熟

食肉処理場においてと畜後1時間以内に牛卵巢を採取し，39℃に加温した滅菌生理食塩水に入れて実験室に持ち帰った。卵子の吸引には，抗生物質（ペニシリンGカリウム（明治製菓）100 U/ml，硫酸ストレプトマイシン（明治製菓）100 μ g/ml）と3 mg/mlのウシ血清アルブミン（BSA：和光純薬）を加えた修正リン酸緩衝液を少量入れた18あるいは19Gの注射針をつけた5 mlの注射器を用い，卵巢表面の小卵胞（1 cm以下）より卵子を吸引採取した。吸引した卵子は修正リン酸緩衝液・体外成熟培地で洗浄後，緊密な卵丘細胞層に包まれた卵子を選別し，流動パラフィン（ナカライテスク）で覆った100 μ lの体外成熟培地中に10個ずつ入れ，5%二酸化炭素・95%空気，39℃の炭酸ガス培養器に入れ20～22時間成熟培養を行った。体外成熟培地としては，10%非働化牛胎仔血清（FCS：M.A.Bioproducts），0.02 AU/ml卵胞刺激ホルモン（アントリン：デンカ製菓）及び抗生物質を添加した25mMヘパス緩衝TCM-199（GIBCO）を使用した。

(2) 体外受精

精液は黒毛和種1頭の凍結精液を用いた。1～2本の0.5mlストロー凍結精液を温湯中で融解し，小試験管を用いて，BSAを除いた修正タイロード液（BO液 [Brackett & Oliphant, 1975]）にカフェイン（安息香酸ナトリウムカフェイン中のカフェインを50%として計算，SIGMA）を10mM加えた液（Caf-BO液）で精子を2回洗浄（500×G，5分間）した。洗浄後，精子濃度をCaf-BO液で 25×10^6 精子/mlに調整し，BSA（Crystalized Albumin：SIGMA）20mg/ml，ヘパリン10U/ml（ヘパリンナトリウム注Nシミズ：清水製菓）を含む修正タイロード液（Hep-BSA-BO液）で等倍に希釈した。この精子浮遊液を

100 μ lの小滴にして流動パラフィンで覆い、炭酸ガス培養器内で30分間培養した。その後、体外成熟卵をHep-BSA-BO液で洗浄し、精子浮遊液の小滴中に10個づつ導入した。

(3) 体外受精後の発生

卵子は媒精6時間後に発生培地に移しかえた。発生培地は、10%非働化牛血清、0.5mMピルビン酸ナトリウム、20mM乳酸ナトリウム(60%シロップ, SIGMA)及び抗生物質を添加した25mMヘペス緩衝TCM-199とし、100 μ lの小滴を流動パラフィンで覆い使用した。1小滴あたり10個の卵子を移しかえた。牛血清としては牛胎仔血清、新生子牛血清(M.A.Bioproducts)、子牛血清(GIBCO)、雌牛血清及び過排卵処置牛血清を用いた。雌牛血清は性周期の8日目に、過排卵処置牛血清は過排卵処置を行い、良好な反応を示して正常胚の回収された牛より発情後8日目にそれぞれ採血して作製した同一牛(1頭)の血清を用いた。

また、一部の卵子は、媒精20~22時間後に抜き取ってホルマウント標本を作製し、精子の尾部を伴った雌雄両前核の存在により受精を判定し受精率を検査した。

媒精54時間後に卵子を卵丘細胞から取り外して卵割状況を検査し、卵割した胚のみを新たに準備した発生培地に移し、卵丘細胞との共培養は行わず発生培地のみで培養を続けた。培地は48時間ごとに交換し、媒精後6~9日(媒精日=0日)にかけて胚盤胞への発生を検査した。

(4) 統計処理

有意性の検定は χ^2 -testを用いて行った。

2. 結果

成熟培養20~22時間後の成熟率は77.8% (21/27)であった。また、抜き取り検査による多精子受精を除く受精率は86.4% (160/185)であった。

図1に体外受精後の初期胚の発生率を示した。媒精54時間後における卵割率(2細胞期以上への発生率)は、牛胎仔血清74.6% (132/177)、新生子牛血清61.6% (106/172)、子牛血清57.3% (279/471)、雌牛血清62.7% (158/252)、過排卵処置牛血清74.0% (142/192)であり、牛胎仔血清あるいは過排卵処置牛血清を添加した試験区において高

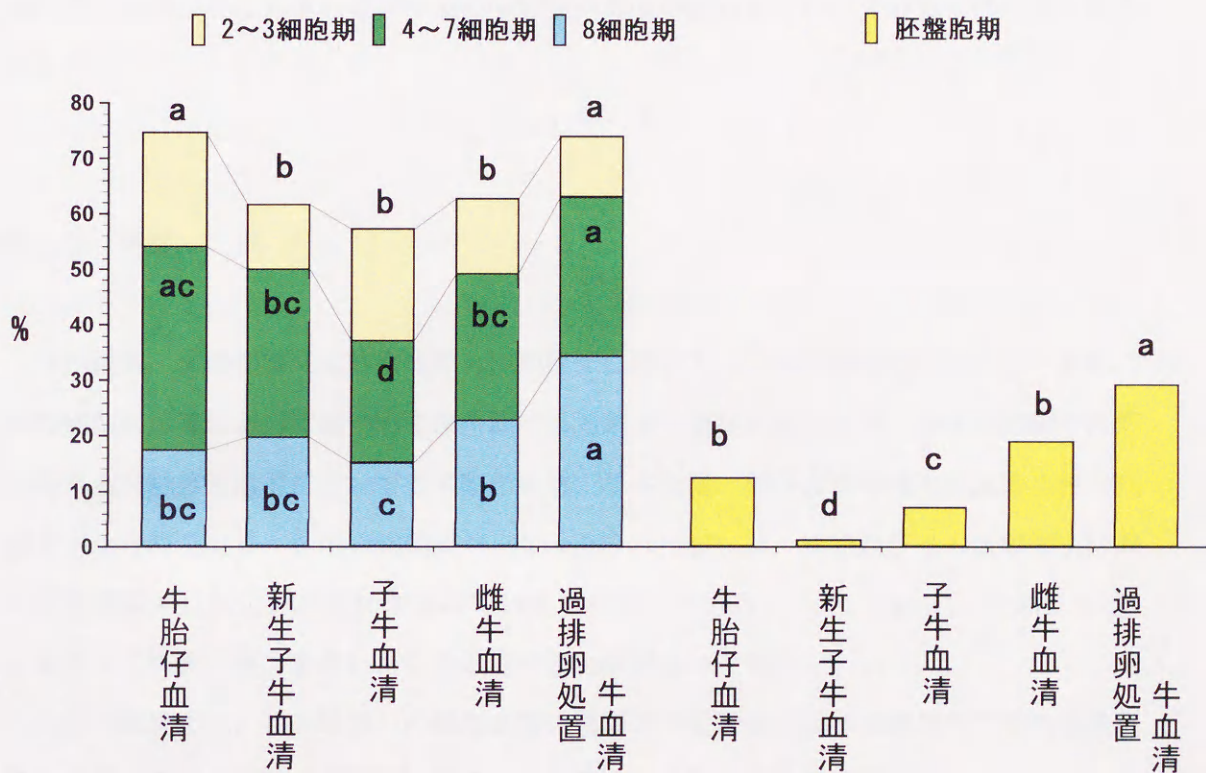


図1. 添加血清の種類がウシ体外成熟・体外受精卵の初期発生率あるいは胚盤胞期への発生率に及ぼす影響

a-c: 同ステージ異符号間に有意差あり ($P < 0.05$; χ^2 -test)

い卵割率を示した。また、同時期における8細胞期以上への発生率は、牛胎仔血清17.5% (31/177)，新生子牛血清19.8% (34/172)，子牛血清15.1% (71/471)，雌牛血清23.0% (58/252)，過排卵処置牛血清34.4% (66/192)となり、過排卵処置牛血清添加区において有意に高い発生率を示した。さらに、媒精後6～9日間に胚盤胞まで発生した率は牛胎仔血清12.4% (22/177)，新生子牛血清1.2% (2/172)，子牛血清7.0% (33/471)，雌牛血清19.0% (48/252)，過排卵処置牛血清29.2% (56/192)となり、8細胞期以上への発生率と同様に過排卵処置牛血清添加区が他の区に比べて有意に高い発生率を示した。

第三節 考察

体外成熟・体外受精・体外培養の一連の操作において、血清の影響は大きい。一般に、動物細胞の培養においては牛胎仔血清添加培地が多く用いられている。牛未成熟卵の体外成熟あるいは体外培養においても牛胎仔血清、子牛血清、雌牛血清等種々の血清を用いた報告がなされている。血清の比較では、Younisら (1989) は、成熟及びその後の発生において性周期20日目の血清添加が優れていると報告している。一方、Fukuiら (1991) はヒト血清より牛胎仔血清を用いた場合の方が発生率が良いと報告している。

今回の試験では、発生培地への添加血清の種類が牛胎仔血清添加成熟培地で体外成熟後体外受精したウシ卵子の初期発生あるいは胚盤胞への発生に及ぼす影響について比較試験を行った。その結果、初期発生に対してもその後の胚盤胞への発生に対しても過排卵処置牛血清添加培地の有効性が示された。ただし、発生になぜ有効であったかについては、さらに検討をはかる必要がある。

今回の試験においては、初期発生確認後の培養は卵丘細胞との共培養は行わず発生用培地のみで継続培養を行った。これまでの報告においては、共培養を行わない場合には8あるいは16細胞期を越えて胚盤胞へはほとんど発生しないとされており [Eyestoneら, 1987]，今回の試験においても新生子牛血清添加区において胚盤胞への発生率は低く、これらの報告と一致した。しかし、子牛血清あるいは牛胎仔血清添加区においては10%程度、雌牛血清添加区においては20%程度、過排卵処置牛血清添加区の場合には30%近い率で胚盤胞まで発生した。卵子を媒精96時間後に裸化した場合には培養液のみでも胚盤胞への発

育が可能である〔Fukudaら, 1990〕ことから, 共培養を行わないときには卵丘細胞の除去時間が8細胞あるいは16細胞期以上への発生に関係してくるものと考えられる。一方, 過排卵処置により回収した桑実胚の体外培養において, 羊血清添加培地に比べて過排卵処置牛血清添加培地による培養が胚盤胞への発生能に優れているとの報告〔鈴木ら, 1982〕があるが, 本試験でも過排卵処置牛血清添加区において牛胎仔血清, 新生子牛血清あるいは子牛血清添加区に比較して高い発生率が認められた。また, Itoら(1998)は, 早期妊娠因子陽性血清を用いた場合に早期妊娠因子陰性血清に比べて胚盤胞への発生率が高いことを報告している。本研究においても, 同一牛の自然発情後8日目の血清と比較しても過排卵処置時の発情後8日目血清を用いた場合に発生率が高まったことから, 発生に有効な何らかの因子が過排卵処置牛の血清には含まれていた可能性が推察される。胚と母体の間には受精直後から相互の認識機構が成立する〔Nancarrowら, 1981〕ことから, 母体において胚の発生を助ける準備がなされ, 血清中に何らかの有効成分が出現している可能性がある。また, 反応良好な過排卵処置牛においては血中プロゲステロン値は高く, このことが胚の発育に影響している可能性もある。今後は血清採取時の性周期や過排卵処置による胚回収成績が胚の発生能に及ぼす影響の検討や血清中の有効成分の検索を行うなど, より発生率の高い体外培養系の開発を行う必要がある。

第四節 摘要

5種類の非働化血清(牛胎仔血清, 新生子牛血清, 子牛血清, 雌牛血清及び過排卵処置牛血清)を用い, 発生培地への添加血清の種類が, 体外成熟・体外受精後の牛卵子の胚盤胞への発生に及ぼす影響について検討した。雌牛血清は性周期の8日目に, 過排卵処置牛血清は過排卵処置時の発情後8日目にそれぞれ採取して作製した同一牛の血清を用いた。

と畜場より得られた牛卵巢より未成熟卵胞卵子を吸引採取し, 体外成熟培養後, ヘパリン加B〇液で洗浄処理した精子を用いて媒精した。媒精6時間後に発生培地に移し, 媒精54時間後に卵子を卵丘細胞から取り外して卵割状況を検査し, 卵割した胚のみを卵丘細胞との共培養は行わず発生培地のみで培養を培養し, 媒精後6~9日(媒精日=0日)にかけて胚盤胞への発生を検査した。

多精子受精を除いた受精率は86.5%であった。卵割率(2細胞期以上への発生胚数/供

試卵数)は牛胎仔血清(74.6%)又は過排卵処置牛血清(74.0%)を用いた場合が、8細胞期あるいは胚盤胞期への発生率(8細胞期胚あるいは胚盤胞数/供試卵数)は過排卵処置牛血清(34.4%, 29.2%)を用いた場合が有意に高かった。

以上の結果から、発生培地に添加する血清として過排卵処置牛血清の有効性が示された。

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Figure 4

Figure 5

Figure 6

Figure 7

Figure 8

Figure 9

Figure 10

Figure 11

Figure 12

Figure 13

Figure 14

Figure 15

Figure 16

Figure 17

Figure 18

Figure 19

Figure 20

Figure 21

Figure 22

Figure 23

Figure 24

Figure 25

Figure 26

Figure 27

Figure 28

Figure 29

Figure 30

Figure 31

Figure 32

Figure 33

Figure 34

Figure 35

Figure 36

Figure 37

Figure 38

Figure 39

Figure 40

Figure 41

Figure 42

Figure 43

Figure 44

Figure 45

Figure 46

Figure 47

Figure 48

Figure 49

Figure 50

Figure 51

Figure 52

Figure 53

Figure 54

Figure 55

Figure 56

Figure 57

Figure 58

Figure 59

Figure 60

Figure 61

Figure 62

Figure 63

Figure 64

Figure 65

Figure 66

Figure 67

Figure 68

Figure 69

Figure 70

Figure 71

Figure 72

Figure 73

Figure 74

Figure 75

Figure 76

Figure 77

Figure 78

Figure 79

Figure 80

Figure 81

Figure 82

Figure 83

Figure 84

Figure 85

Figure 86

Figure 87

Figure 88

Figure 89

Figure 90

Figure 91

Figure 92

Figure 93

Figure 94

Figure 95

Figure 96

Figure 97

Figure 98

Figure 99

Figure 100

第三章 培養気相中の二酸化炭素濃度あるいは発生培地へのβ-メルカプトエタノールの添加が共培養条件下でのウシ未成熟卵子の成熟率・受精率あるいはその後の胚盤胞への発生率に及ぼす影響

第一節 緒言

ウシの体外受精においては、当初、体外成熟・体外受精後の体外培養では8細胞期を越えて発生させることが困難であったが、体外成熟・体外受精後の牛受精卵を卵丘細胞などの細胞と共培養することあるいはこれらの細胞の培養上清を用いて培養することにより脱出胚盤胞まで発生させ得ることが可能であることが報告された [Eyestoneら, 1989; Gotoら, 1988; Heymanら, 1987; Vansteenbruggeら, 1994]。

胚を培養する気相中のガス濃度は胚発生に重要な要素である。近年、酸素濃度 [Nakaoら, 1990; Thompsonら, 1990] や二酸化炭素濃度 [Pinyopummintr & Bavister, 1995; Wangら, 1992; Yangら, 1994] がウシ胚の発生に及ぼす影響が報告されている。二酸化炭素濃度は炭酸水素ナトリウム緩衝培養液のpHの維持に重要であり、ウシの体外受精に通常用いられているヘブス緩衝TCM199は5%二酸化炭素の条件下で約pH7.4である。牛卵子を卵丘細胞と共培養すると培養液中の二酸化炭素濃度が高まり、その結果、培養液のpHの低下をまねき、胚の発生を抑制するのではないかと考えられる。そこで、培養気相中の二酸化炭素濃度を通常使用している5%から2%に下げることにより、卵丘細胞との共培養中の培養液のpHを至適条件に保てるかどうかを検討する必要性が生じた。一方、最近、低分子チオール化合物のひとつであるβ-メルカプトエタノール (HS-CH₂-CH₂-OH; MW 78.13) あるいはシステアミン (HS-CH₂-CH₂-NH₂; MW 77.14) を培養液に添加することにより、共培養せずに培養液のみでウシ6~8細胞期から胚盤胞期への発生を促進することが報告された [Takahashiら, 1993]。しかしながら、共培養条件下での低分子チオール化合物の効果は調べられていない。

本章においては、培養気相中の二酸化炭素濃度あるいは発生培地へのβ-メルカプトエタノールの添加がウシ未成熟卵子の体外成熟率・体外受精率あるいはその後の胚盤胞への発生率に及ぼす影響を検討した。

第二節 培養気相中の二酸化炭素濃度が共培養条件下でのウシ未成熟卵子の成熟率・受精率あるいはその後の胚盤胞への発生率に及ぼす影響

本節においては、培養気相中の二酸化炭素濃度が卵丘細胞との共培養系におけるウシ未成熟卵子の体外成熟率・体外受精率あるいはその後の胚盤胞への発生率に及ぼす影響を検討した。

1. 材料および方法

(1) 未成熟卵の採取と体外成熟

食肉処理場においてウシ卵巢を採取し、35~39℃に加温した滅菌生理食塩水に入れて、5時間以内に実験室に持ち帰った。卵子の吸引には、抗生物質（ペニシリンGカリウム（明治製菓）100 U/ml，硫酸ストレプトマイシン（明治製菓）100 μ g/ml）と3 mg/mlのウシ血清アルブミン（BSA：和光純薬）を加えた修正リン酸緩衝液を少量入れた18Gの注射針をつけた5 mlの注射器を用い、卵巢表面の小卵胞（1~5 mm）より卵子を吸引採取した。吸引した卵子は修正リン酸緩衝液・体外成熟培地で洗浄後、緊密な卵丘細胞層に包まれた卵子を選別し、流動パラフィン（ナカライテスク）で覆った100 μ lの体外成熟培地中に10個ずつ入れ、38.5℃の炭酸ガス培養器に入れ、5%二酸化炭素・95%空気あるいは2%二酸化炭素・98%空気の培養気相下で、20~22時間成熟培養を行った。体外成熟培地としては、10%非働化ウシ胎仔血清（FCS：M.A.Bioproducts），0.02AU/ml卵胞刺激ホルモン（アントリン：デンカ製菓）及び抗生物質を添加した25mMヘPes緩衝TCM-199（GIBCO）を使用した。

(2) 体外受精

精液は黒毛和種1頭の凍結精液を用いた。0.5mlストロー凍結精液を37℃の温湯中で15秒間融解し、小試験管を用いて、BSAを除いた修正タイロード液（BO液 [Brackett & Oliphant, 1975]）にカフェイン（安息香酸ナトリウムカフェイン中のカフェインを50%として計算，SIGMA）を10mM加えた液（Caf-BO液）で精子を2回洗浄（500×G，5分間）した。洗浄後、精子濃度をCaf-BO液で 1×10^7 精子/mlに調整し、BSA（Crystalized Albumin：SIGMA）20mg/ml，ヘパリン10U/ml（ヘパリンナトリウム注Nシミズ：清

水製葉)を含む修正タイロド液(Hep-BSA-BO液)で等倍に希釈した。この精子浮遊液を $100\mu\text{l}$ の小滴にして流動パラフィンで覆い、炭酸ガス培養器内で30分間培養した。その後、体外成熟卵をHep-BSA-BO液で洗浄し、精子浮遊液の小滴中に10個ずつ導入した。

3) 体外受精後の発生

卵子は媒精6時間後に発生培地に移しかえた。発生培地は、5%過剰排卵処置牛由来非働化血清、0.5mMピルビン酸ナトリウム及び抗生物質を添加した25mMヘペス緩衝TCM-199とし、 $100\mu\text{l}$ の小滴を流動パラフィンで覆い使用した。1小滴あたり約10個の卵子を移しかえた。過排卵処置牛血清は過排卵処置を行い、良好な反応を示して正常胚の回収された牛より発情後8日目に採血して作製した血清を非働化して用いた。

一部の卵子は、成熟率の検査のために成熟培養24時間後に、また、受精率の検査のために媒精10~12時間後に抜き取ってホルマウント標本を作製し、カルノア液(酢酸:エタノール=1:3)で固定後、1%アセトオルセインで染色した。精子の尾部を伴った雌雄両前核の存在により正常受精を判定し、受精率を検査した。

媒精54時間後に卵子を卵丘細胞から取り外して卵割状況を検査した。卵割した胚のみを卵丘細胞との共培養を継続した。培地は48時間ごとに交換し、媒精後6~8日(媒精日=0日)にかけて胚盤胞への発生を検査した。培養は全期間を通して、5%二酸化炭素・95%空気あるいは2%二酸化炭素・98%空気の培養気相下で、 38.5°C の炭酸ガス培養器中で行った。実験は4回反復した。

(4) 統計処理

統計処理は、t検定あるいは分散分析及びFisherのPLSD検定を用いて行った。

2. 結果

図2に2%二酸化炭素・98%空気あるいは5%二酸化炭素濃度・95%空気で培養したときのウシ未成熟卵子の成熟率・受精率あるいはその後の胚盤胞への発生率を示した。2%あるいは5%二酸化炭素における成熟率は $82.5\pm 4.2\%$ あるいは $86.6\pm 3.5\%$ 、精子侵入率は $94.6\pm 3.7\%$ あるいは $98.6\pm 0.8\%$ 、正常受精率は $61.2\pm 5.3\%$ あるいは $57.5\pm 2.7\%$ 、卵割率は $74.8\pm 4.3\%$ あるいは $75.6\pm 2.2\%$ となり、二酸化炭素濃度は、成熟率・受精率および卵割率

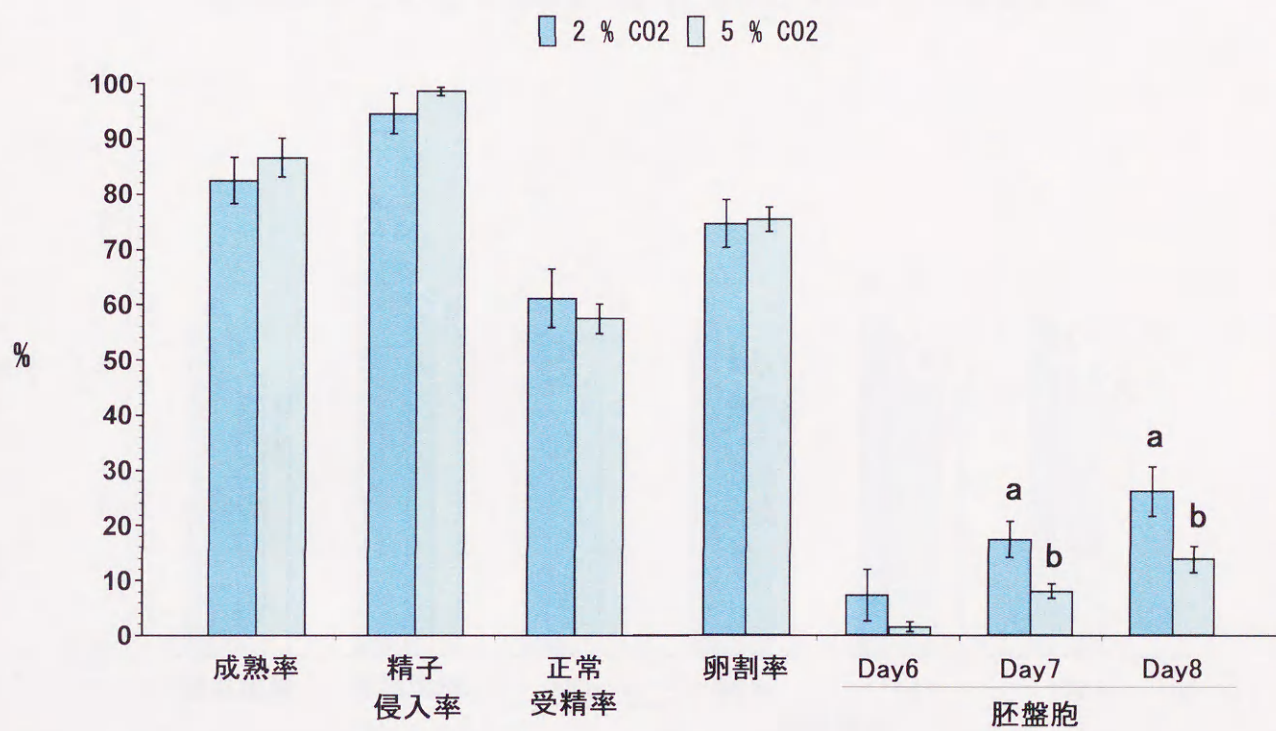


図2. 培養気相中の二酸化炭素濃度が成熟率・受精率及びその後の発生率に及ぼす影響

a-b: 同ステージ異符号間に有意差あり(p<0.05; Paired t-test)

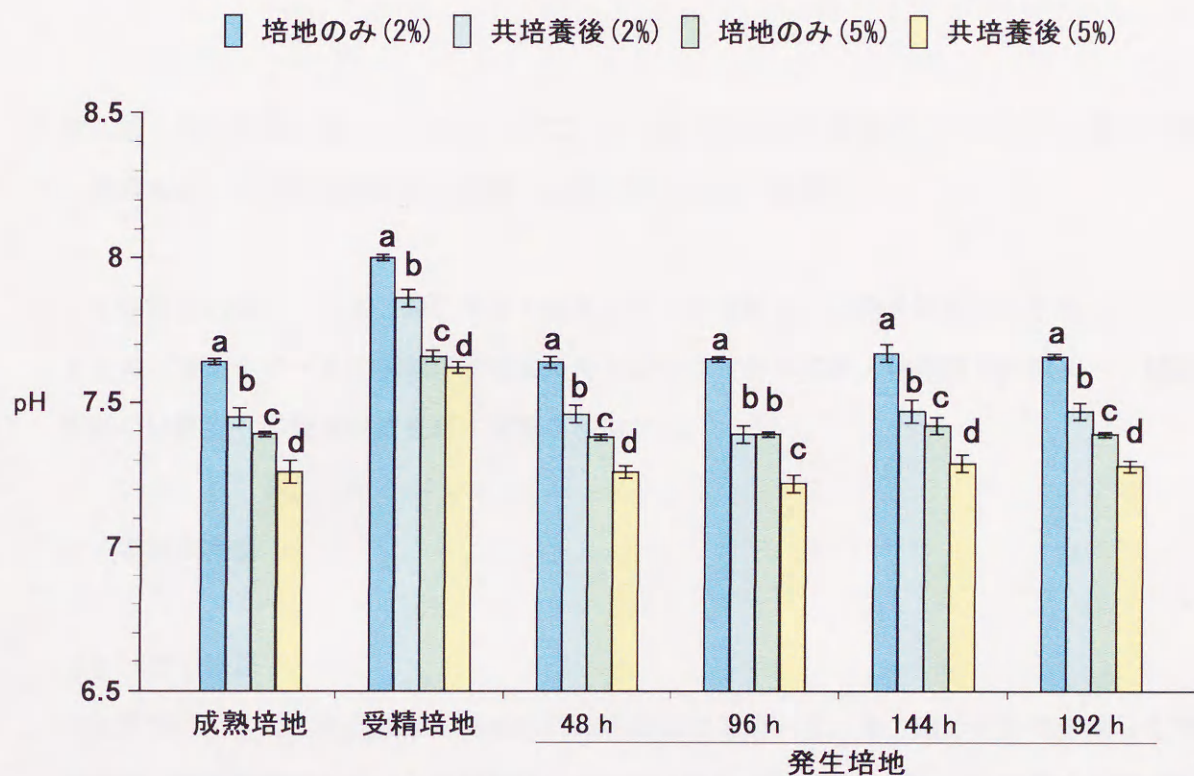


図3. 培養気相中の二酸化炭素濃度が培養液のpHに及ぼす影響

データは4回の平均値±標準誤差

培地のみ: 培養液のみを平衡後のpH

共培養後: 卵丘細胞と卵子を共培養後のpH

a-c: 同ステージ異符号間に有意差あり ($P < 0.05$; ANOVA & Fisher's PLSD test)

には影響しなかった。しかし、Day 7あるいはDay 8における2%二酸化炭素での胚盤胞への発生率 ($17.6 \pm 3.3\%$, $26.3 \pm 4.5\%$) は、5%二酸化炭素で培養したとき ($8.1 \pm 1.3\%$, $13.9 \pm 2.4\%$) よりも有意に高かった。図3には、2%あるいは5%二酸化炭素濃度で培養後の培養液のpHを示した。5%二酸化炭素で共培養後の発生培養液のpH (7.26) は、2%二酸化炭素で共培養後の発生培養液のpH (7.45) よりも有意に低かった。

第三節 発生培地へのβ-メルカプトエタノールの添加が共培養条件下でのウシ体外成熟・受精由来4～8細胞期胚の胚盤胞への発生率に及ぼす影響

本節においては、2%二酸化炭素・98%空気の培養気相下で卵丘細胞と共培養し、β-メルカプトエタノールの添加が共培養条件下でのウシ体外成熟・体外受精由来4～8細胞期胚の胚盤胞への発生率に及ぼす影響を検討した。

1. 材料と方法

(1) 発生培養

本節では、2%二酸化炭素・98%空気の培養気相を用いて、第二節の条件で作成した体外成熟・体外受精由来4～8細胞期胚を用いた。媒精54時間後にピペットを用いて卵丘細胞を取り除き、すべての卵子をドロップから一時的に取り除いた。卵子を取り除いたドロップの培養液は、新しい培養液に交換した。卵子のうち4～8細胞期の胚を選別し、培養液で洗浄した。古い培養液を種々の濃度のβ-メルカプトエタノールを添加した培養液に交換した、先ほどのドロップに約10個ずつ導入した。培養は、2%二酸化炭素・98%空気の培養気相下で、38.5℃の炭酸ガス培養器中で行ない、培養6～8日後に胚盤胞への発生を検討した。培養液は48時間ごとに交換した。実験は5回反復した。

(2) 統計処理

統計処理は、分散分析及びFisherのPLSD法を用いて行った。発生率等の百分率のデータは、アークサイン変換後に統計処理を行った。

2. 結果

体外成熟・体外受精によって作成した4～8細胞期胚を種々の濃度のβ-メルカプトエタノール(0, 5, 10, 50 μM)を添加した発生培養液で2%二酸化炭素・98%空気で卵丘細胞と共培養した結果を図4に示した。Day 7における胚盤胞への発生率は、0 μM: 15.4±2.4%, 5 μM: 22.7±2.7%, 10 μM: 28.4±2.3%, 50 μM: 18.6±4.3%, Day 8における胚盤胞への発生率は、0 μM: 28.9±1.34%, 5 μM: 36.7±2.6%, 10 μM: 46.0±4.3%, 50 μM: 34.2±2.7%であった。10 μM添加区におけるDay 7あるいはDay 8における胚盤胞への発生率は、0あるいは50 μM添加区に比べて有意に高かった。

第四節 考察

共培養条件で培養気相中の二酸化炭素濃度を5%から2%にすることにより、胚盤胞への発生率を高めることができた。Pinyopummintr & Bavister (1995)は、2.5あるいは5%二酸化炭素の培養気相では、核の成熟率や受精率に差は認められないが、10%二酸化炭素では、正常受精率が低下することを報告した。Wangら(1992)及びYangら(1994)は、10%に比べて5%二酸化炭素濃度での胚盤胞への発生率が高いことを報告している。これらのことから、高濃度の二酸化炭素は、ウシ胚の胚盤胞への発生を抑制する可能性が考えられる。

着床前の哺乳動物卵子の発生に対するpHの影響を調べた報告はいくつかある[Brinster, 1965; Kane, 1974; McKiernan & Bavister, 1990]が、pHが家畜胚の発育に及ぼす影響については知られていない。Ganzら(1989)は、二酸化炭素が細胞の発育、とりわけ細胞内pHの恒常性の維持に重要であることを明らかにしている。ウシ胚の培養液の至適pHは明らかではないが、2%二酸化炭素での胚盤胞への発生率は5%二酸化炭素での発生率よりも高かったことから、培養液の低いpHは、胚の発育を抑制する可能性が考えられる。ウシ胚の胚盤胞への発生率を促進する至適pHの検討が今後さらに必要である。

最近、低分子チオール化合物(β-メルカプトエタノールあるいはシステアミン)を培養液に添加することにより、共培養せずに培養液のみでウシ2～16細胞期から[Caamanoら, 1996; Hamanoら, 1994; Takahashiら, 1993], また、卵丘細胞との共培養条件でウシ1

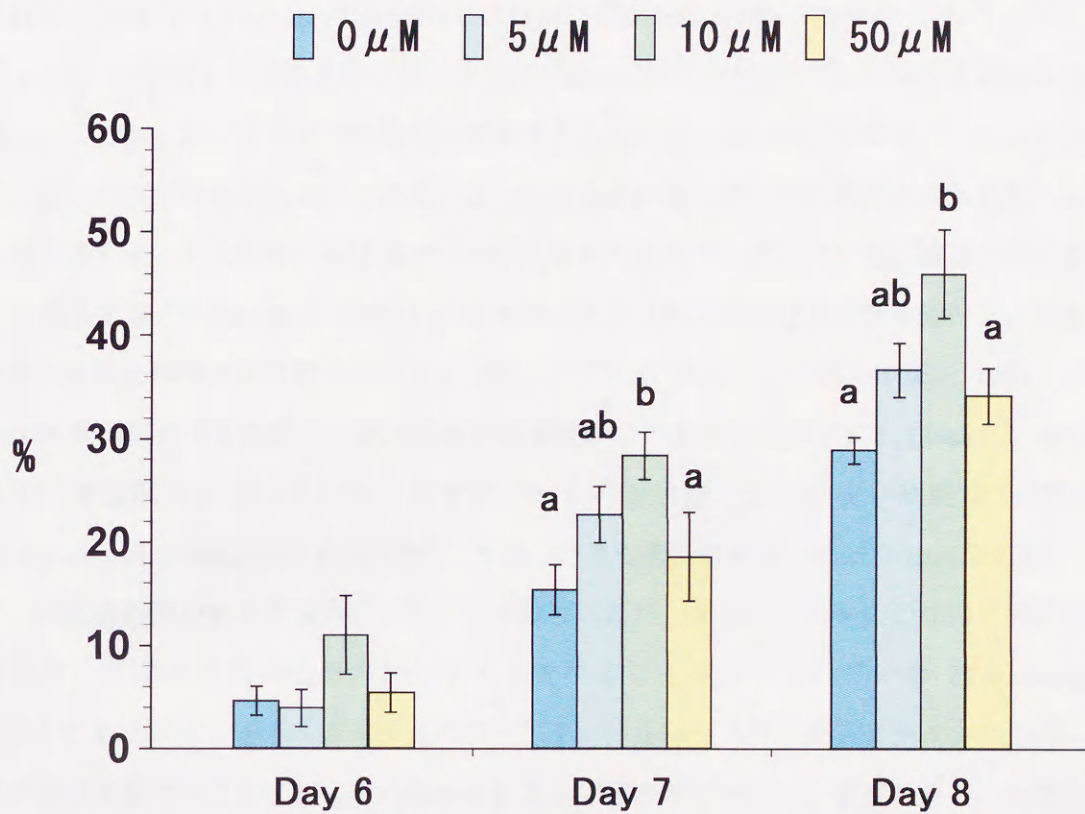


図4. 共培養系における発生培地へのβ-メルカプトエタノールの添加が体外成熟・受精・培養ウシ4~8細胞期胚の胚盤胞への発生率に及ぼす影響

a-b: 同一日異符号間に有意差あり(P<0.05: ANOVA & Fisher's PLSD test)

細胞期から胚盤胞期への発生を促進すること [Limら, 1996] が報告された。今回の我々の結果は、培養条件は異なるものの (Limら: BSA添加BECM, 5%二酸化炭素・95%空気, 著者ら: 過排卵処置牛血清添加TCM199, 2%二酸化炭素・98%空気), Limら (1996) の結果と一致するものである。我々の実験結果から得られたβ-メルカプトエタノールの至適濃度 (5 μM) はHamanoら (1994) (5~10 μM) やLimら (1996) (6.25~12.5 μM) の報告と同様な濃度であったが, Takahashiら (1993) (50 μM) の報告よりは低いものであった。ウシ胚の胚盤胞への発育のためのβ-メルカプトエタノールの至適濃度に違いが出た理由は明らかではないが, 培養条件の違いが一つの原因かもしれない。

低分子チオール化合物の牛胚発生への有効性は, 細胞内のグルタチオン濃度の高めることと関係する [Takahashiら, 1993]。グルタチオンは細胞内の還元状態を維持し, 酸素傷害から細胞を保護する作用を持つことが知られている [Limら, 1996; Meister, 1983]。ヒトIMR-90細胞のようなフィーダー細胞が培養液中にチオールを放出する [Ishiiら, 1981]。また, 至適濃度のβ-メルカプトエタノールの添加は, フィーダー細胞上でのPSA1 mouse embryonic carcinoma cellの発育に有効であると報告されている [Oshima, 1978]。最近, 卵丘細胞等の共培養細胞がシスチンを取り込んで, グルタチオンの合成のために必要であり, 胚が取り込める形のシステインを作ることが報告されている [Takahashiら, 1995]。以上のことから, β-メルカプトエタノールはシスチンをシステインに還元し, 胚や卵丘細胞のシステインの取り込みを促進して胚のグルタチオン濃度を高め, 胚盤胞へ発生する胚の数をふやすことが示された。

以上の結果から, 二酸化炭素濃度を5%から2%へさげるとともに, 媒精2日後に発生した4~8細胞期の胚をβ-メルカプトエタノール添加培地で卵丘細胞と共培養することにより, ウシ体外成熟・受精・培養胚の胚盤胞への発生率を向上させることが明らかとなった。

第五節 摘要

卵丘細胞との共培養系における二酸化炭素濃度あるいは β -メルカプトエタノールの添加がウシ胚の発育に及ぼす影響を検討した。第二節においては、体外成熟後のウシ卵子を媒精し、卵丘細胞とともに発生用培養液（5%過排卵処置牛血清，0.5mMピルビン酸添加25mMヘパス緩衝TCM199を用いて培養した。培養気相としては、2%二酸化炭素・98%空気あるいは5%二酸化炭素・95%空気を用いた。二酸化炭素濃度は、成熟率・受精率および卵割率には影響しなかった。しかし2%二酸化炭素での胚盤胞への発生率は、5%二酸化炭素で培養したときよりも有意に高かった。第三節においては、体外成熟・体外受精によって作成した4~8細胞期胚を種々の濃度の β -メルカプトエタノール（0，5，10，50 μ Mを添加した発生培養液を用いて2%二酸化炭素・98%空気で卵丘細胞と共培養した。10 μ M添加区における胚盤胞への発生率は0あるいは50 μ M添加区に比べて、有意に高かった。以上の結果から、2%二酸化炭素・98%空気で卵丘細胞と共培養を行うことにより、また、媒精2日後に発生した4~8細胞期の胚を β -メルカプトエタノール添加培地で卵丘細胞と共培養することにより、ウシ体外成熟・受精・培養胚の胚盤胞への発生率を向上させることが明らかとなった。

第四章 発生培地の種類あるいは培養気相中の酸素分圧が胚盤胞への発生率に及ぼす影響

第一節 緒言

前章においては、卵丘細胞との共培養系による発生培養法について検討を行った。しかしながら、胚の初期発生に関与する因子の解明のためには共培養細胞や血清添加を必要としないより単純な培養系が必要とされる。また、体外受精由来産子に過大子が多くみられ〔Haslerら, 1995; Kruip & DenDaas, 1997; Reichenbachら, 1992; Van Wagtendonk-De Leeuwら, 1998; Youngら, 1998〕, その原因として培養液に添加される血清及び共培養細胞の影響が指摘されている〔Thompsonら, 1995; Walkerら, 1996; Sinclairら, 1999〕。また、胚を培養する培養気相中の酸素濃度も酸素傷害等により胚発生に影響を及ぼす可能性が報告されている。ウシ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が、TCM199は数多くの無機塩類, アミノ酸, ビタミン等を含む組成の複雑な培地であり, しかも含有するグルコースは受精卵の初期発生に悪影響を及ぼす可能性が示唆されている〔Takahashi & First, 1992〕。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CR1aa〔Rosenkrans Jr ら, 1993〕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, TCM199あるいはCR1aa培地を用いて, 発生培養に用いる基本培地や共培養細胞の有無あるいは非共培養系での血清添加の有無あるいは培養気相中の酸素分圧の違いがウシ体外成熟・受精卵の胚盤胞への発生に及ぼす影響について検討した。

第二節 基本培地の違いあるいは共培養細胞の有無がウシ体外成熟・受精卵の胚盤胞への発生率に及ぼす影響

本節においては, TCM199あるいはCR1aa培地を用いて, 発生培養に用いる基本培地や共培養細胞の有無がウシ体外成熟・受精卵の胚盤胞への発生に及ぼす影響について検討した。

1. 材料と方法

(1) 卵子の体外成熟・受精法

培養はすべて5%二酸化炭素・95%空気、39℃の炭酸ガス培養器中で行った。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ヘペス緩衝TCM199+10%牛胎仔血清+0.02AU/ml卵胞刺激ホルモン）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) 発生培養

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条件下で発生培養を行った。発生培地としては5%過排卵処置牛血清添加25mMヘペス緩衝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8日間の体外受精卵の胚盤胞への発生状況を調べた。

(3) 統計処理

有意性の検定は χ^2 -testを用いて行った。

2. 結果

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および胚盤胞への発生率に及ぼす影響を調べた結果を図5に示した。受精卵を卵丘細胞と共培養した場合、基本培地による卵割率（mCR1aa：76%、mTCM199：80%）及び胚盤胞への発生率（mCR1aa：23%、mTCM199：22%）に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、

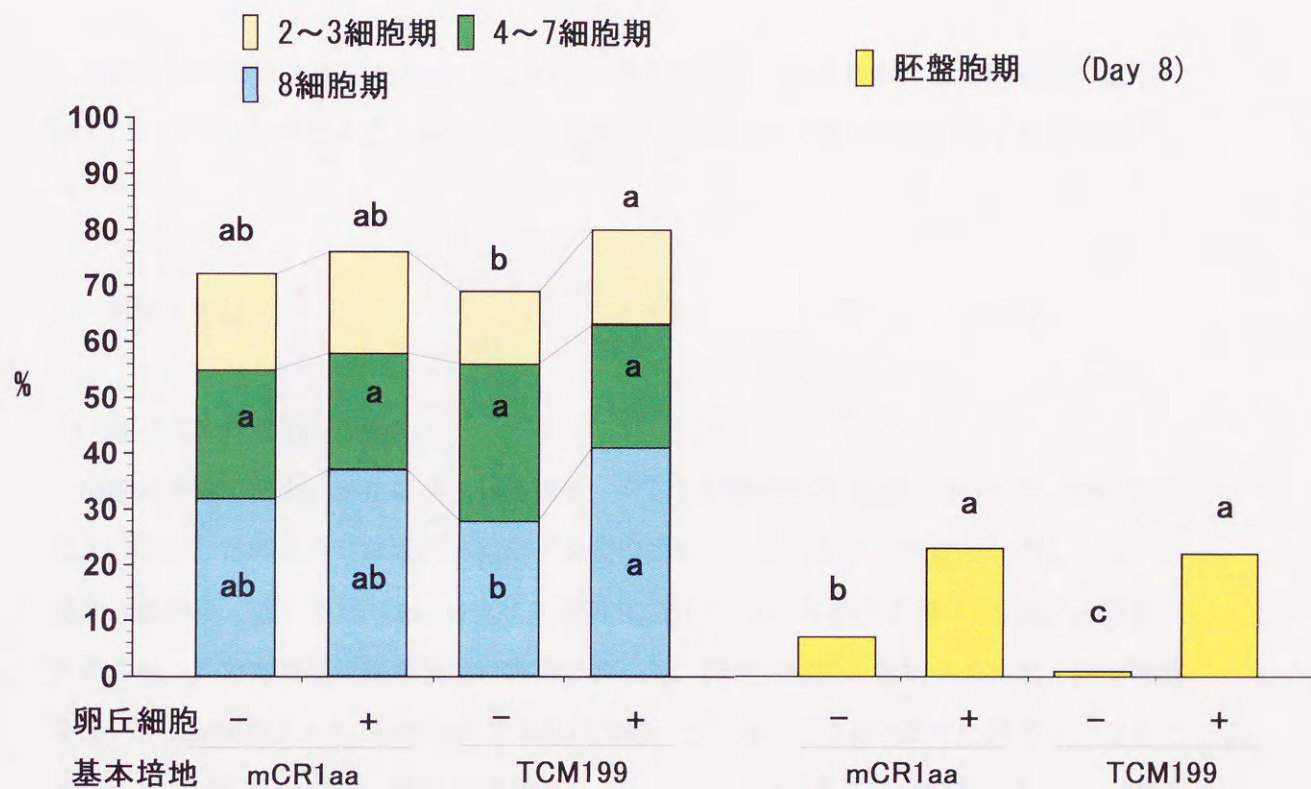


図5. 発生用基本培地の違い及び卵丘細胞の有無がウシ体外成熟・受精卵の発生率に及ぼす影響

発生培地には5%過排卵処置牛血清を添加し、5%二酸化炭素濃度の炭酸ガス培養器内で培養した

a-c: 同一ステージ異符号間に有意差あり(P<0.05; χ^2 -test)

しかも基本培地による差が認められ、TCM199を用いた場合（1%）にmCR1aa（7%）と比較して有意に低い胚盤胞への発生率を示した。

第三節 mCR1aaへのポリビニルアルコール、BSAあるいは血清の添加が、非共培養系でのウシ体外成熟・受精卵の胚盤胞への発生率に及ぼす影響

本節においては、mCR1aaへのポリビニルアルコール、BSAあるいは過剰排卵牛血清の添加が、非共培養系でのウシ体外成熟・受精卵の胚盤胞への発生率に及ぼす影響を検討した。

1. 材料と方法

(1) 卵子の体外成熟・受精法

培養はすべて5%二酸化炭素・95%空気、39℃の炭酸ガス培養器中で行った。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ヘペス緩衝TCM199+10%牛胎仔血清+0.02AU/ml卵胞刺激ホルモン）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) 発生培養

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①1mg/mlポリビニルアルコール（PVA）添加mCR1aa②3mg/mlBSA添加mCR1aa（CR1aa）③5%過排卵処置牛血清添加mCR1aaを用いた。

(3) 統計処理

有意性の検定は χ^2 -testを用いて行った。

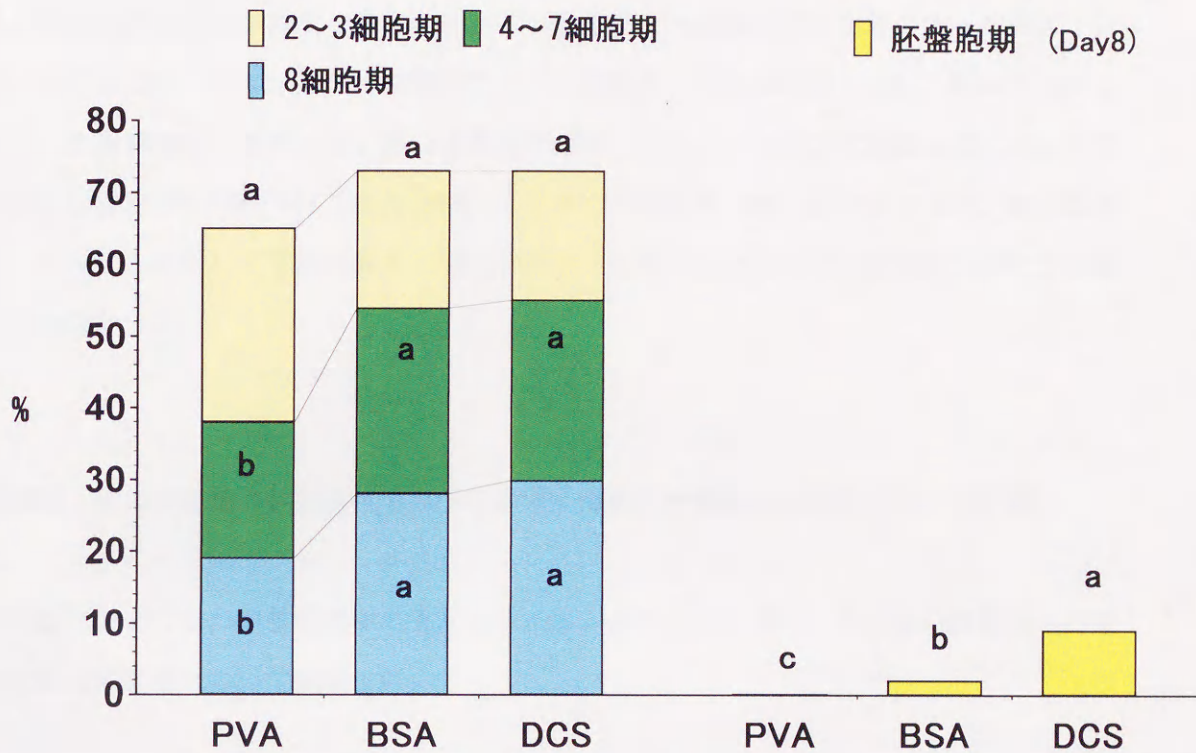


図6. 発生培地へのPVA、BSAあるいは血清の添加が非共培養系におけるウシ体外成熟・受精卵の発生率に及ぼす影響

PVA: 1mg/mlポリビニルアルコール添加mCR1aa
 BSA: 3mg/mlウシ血清アルブミン添加mCR1aa(オリジナルのCR1aa)
 DCS: 5%過排卵処置牛血清添加mCR1aa
 a-c: 同ステージ異符号間に有意差あり(P<0.05; χ^2 -test)

2. 結果

mCR1aaへのPVA, BSAあるいは過剰排卵牛血清の添加が体外成熟・受精卵の発生に及ぼす影響について調べた結果を図6に示した。媒精54時間後における卵割率は, PVA添加区: 65%, BSA添加区: 73%, 血清添加区: 73%であり, 処置区間に差は認められなかった。媒精54時間後における4細胞期以上への発生率(PVA添加区: 38%, BSA添加区: 54%, 血清添加区: 55%)及び8細胞期以上への発生率(PVA添加区: 19%, BSA添加区: 28%, 血清添加区: 30%)は, PVA添加区が他の2区に比べて有意に低かった。Day 8における胚盤胞への発生率は, 血清添加区(9%)が他の区(PVA添加区: 0%, BSA添加区: 2%)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。

第四節 酸素分圧が非共培養系でのウシ体外受精卵の胚盤胞への発生に及ぼす影響

本節においては, 培養気相中の酸素分圧の違いがウシ体外成熟・受精卵の胚盤胞への発生に及ぼす影響について検討した。

1. 材料と方法

(1) 卵子の体外成熟・受精法

培養はすべて5%二酸化炭素・95%空気, 39°Cの炭酸ガス培養器中で行った。食肉処理場より採取した卵巢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ヘパース緩衝TCM199+10%牛胎仔血清+0.02AU/ml卵胞刺激ホルモン)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) 発生培養

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発生試験を行った。発生培地には、媒精5日後までは①1 mg/ml PVA添加mCR1aa②3 mg/ml BSA添加mCR1aa (CR1aa)を用い、その後①あるいは②に5.56mMグルコースを添加した培地で培養した。培養気相としては5%二酸化炭素・95%空気(20%酸素区)あるいは5%二酸化炭素・5%酸素・90%窒素(5%酸素区)を用い、39°Cの炭酸ガス培養器中で培養した。

(3) 統計処理

有意性の検定は χ^2 -testを用いて行った。

2. 結果

BSAあるいはPVP添加mCR1aaを用いて発生培養中の酸素分圧の影響を検討した結果を図7に示した。卵割率においては、処置区間に差は認められなかった(5%酸素・BSA: 67%, 20%酸素・BSA: 69%, 5%酸素・PVA: 71%, 20%酸素・PVA: 73%)。PVP区では培養気相中の酸素分圧に関係なく胚盤胞への発生は認められなかった。しかしながら、BSA区のDay 8における胚盤胞への発生率及びDay 10における脱出胚盤胞への発生率は20%酸素区(10%, 3%)にくらべて5%酸素の低酸素区(24%, 15%)の方が有意に高かった。

第五節 考察

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[Takahashi & First, 1992]がある。また、卵丘細胞は培地中のグルコースを消費してピルビン酸を産生することが報告[Gardner & Leese, 1990]されており、卵丘細胞との共培養条件ではTCM199中の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

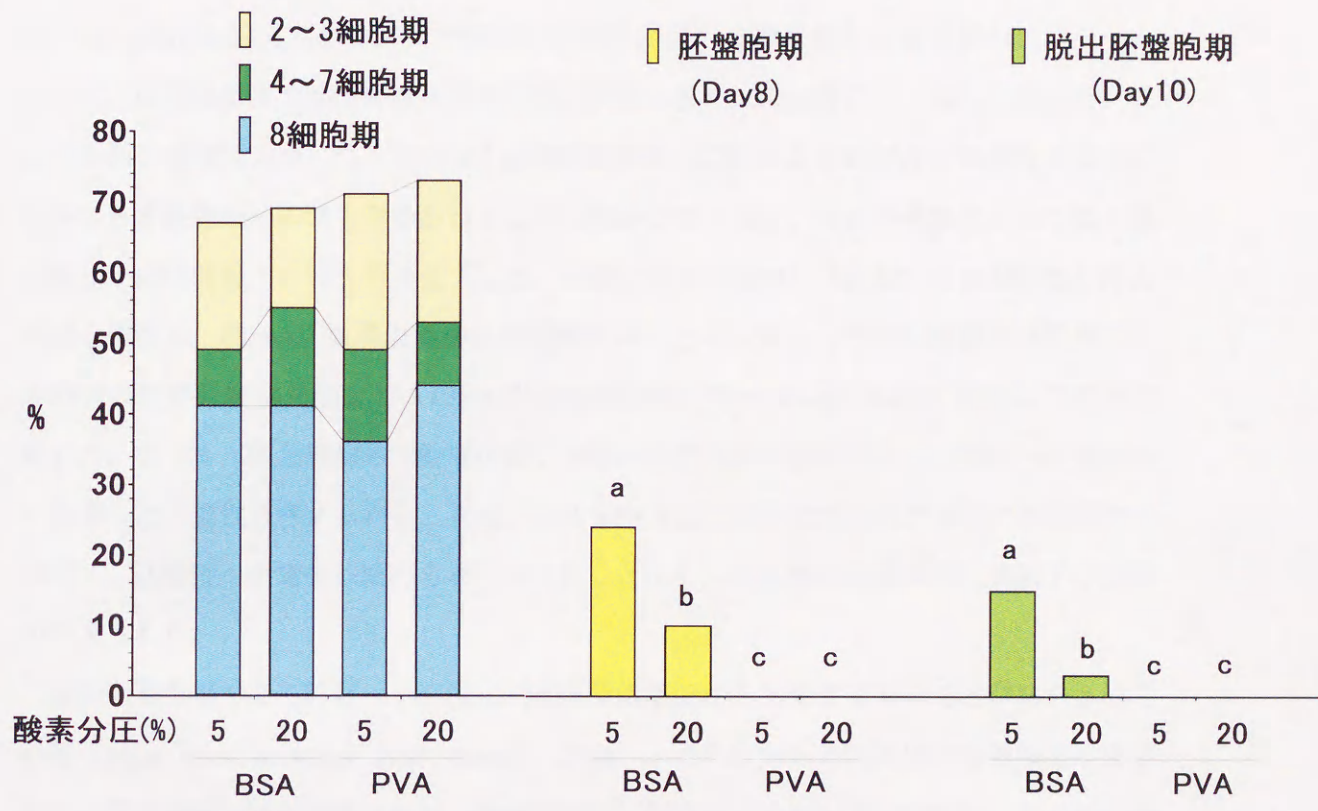


図7. 培養気相中の酸素分圧が体外成熟・受精卵の発生率に及ぼす影響

a-c: 同一ステージ異符号間に有意差あり (P<0.05; χ^2 -test)

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させるとの報告 [Rosenkrans & First, 1991] 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 Jr & First (1991) 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 (1994) 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 (1994) 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。

胚の発育環境である卵管・子宮内における酸素濃度は5%程度であることが報告されている [Mastroianni & Jones, 1965; Massら, 1976]。これに対して胚の体外培養環境は通常5%二酸化炭素・95%空気であり、酸素濃度は体内濃度に比べて高い約20%となっている。マウス [Quinn & Harlow, 1978]、ハムスター [McKiernan & Bavister, 1990]、ウサギ [Li & Foote, 1993]、ウシ [Nagaoら, 1994; Tompsonら, 1990]、ヒツジ [Tompsonら, 1990; Watsonら, 1994] あるいはヒト [Nodaら, 1994] 胚の培養において、酸素濃度を20%から5%へ下げることによって胚発生が促進されることが報告されている。今回の実験結果はこれらの報告と一致するものである。卵丘細胞との共培養条件では、卵丘細胞が酸素を消費して胚周辺の酸素濃度が低下して胚を酸化傷害から守っているが、胚のみを5%二酸化炭素・95%空気の培養気相下で培養すると、体外における高い酸素濃度が関与する酸化傷害が胚発生に悪影響を及ぼしていることが考えられる。すなわち、胚のみを培養する非共培養系においては、5%酸素・5%二酸化炭素・90%窒素の低酸素環境下で培養を行う必要があることが明らかとなった。

第六節 摘要

ウシ体外成熟・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かとなった。さらに、非共培養系では、通常培養に用いられている酸素分圧よりも低い5%の酸素分圧を用いることにより、胚盤胞への発生率が高まることが明らかとなった。

第五章 ウシ未成熟卵子の成熟培養方法が成熟率・受精率及びその後の胚発生に及ぼす影響

第一節 緒言

体外成熟・体外受精由来胚は、バイオテクノロジー的な目的のみならず家畜の改良のためにも利用可能である。近年、Grupenら（1995）は成熟培地へのシステアミンの添加は卵子のグルタチオン含量を高めることにより、体外成熟・受精ブタ卵子の胚盤胞への発生率を高めることを報告した。マウス [Calvinら, 1986] , ハムスター [Perreaultら, 1988] , ブタ [Yoshidaら, 1993] 及びウシ [de Matosら, 1995; de Matosら, 1996; Miyanumaら, 1995] において卵子の成熟中にグルタチオン合成が起こることが知られている。また、グルタチオンは卵子の活性化に伴う精子の脱凝縮や侵入精子頭部の雄性前核形成に関与する [Calvinら, 1986; Perreaultら, 1988; Perreaultら, 1984; Yoshidaら, 1992; Yoshida, 1993] 。さらに、グルタチオンは細胞を酸素傷害から守るためにも大きな役割を果たす [Limら, 1996; Meister, 1983] 。

血清添加成熟培地へのシステアミンの添加がウシ体外成熟・受精卵の発生率を高めることはすでに報告されている [de Matosら, 1995; de Matosら, 1996] 。しかしながら、血清は未知の成分を含んでおり、血清を添加した培地を用いた場合に結果の解釈が難しくなるため、血清を含まない組成の明らかな培地の利用がシステアミンのような物質の作用を解明するうえで必要となる。

そこで、第二節においては成熟培地への血清添加の有無が、ウシ未成熟卵子の体外成熟率、受精率および胚盤胞への発生率に及ぼす影響について検討した。さらに、第三節において、血清無添加の成熟培地へのシステアミンの添加が、ウシ未成熟卵子の体外成熟率、ウシ体外成熟卵子のグルタチオン含量、受精率あるいは胚盤胞への発生率に及ぼす影響を検討した。

第二節 成熟培地への血清添加の有無がウシ未成熟卵子の成熟率・受精率及びその後の胚発生に及ぼす影響

成熟培地へ添加する血清によって、未成熟卵胞卵子の成熟率、その後の卵割率や胚盤胞への発生率に大きな差があることが知られている [Fukuiら, 1991; Younisら, 1989]。また、成熟に関与する因子の検索のためには血清のような未知の成分を含まない培養液の使用が不可欠である。本節においては、ウシ体外成熟・体外受精卵の胚盤胞への発生に及ぼす血清添加の影響について検討した。

1. 材料および方法

(1) 未成熟卵の採取と体外成熟

食肉処理場においてと畜後1時間以内に牛卵巢を採取し、39℃に加温した滅菌生理食塩水に入れて実験室に持ち帰った。卵子の吸引には、抗生物質（ペニシリンGカリウム（明治製菓）100 U/ml, 硫酸ストレプトマイシン（明治製菓）100 μ g/ml）と3 mg/mlのウシ血清アルブミン（BSA：和光純薬）を加えた修正リン酸緩衝液を少量入れた18あるいは19Gの注射針をつけた5 mlの注射器を用い、卵巢表面の小卵胞（1 cm以下）より卵子を吸引採取した。吸引した卵子は1 mg/mlポリビニルアルコール（SIGMA）を添加した修正リン酸緩衝液及び体外成熟培地で洗浄後、緊密な卵丘細胞層に包まれた卵子を選別し、流動パラフィン（ナカライテスク）で覆った100 μ lの体外成熟培地中に10個ずつ入れ、5%二酸化炭素・95%空気、39℃の炭酸ガス培養器に入れ20～22時間成熟培養を行った。体外成熟培地としては、10%非働化牛胎仔血清（FCS：M.A.Bioproducts）あるいは1 mg/mlポリビニルアルコール（SIGMA）を添加した、0.02 AU/ml卵胞刺激ホルモン（アントリン：デンカ製薬）及び抗生物質を添加25mMヘプス緩衝TCM-199（GIBCO）を使用した。

(2) 体外受精

精液は黒毛和種1頭の凍結精液を用いた。1～2本の0.5mlストロー凍結精液を温湯中で融解し、小試験管を用いて、BSAを除いた修正タイロッド液（BO液）にカフェイン（安息香酸ナトリウムカフェイン中のカフェインを50%として計算、SIGMA）を10mM加えた液（Caf-BO液）で精子を2回洗浄（500×G, 5分間）した。洗浄後、精子濃度を

Caf-BO液で 25×10^6 精子/mlに調整し、BSA (Crystalized Albumin: SIGMA) 20mg/ml, ヘパリン10U/ml (ヘパリンナトリウム注Nシミズ: 清水製薬) を含む修正タイロード液 (Hep-BSA-BO液) で等倍に希釈した。この精子浮遊液を $100 \mu\text{l}$ の小滴にして流動パラフィンで覆い、炭酸ガス培養器内で30分間培養した。その後、体外成熟卵をHep-BSA-BO液で洗浄し、精子浮遊液の小滴中に10個ずつ導入した。

(3) 体外受精後の発生

卵子は媒精6時間後に発生培地に移しかえた。発生培地は、10%非働化牛血清、0.5mMピルビン酸ナトリウム、20mM乳酸ナトリウム (60%シロップ, SIGMA) 及び抗生物質を添加した25mMヘプス緩衝TCM-199とし、 $100 \mu\text{l}$ の小滴を流動パラフィンで覆い使用した。1小滴あたり10個の卵子を移しかえた。牛血清としては、過排卵処置を行い、良好な反応を示して正常胚の回収された牛より発情後8日目に採血して作製した過排卵処置牛の血清を用いた。

媒精54時間後に卵子を卵丘細胞から取り外して卵割状況を検査し、卵割した胚のみを新たに準備した発生培地に移し、卵丘細胞との共培養は行わず発生培地のみで培養を続けた。培地は48時間ごとに交換し、媒精後6~9日 (媒精日=0日) にかけて胚盤胞への発生を検査した。

(4) 統計処理

有意性の検定は χ^2 -testを用いて行った。

2. 結果

成熟培地への血清添加の有無が成熟率及び発生率に及ぼす影響を調べた結果を図8に示した。成熟培養20~22時間後の成熟率は、血清添加区で79% (154/196), PVA添加無血清区で78% (155/198) であり、血清添加の影響は認められなかった。また、媒精54時間後の卵割率 (血清添加区: 67%, PVA添加区: 69%) あるいは胚盤胞への発生率 (血清添加区: 14%, PVA添加区: 13%) にも差は認められなかった。

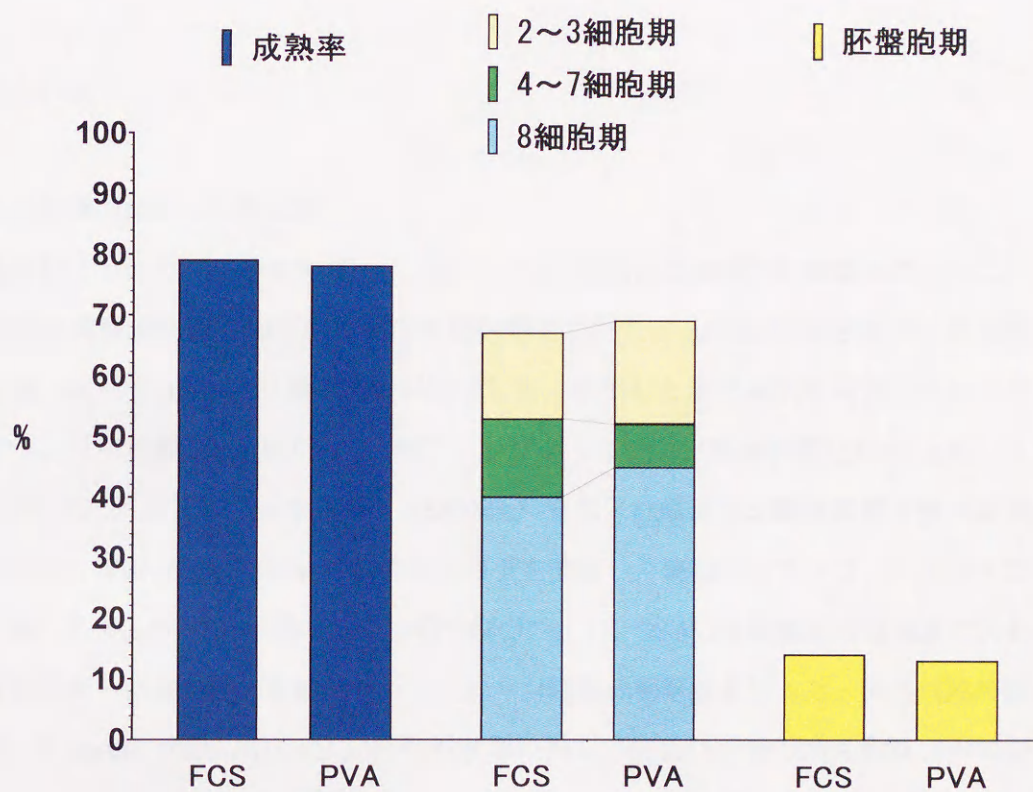


図8. 成熟培地への血清添加の有無がウシ未成熟卵子の成熟率及び体外受精後の発生率に及ぼす影響

FCS: 10%ウシ胎仔血清、0.02AU/ml pFSH添加TCM199 (成熟培地)
 PVA: 1mg/mlポリビニルアルコール、0.02AU/ml pFSH添加TCM199 (成熟培地)

第三節 無血清成熟培地へのシステアミンの添加がウシ未成熟卵子の成熟率・受精率及びその後の胚発生に及ぼす影響

本節においては、血清無添加の成熟培地へのシステアミンの添加が、ウシ未成熟卵子の体外成熟率、ウシ体外成熟卵子のグルタチオン含量、受精率あるいは胚盤胞への発生率に及ぼす影響を検討した。

1. 材料と方法

(1) 未成熟卵の採取と体外成熟

食肉処理場においてウシ卵巢を採取し、35~39℃に加温した滅菌生理食塩水に入れて、5時間以内に実験室に持ち帰った。18Gの注射針をつけた5mlの注射器を用い、卵巢表面の小卵胞(3~6mm)より卵子を吸引採取した。吸引した卵子は抗生物質(ペニシリンGカリウム(明治製菓)100U/ml, 硫酸ストレプトマイシン(明治製菓)100 μ g/ml)と1mg/mlのポリビニルアルコール(PVA:SIGMA)を加えた修正リン酸緩衝液・体外成熟培地で洗浄後、緊密な卵丘細胞層に包まれた卵子を選別し、流動パラフィン(ナカライテスク)で覆った50 μ lの体外成熟培地中に約10個づつ入れ、38.5℃の炭酸ガス培養器に入れ、5%二酸化炭素・95%空気の培養気相下で、22~24時間成熟培養を行った。体外成熟培地としては、1mg/ml PVA, 0.02AU/ml卵胞刺激ホルモン(SIGMA)及び抗生物質(ペニシリンGカリウム(SIGMA)100U/ml, 硫酸ストレプトマイシン(SIGMA)100 μ g/ml)を添加した25mMヘ pes 緩衝TCM-199(SIGMA)を使用した。

(2) 体外受精

精液は1頭の凍結精液を用いた。0.5mlストロー凍結精液を37℃の温湯中で15秒間融解し、小試験管を用いて、BSAを除いた修正タイロード液(BO液)にカフェイン(安息香酸ナトリウムカフェイン中のカフェインを50%として計算, SIGMA)を10mM加えた液(Caf-BO液)で精子を2回洗浄(600 \times g, 5分間)した。洗浄後、精子濃度をCaf-BO液で 1×10^7 精子/mlに調整し、BSA(Crystalized Albumin:SIGMA)20mg/ml, ヘパリン15 μ g/ml(ICN Biochemicals)を含む修正タイロード液(Hep-BSA-BO液)で等倍に希釈した。この精子浮遊液を100 μ lの小滴にして流動パラフィンで覆い、炭酸ガス培養器

内で30分間培養した。その後、体外成熟卵をHep-BSA-BO液で洗浄し、精子浮遊液の小滴中に約10個ずつ導入した。

(3) 体外受精後の発生

卵子は媒精6時間後に精子浮遊液から取り出し、ピペッティングにより卵丘細胞を取り除いた後、発生培地に移しかえた。発生培地にはCR1aaを用い、50 μ lの小滴を流動パラフィンで覆い使用した。1小滴あたり約10個の卵子を移しかえた。卵子は5%二酸化炭素・5%酸素・90%窒素の培養気相下、38.5℃で培養した。5日間培養後、5.56mMグルコース添加CR1aaに卵子を移し替え、さらに4日間培養を継続した。発生試験は7回反復した。

(4) 成熟率及び受精率の判定

一部の卵子は、成熟率の検査のために成熟培養24時間後に、また、受精率の検査のために媒精10~12時間後に抜き取ってホルマウント標本を作製し、カルノア液（酢酸：エタノール=1：3）で固定後、1%アセトオルセインで染色した。精子の尾部を伴った雌雄両前核の存在により正常受精を判定し、受精率を検査した。成熟率の判定は5反復、受精率の判定は4反復行った。

(5) グルタチオンの測定

培養前と0, 0.5, 5, 50及び500 μ Mシステアミン添加培地で24時間培養後の卵子をグルタチオン測定に用いた。卵丘細胞卵子複合体はすべて裸化し、3mg/mlポリビニルピロリドン（PVP：SIGMA）添加生理的食塩水で5回洗浄した。5 μ lの3mg/ml PVP添加蒸留水に50個の卵子をとって、1.5mlのマイクロチューブに移し、5 μ lの1.25M H_3PO_4 を加えた。その後、2,000gで5分間遠心分離を行った後、分析まで-80℃で凍結保存した。グルタチオン含量はFunahashiら（1994）の報告に基づきDTNB-GSSG reductase recycling assayによって測定した。すなわち、サンプルを融解後のマイクロチューブに0.33mg/mlのNADPHを含む10mM EDTA, 0.2M リン酸緩衝液（pH7.2）700 μ l, 6mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid（DTNB）100 μ l, 蒸留水190 μ lを加えて十分に混合し、250 IU/mlのglutathione reductase 10 μ lをさらに加えて混合した。分光光度計を用いて412nmの吸光度を30秒間隔で3分間測定した。0.1~1 nmolのグルタチオンスタンダードとブランクも同時に測定した。グルタチオン含量はCalvinら（1986）の報告に基づいて計算した。

(6) 統計処理

STATVIEW (Abacus Concepts, Inc.) を用いて, 分散分析及びFisherのPLSD法により, 有意差検定を行ない, 危険率5%未満を統計的に有意と見なした。成熟率・受精率・発生率等の百分率のデータは, アークサイン変換後に統計処理を行った。

2. 結果

無血清成熟培地へのシステアミンの添加がウシ未成熟卵子の成熟率・受精率及びその後の発生率に及ぼす影響を図9に示した。成熟率 ($0 \mu\text{M}$: $73.8 \pm 4.8\%$, $0.5 \mu\text{M}$: $80.5 \pm 3.2\%$, $5 \mu\text{M}$: $74.7 \pm 1.6\%$, $50 \mu\text{M}$: $77.4 \pm 5.8\%$, $500 \mu\text{M}$: $72.3 \pm 4.0\%$), 精子侵入率 ($0 \mu\text{M}$: $71.5 \pm 6.5\%$, $0.5 \mu\text{M}$: $76.5 \pm 8.8\%$, $5 \mu\text{M}$: $78.5 \pm 3.6\%$, $50 \mu\text{M}$: $75.6 \pm 8.7\%$, $500 \mu\text{M}$: $87.8 \pm 2.9\%$), 正常受精率 ($0 \mu\text{M}$: $53.9 \pm 5.8\%$, $0.5 \mu\text{M}$: $57.0 \pm 4.4\%$, $5 \mu\text{M}$: $51.7 \pm 7.3\%$, $50 \mu\text{M}$: $49.9 \pm 7.0\%$, $500 \mu\text{M}$: $53.3 \pm 10.0\%$), 卵割率 ($0 \mu\text{M}$: $64.3 \pm 5.0\%$, $0.5 \mu\text{M}$: $60.9 \pm 4.2\%$, $5 \mu\text{M}$: $63.4 \pm 3.0\%$, $50 \mu\text{M}$: $66.0 \pm 2.1\%$, $500 \mu\text{M}$: $63.3 \pm 3.6\%$) 及び6細胞期以上への発生率 ($0 \mu\text{M}$: $37.2 \pm 3.3\%$, $0.5 \mu\text{M}$: $39.4 \pm 3.8\%$, $5 \mu\text{M}$: $41.2 \pm 3.4\%$, $50 \mu\text{M}$: $39.6 \pm 2.3\%$, $500 \mu\text{M}$: $37.0 \pm 2.6\%$) には処置区間に差は認められなかった。しかしながら, 成熟培地への $5 \mu\text{M}$ システアミン添加区における胚盤胞への発生率 ($28.3 \pm 2.4\%$) は無添加区 ($19.7 \pm 1.6\%$) あるいは $500 \mu\text{M}$ 添加区 ($15.4 \pm 2.5\%$) に比べて高くなった ($0.5 \mu\text{M}$: $21.7 \pm 2.9\%$, $50 \mu\text{M}$: $21.9 \pm 3.3\%$)。

成熟培養前後の卵子1個あたりのグルタチオン含量を図10に示した。無添加区 ($5.49 \pm 0.42 \text{pmol}$) あるいは $0.5 \mu\text{M}$ 添加区 ($5.00 \pm 0.07 \text{pmol}$) のグルタチオン含量は, 培養前のGV期の卵子 ($6.86 \pm 0.19 \text{pmol}$) よりも有意に低かった。一方, $5 \mu\text{M}$ 添加区のグルタチオン含量 ($7.72 \pm 0.71 \text{pmol}$) は培養前のグルタチオン含量と差はなく, 50 ($10.66 \pm 0.21 \text{pmol}$) あるいは $500 \mu\text{M}$ 添加区 ($18.36 \pm 0.18 \text{pmol}$) では培養前に比べて有意に高くなった。

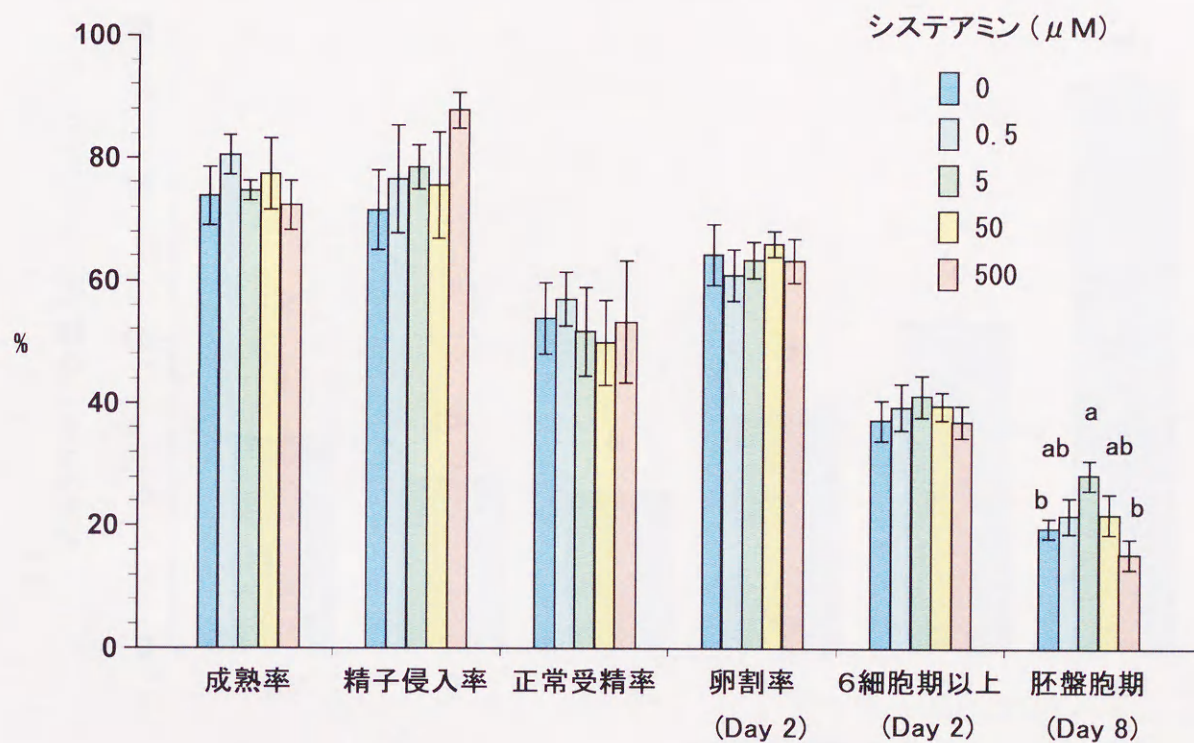


図9. 無血清成熟培地へのシステアミンの添加がウシ未成熟卵子の成熟率・受精率及びその後の発生率に及ぼす影響

a-b: 異符号間に有意差あり (P<0.05; ANOVA & Fisher's PLSD test)

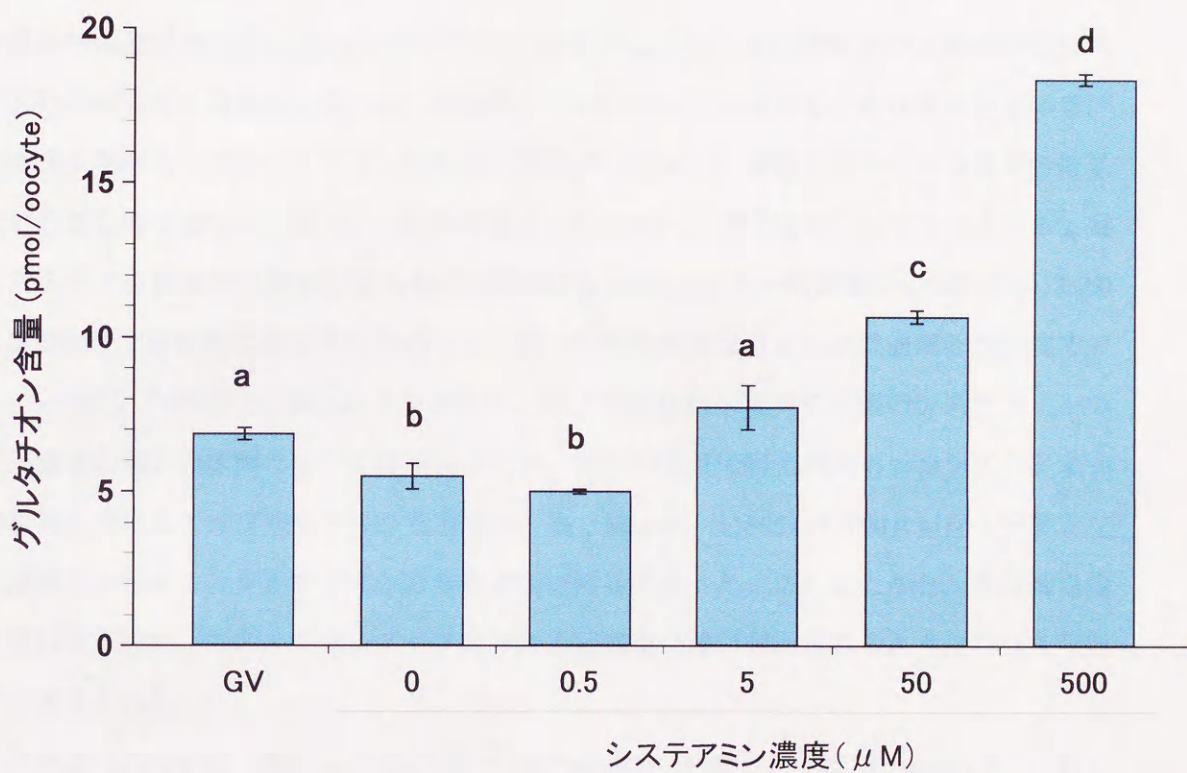


図10. 無血清成熟培地へのシステアミンの添加が成熟培養前後の卵子のグルタチオン含量に及ぼす影響

GV: 成熟培養前の卵子

a-d: 異符号間に有意差あり (P<0.05; ANOVA & Fisher's PLSD test)

第四節 考察

無血清成熟培地への5 μ Mシステアミンの添加は、ウシ体外成熟卵子のグルタチオン含量を成熟培養前と同等のレベルに維持し、胚盤胞への発生率を向上させることが明らかとなった。

Gruppenら (1995) は、成熟培地への500 μ Mシステアミンの添加はブタ体外成熟・受精卵子の胚盤胞への発生率を向上させると報告した。また、de Matosら (1995) はウシ胎児血清添加成熟培地への100 μ Mシステアミンの添加は、ウシ未成熟卵子の成熟率、受精率あるいは卵割率には影響しないが、胚盤胞への発生率は向上させることを報告している。無血清成熟培地へのシステアミンの添加は成熟率や受精率に影響しないという我々の結果はこれを支持するものである。しかしながら、胚盤胞への発生率についてみると、5 μ Mシステアミン添加では効果があるものの無添加や0.5 μ Mあるいは高濃度の50あるいは500 μ M添加区では効果は認められなかった。我々の得た至適濃度5 μ Mは血清添加培地でのde Matosら (1995) の100 μ Mよりも低い。卵子が胚盤胞へ発育する際のシステアミンの至適濃度の違いの原因については不明である。我々の実験で得られた5 μ Mシステアミン添加無血清培地でのグルタチオン含有量は、de Matosら (1995) の100 μ Mシステアミン、血清添加培養液でのグルタチオン含有量とほぼ同じであった。このことから、無血清培地を用いたために、このようなシステアミンの至適濃度に差が認められるようになった可能性が考えられた。

マウス [Calvinら, 1986] , ハムスター [Perreaultら, 1988] , ブタ [Yoshidaら, 1993] やウシ [de Matosら, 1995; de Matosら, 1996; Miyanumaら, 1995] 卵子の成熟中に、グルタチオンが合成される。卵胞液や血清を含む成熟培地へのシステイン、システアミン及び β -メルカプトエタノールの添加はブタ [Yoshidaら, 1993; Yamauchi & Nagai, 1999] やウシ [de Matosら, 1995, de Matosら, 1996] 卵子の体外成熟時にグルタチオンの合成を促進することは報告されている。至適濃度は異なるものの、我々の得た結果はde Matosらの報告 (1995; 1996) と一致するものである。Miyamuraら (1995) は、血清添加培地で成熟培養することにより、ウシ卵子のグルタチオン含量は高まると報告している。しかしながら、今回の結果においては、血清無添加培地を用いた場合には、システアミン無添加あるいは0.5 μ M添加区では体外成熟培養後のグルタチオン含有量は培養前のGV期よりも低下し、成熟培地への5 μ M以上のシステアミンの添加によりGV期と同等あるいはより高くなっ

た。Yamauchi & Nagai (1999) はブタ卵丘細胞卵子複合体をブタ卵胞液を含む成熟培地で培養したとき、成熟中にグルタチオン含量が有意に低下することを報告している。de Matosら (1996) は、卵子のグルタチオン含量は実験ごとの変動が大きいと報告している。また、Yoshidaら (1993) はブタ卵子の成熟において、成熟培地の組成によりグルタチオン含量が変化することを報告している。それゆえ、培養条件や品種により何らかの矛盾のある結果を引き起こしたのかもしれない。

グルタチオンは細胞の還元状態を維持し、酸化傷害から細胞を保護することが知られている [Limら, 1996; Meister, 1983]。しかしながら、抗酸化作用は有限であり、還元型チオールは急激に減少する [Del Corsoら, 1994]。低分子チオール化合物は、細胞中のグルタチオン含量を増加させることにより、ウシ4~8細胞期胚の胚盤胞期への発生を高めることが知られている [Takahashiら, 1993; Geshiら, 1999; Caamanoら, 1998]。さらに、卵丘細胞のような共培養細胞はシスチンを取り込んで、卵子が利用可能なシステインにかえて卵子のグルタチオン合成を促進することが報告されている [Takahashiら, 1995]。以上のことから、成熟培地中のシステアミンはシスチンをシステインに還元して卵子へのシステインの取り込みを促進し、成熟卵子のグルタチオン含量を維持あるいは高めて、胚盤胞への発生率を高めると考えられる。

ウシ卵子をシステアミン添加成熟培地で成熟させることにより、卵子のグルタチオン含量は維持あるいは高められて卵子中の環境が良好に保たれ、胚盤胞への発生率が高まることが推察される。

第五節 摘要

成熟培地への血清添加の有無がウシ未成熟卵子の体外成熟率及び体外受精後の胚盤胞への発生率に及ぼす影響について検討した。と畜場より得られた牛卵巢より未成熟卵胞卵子を吸引採取し、血清添加あるいは無添加の成熟培地を用いて成熟培養を行った。体外成熟培養後、ヘパリン加B O液で洗浄処理した精子を用いて媒精した。媒精6時間後に発生培地に移し、媒精54時間後に卵子を卵丘細胞から取り外して卵割状況を検査し、卵割した胚のみを卵丘細胞との共培養を行ない、媒精後6~9日(媒精日=0日)にかけて胚盤胞への発生率を検査した。その結果、成熟培地への血清添加の有無は、ウシ未成熟卵子の体外

成熟率及び体外受精後の発生率に影響しなかった。

ウシ卵丘細胞卵子複合体を 0, 0.5, 5, 50あるいは500 μ Mシステアミン添加 PVA-HEPES-TCM199 を用いて24時間成熟培養後, 体外受精を行った。媒精6時間後に卵丘細胞を取り除き, 卵子のみを9日間体外培養した。その結果, システアミンは卵子の成熟率や受精率には影響を与えなかった。しかしながら, 成熟培地への5 μ Mのシステアミンの添加は, 胚盤胞への発生率を高めた。0あるいは0.5 μ Mシステアミン添加区の成熟培養後のグルタチオン含量は培養前のGV期の卵子に比べて低かった。しかしながら, 5 μ M添加区のグルタチオン含量は培養前の卵子と同レベル, 50あるいは500 μ M添加区では有意に高くなった。以上の結果から, 無血清成熟培地へのシステアミンの添加は, 体外成熟卵子のグルタチオン含量を培養前のレベルに維持することにより, ウシ体外成熟卵子の胚盤胞への発生率を高めることが明らかとなった。

第六章 ウシ裸化未成熟卵子の体外成熟培養法に関する研究

第一節 緒言

体外受精に用いるために卵巣より注射筒を用いて吸引採取する卵子は卵核胞期と呼ばれる未成熟な時期にあり、受精させるためには体外で培養して受精可能な第2減数分裂中期の時期まで成熟させる必要がある。未成熟卵子を取り巻く卵丘細胞は、透明帯を貫通して卵子と結合様式を介して連絡しており [Allworth & Albertini, 1993]、卵子の成熟やその後の発生に重要な役割をはたすことが知られている [Gilulaら, 1978; Moorら, 1980; Eppig, 1982; Buccioneら, 1990, Nagaiら, 1993]。しかし、マウス [Binor & Wolf, 1979]、ラット [Magnusson, 1980]、ヒツジ [Staigmiller & Moor, 1984]、ブタ [Yamauchi & Nagai, 1999] 及びウシ [Chianら, 1994] において、裸化未成熟卵子も核の成熟が可能であることが知られている。ただし、裸化未成熟卵子由来の成熟卵子も、形態的には卵丘細胞卵子複合体由来の成熟卵子と差は認められないが、裸化未成熟卵子由来卵子の体外受精後の発生率は卵丘細胞卵子複合体由来の成熟卵子に比べて低いことが報告されている [Hyttelら, 1987; Vanderhyden & Armstrong, 1989]。このような発生率の低さは、卵丘細胞の有無により、細胞質の成熟に差がおきることが推察される。しかしながら、卵丘細胞が卵子の成熟にどのような役割を担っているのかについては未だ不明な点が多い。

また、ウシ未成熟卵子の体外成熟培養には一般的に血清を添加した培養液が用いられている [Chianら, 1994; Zhangら, 1995] が、卵子の成熟に関与する物質を検索するためには血清のような未知の成分を含まない培養液を用いた培養方法の確立が必要である。さらに、これまで卵丘細胞が付着した未成熟卵子の体外成熟培養方法は検討されてきたが、卵丘細胞を取り除いた未成熟卵子の合成培地での成熟培養方法については、未だ十分な検討が行われていない。さらに、ウシ裸化未成熟卵子も体外で成熟し、8から32細胞期あるいは胚盤胞期まで発育することは報告されているが、無血清培地を用いて裸化未成熟卵子を体外成熟・受精して得られた胚盤胞の子牛への発生能についての検討は行われていない。

そこで、本章では、無血清成熟培地の種類や成熟培養時の卵丘細胞の有無がウシ未成熟卵子の体外成熟率・受精率、胚盤胞への発生率に及ぼす影響を検討するとともに、裸化未成熟卵子由来胚盤胞の子牛への発生能についても検討した。

第二節 基本培地の違いあるいは卵丘細胞の有無がウシ未成熟卵子の成熟率に及ぼす影響

本節においては、無血清成熟培地の種類及び卵丘細胞の有無がウシ未成熟卵子の体外成熟率に及ぼす影響を検討した。

1. 材料と方法

食肉処理場由来のウシ卵巢小卵胞（直径3～6mm）より18Gの注射針をつけた注射筒を用いて卵胞卵子を吸引採取し、卵丘細胞が緊密に付着した未成熟卵子を選別して実験に供した。選別卵子の約半数は、成熟培養前にピペティングにより卵丘細胞を完全に除去した。0.02 AU/ml ブタ卵胞刺激ホルモン（pFSH；アントリン，デンカ製菓），3 mg/ml ポリビニルピロリドン（SIGMA），100 U/mlペニシリンG（明治製菓）及び100 μ g/ml ストレプトマイシン（明治製菓）を添加した培地を成熟培地として用いて、50 μ lあたり約10個の卵丘細胞卵子複合体（CEOs）あるいは裸化卵子（CDOs）を導入し、38.5 $^{\circ}$ C，5% 二酸化炭素・95%空気の炭酸ガス培養器内で24時間培養した。成熟培養終了後、卵丘細胞卵子複合体の場合は、0.1%ヒアルロニダーゼ（SIGMA）中でピペティングにより卵子より卵丘細胞を取り除いた。その後、卵子のホールマウント標本を作製し、カルノア液（酢酸：エタノール=3：1）で固定した。アセトオルセイン染色液で染色後、卵子の成熟率（第2成熟分裂中期）を位相差顕微鏡を用いて調べた。実験1においては、成熟培地の基本培地として、25mM HEPES緩衝TCM199（mTCM199，GIBCO BRL），mCR1aa（CR1aa [Rosenkrans Jrら，1993] からBSAを除いたもの）あるいはmTL（[Yoshidaら，1992] のTALPからBSAを除いたもの）を用いた。実験2では5.56mMグルコース添加（+）あるいは無添加（-）のmCR1aaを用いてグルコースの影響を調べた。さらに実験3では0.2mMピルビン酸ナトリウム（和光純薬）添加（+）あるいは無添加（-）の25mMHEPES緩衝TCM199を用いてピルビン酸ナトリウムの影響を調べた。

2. 結果

図11に実験1における成熟率を示した。実験1における成熟率は、mTCM199-CDOs；18.8 \pm 2.3%，mTCM199-CEOs；72.5 \pm 4.6%，mCR1aa-CDOs；64.8 \pm 3.7%，mCR1aa-CEOs

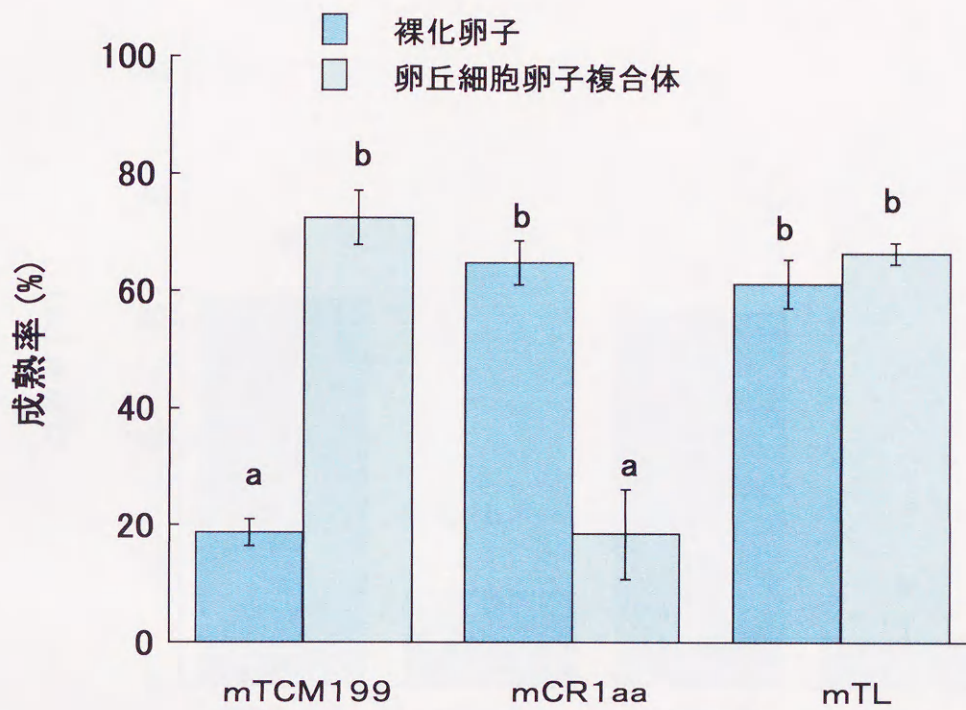


図11. 無血清成熟培地の種類あるいは卵丘細胞の有無がウシ未成熟卵子の体外成熟率に及ぼす影響

成熟培地: 3mg/mlポリビニルピロリドン、0.02AU/ml pFSH添加
 a-b: 異符号間に有意差あり(P<0.05; ANOVA & Fisher's PLSD test)

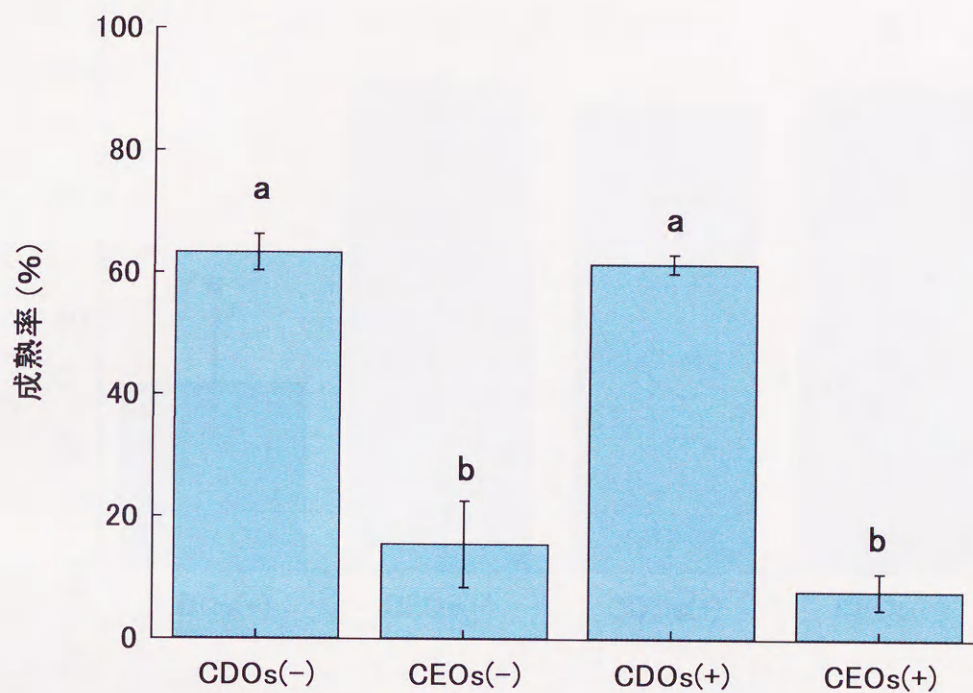


図12. mCR1aaへのグルコースの添加あるいは卵丘細胞の有無がウシ未成熟卵子の成熟率に及ぼす影響

CDOs(-): 裸化卵子: グルコース無添加

CEOs(-): 卵丘細胞卵子複合体: グルコース無添加

CDOs(+): 裸化卵子: 5.56mMグルコース添加

CEOs(+): 卵丘細胞卵子複合体: 5.56mMグルコース添加

a-b: 異符号間に有意差あり(P<0.05; ANOVA & Fisher's PLSD test)

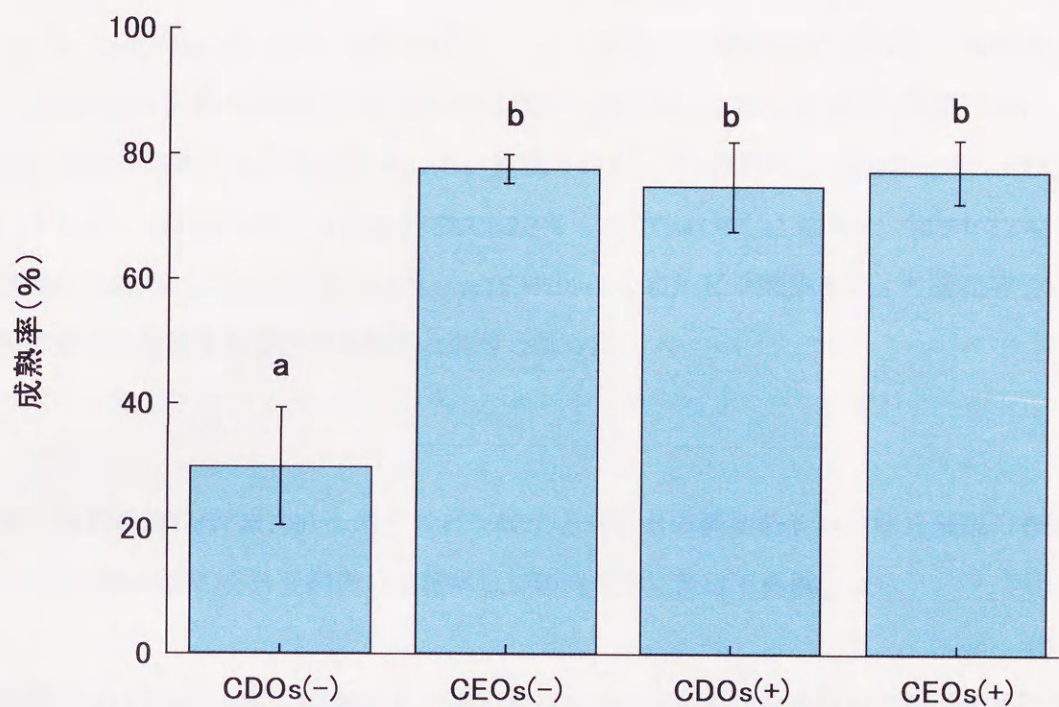


図13. TCM199へのピルビン酸ナトリウムの添加あるいは卵丘細胞の有無がウシ未成熟卵子の成熟率に及ぼす影響

CDOs(-): 裸化卵子;ピルビン酸ナトリウム無添加
 CEOs(-): 卵丘細胞卵子複合体;ピルビン酸ナトリウム無添加
 CDOs(+): 裸化卵子;0.2mMピルビン酸ナトリウム添加
 CEOs(+): 卵丘細胞卵子複合体;0.2mMピルビン酸ナトリウム添加
 a-b: 異符号間に有意差あり(P<0.05; ANOVA & Fisher's PLSD test)

; $18.5 \pm 7.7\%$, mTL-CDOs; $61.2 \pm 4.1\%$, mTL-CEOs; $66.4 \pm 1.8\%$ となり, 卵丘細胞卵子複合体の場合にはmCR1aaで, 裸化卵子の場合にはmTCM199で有意に成熟率が低かった。また, mTCM199-CFOでは $38.8 \pm 3.2\%$ の卵子が第1減数分裂後期(A-I)~第2減数分裂前期(preM-II)で, mCR1aa-CEOでは $77.5 \pm 6.4\%$ の卵子が卵核胞期(GV)~第1減数分裂中期(M-I)で停止していた。図12に実験2における成熟率を示した。実験2における成熟率は, mCR1aa(-)CDOs; $63.3 \pm 3.0\%$, mCR1aa(-)CEOs; $15.5 \pm 7.1\%$, mCR1aa(+)CDOs; $61.5 \pm 1.5\%$, mCR1aa(+)CEOs; $8.0 \pm 3.0\%$ となり, mCR1aaの場合にはグルコース添加の有無にかかわらず, 卵丘細胞卵子複合体の成熟率は裸化卵子に比べて有意に低かった。

図13に実験3における成熟率を示した。実験3における成熟率は, mTCM199(-)CDOs; $30.0 \pm 9.4\%$, mTCM199(-)CEOs; $77.7 \pm 2.3\%$, mTCM199(+)CDOs; $74.9 \pm 7.2\%$, mTCM199(+)CEOs; $77.3 \pm 5.1\%$ となり, mTCM199へのピルビン酸添加により裸化卵子の成熟率は卵丘細胞卵子複合体の成熟率と同等となった。

第三節 成熟培地(mTCM199)へのピルビン酸ナトリウムの添加あるいは卵丘細胞の有無がウシ体外成熟卵子の体外受精後の受精率及び胚発生率に及ぼす影響

本節においては, 前節の実験3の成熟培養法を用いて成熟培養を行った卵子を用いて体外受精・体外培養を行い, 無血清成熟培地(mTCM199)へのピルビン酸ナトリウム添加あるいは卵丘細胞の有無が, 体外成熟卵子の体外受精後の受精率・卵割率及び胚盤胞への発生率に及ぼす影響について検討した。

1. 材料と方法

(1) 成熟培養

食肉処理場由来のウシ卵巣小卵胞(直径3~6mm)より18Gの注射針をつけた注射筒を用いて卵胞卵子を吸引採取し, 卵丘細胞が緊密に付着した未成熟卵子を選別して実験に供した。選別卵子の約半数は, 成熟培養前にピペッティングにより卵丘細胞を完全に除去した。0.2mMピルビン酸ナトリウム添加(+)あるいは無添加(-)の25mM HEPES緩衝TCM199を用いて卵丘細胞卵子複合体あるいは裸化卵子の成熟培養を行い, 卵丘細胞卵子

複合体の場合は成熟培養後に0.1%ヒアルロニダーゼ中でピペッティングにより卵丘細胞を取り除いた。

(2) 体外受精

成熟培養後の裸化卵子を、凍結・融解精液より95%及び45%パーコールを用いて分離 [Parrishら, 1995] した活力の高い精子分画を用いて、最終精子濃度 2×10^6 sperm/mlとした6 mg/ml BSA, 1 μ g/ml エピネフリン (SIGMA), 10 μ g/mlハイポタウリン (SIGMA), 20 μ g/ml ペニシラミン (SIGMA) 及び5 IU/mlヘパリン (清水製薬) 添加TL培地 [Leibfried & Bavister, 1982] で6時間媒精した。

(3) 発生培養

媒精終了後、卵子に付着した精子をピペッティングで取り除き、CR1aaを用いて5%二酸化炭素・5%酸素・90%窒素の低酸素分圧の培養気相下38.5°Cで5日間発生培養を行った。その後、5.56mMグルコース添加CR1aaに移してさらに5日間発生培養を継続した。また、媒精10~12時間後の卵子のホルマウント標本を作製し、固定・染色後、卵子への精子侵入率・正常受精率 (一对の雌雄両前核及び侵入精子の尾部が確認できた卵子を正常受精卵子とした) を位相差顕微鏡を用いて調べた。成熟率の判定は9反復、受精率の判定は8反復、発生率の判定は4反復行った。

(4) グルタチオン含量の測定法

豚においては卵子中のグルタチオン含量が前核の形成等に影響することが知られていることから、成熟培養前後の卵子中のグルタチオン含量をFunahashiら(1994)の方法に基づき、DTNB-GSSG reductase recycling assayにより測定した。すなわち、成熟前後の卵子50から100個を5 μ lの蒸留水とともに1.5mlマイクロチューブに移し、さらに5 μ lの1.25Mリン酸をいれて遠心分離後、測定まで-80度で保存した。測定の際にサンプルを融解し、700 μ lの0.33 mg/ml NADPH, 100 μ lの6 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)及び190 μ lの蒸留水を加えて混合後、さらに10 μ lの250 IU/ml Glutathion reductaseを加えて、30秒ごとに3分間、412nmの吸光度を測定し、Calvinらの方法(1986)に従ってグルタチオン量を計算した。

(5) 統計処理

StatViewプログラム (SAS Institute Inc.) を用いて、分散分析及びフィッシャーのPLSD法により有意差検定を行い、危険率5%未満を統計的に有意とした。結果は、平均値±標準誤差で示した。なお、成熟率・受精率・発生率等の百分率データは、アークサイン変換を行った後に統計処理を行った。

2. 結果

成熟培地 (mTCM199) へのピルビン酸ナトリウムの添加あるいは卵丘細胞の有無がウシ未成熟卵子の成熟率・受精率及び胚発生率に及ぼす影響を図14に示した。成熟率はCDOs (-) $19.6 \pm 6.6\%$, CEOs (-) $77.7 \pm 1.8\%$, CDOs (+) $71.9 \pm 5.7\%$, CEOs (+) $78.5 \pm 2.8\%$ となり、実験3と同様に、ピルビン酸無添加の裸化卵子で成熟率は有意に低くなった。また、精子侵入率 (CDOs (-) ; $63.3 \pm 6.8\%$, CEOs (-) ; $79.5 \pm 4.8\%$, CDOs (+) ; $68.9 \pm 7.9\%$, CEOs (+) ; $79.6 \pm 4.4\%$) にはピルビン酸添加あるいは卵丘細胞の有無による差は認められなかったが、正常受精率はピルビン酸無添加の裸化卵子区 (CDOs (-) ; $16.0 \pm 4.5\%$) が他の処置区 (CEOs (-) ; $53.3 \pm 2.7\%$, CDOs (+) ; $42.6 \pm 6.1\%$, CEOs (+) ; $58.1 \pm 4.3\%$) に比べて有意に低かった。卵割率 (CDOs (-) ; $77.0 \pm 4.9\%$, CEOs (-) ; $72.9 \pm 8.7\%$, CDOs (+) ; $70.4 \pm 2.5\%$, CEOs (+) ; $74.4 \pm 2.7\%$) には処理区による差は認められなかったが、4細胞期以上への発生率 (CDOs (-) ; $39.2 \pm 5.4\%$, CEOs (-) ; $64.9 \pm 8.5\%$, CDOs (+) ; $38.4 \pm 2.4\%$, CEOs (+) ; $66.6 \pm 2.7\%$) や胚盤胞への発生率 (CDOs (-) ; $1.6 \pm 1.0\%$, CEOs (-) ; $25.7 \pm 3.7\%$, CDOs (+) ; $4.2 \pm 2.4\%$, CEOs (+) ; $30.2 \pm 2.7\%$) は、裸化卵子区が卵丘細胞卵子複合体区に比べて有意に低かった。また、ピルビン酸無添加の裸化卵子区では脱出胚盤胞期へ発生する胚は認められなかった。

成熟培養前後の卵子1個あたりのグルタチオン含量を図15に示した。成熟培養後の裸化卵子のグルタチオン含有量 (CDOs (-) ; 1.99 ± 0.29 pmol, CDOs (+) ; 2.20 ± 0.42 pmol) は成熟培養前のGV期の卵子 (6.86 ± 0.19 pmol) あるいは成熟培養後の卵丘細胞卵子複合体区の卵子 (CEOs (-) ; 6.05 ± 0.69 pmol, CEOs (+) ; 5.49 ± 0.42 pmol) に比べて低かった。

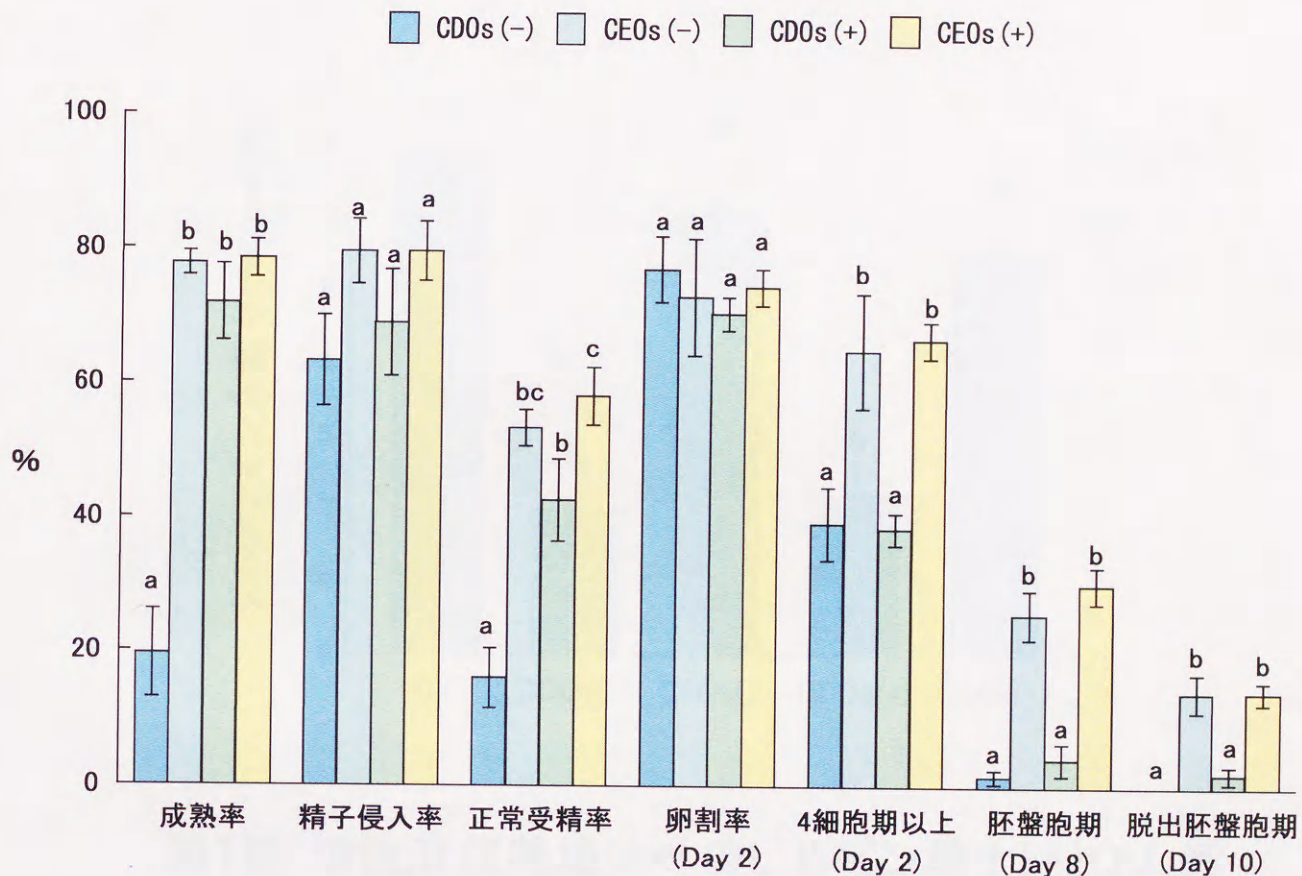


図14. 無血清成熟培地へのピルビン酸ナトリウムの添加あるいは卵丘細胞の有無がウシ未成熟卵子の成熟率・受精率及びその後の胚盤胞への発生率に及ぼす影響

CDOs(-): 裸化卵子;ピルビン酸ナトリウム無添加
 CEOs(-): 卵丘細胞卵子複合体;ピルビン酸ナトリウム無添加
 CDOs(+): 裸化卵子;0.2mMピルビン酸ナトリウム添加
 CEOs(+): 卵丘細胞卵子複合体;0.2mMピルビン酸ナトリウム添加
 a-c: 同一ステージ異符号間に有意差あり(P<0.05; ANOVA & Fisher's PLSD test)

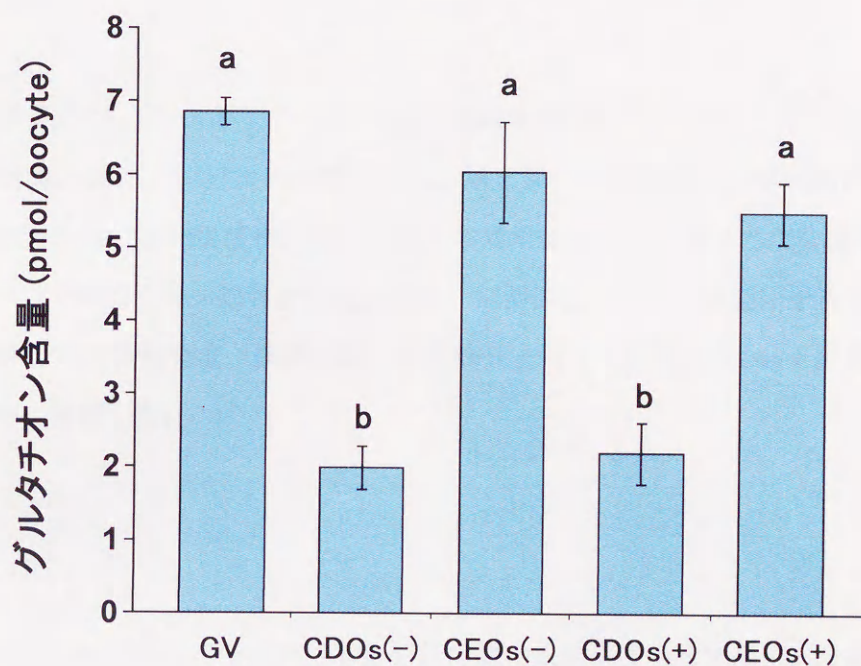


図15. 無血清成熟培地へのピルビン酸ナトリウム添加あるいは卵丘細胞の有無が卵子のグルタチオン含量に及ぼす影響

GV: 成熟培養前の卵子
 CDOs(-): 裸化卵子; ピルビン酸ナトリウム無添加
 CEOs(-): 卵丘細胞卵子複合体; ピルビン酸ナトリウム無添加
 CDOs(+): 裸化卵子; 0.2mMピルビン酸ナトリウム添加
 CEOs(+): 卵丘細胞卵子複合体; 0.2mMピルビン酸ナトリウム添加
 a-b: 異符号間に有意差あり(P<0.05, ANOVA & Fisher's PLSD test)

第四節 裸化未成熟卵子由来胚盤胞の移植試験

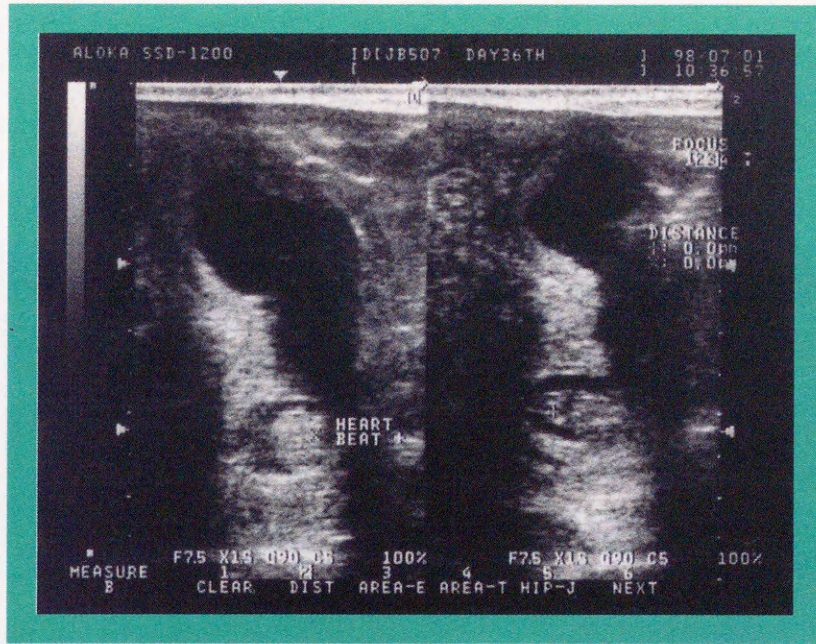
本節においては、裸化未成熟卵子由来胚盤胞の正常性を検討するために、移植による子牛への発生能を検討した。

1. 材料と方法

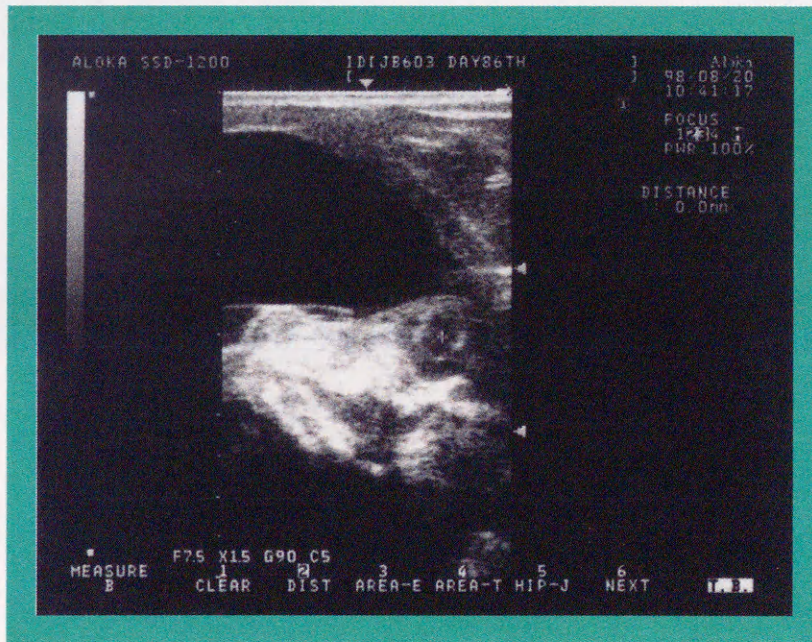
黄体期の受胎牛にプロスタグランジンF2 α 類縁物質（エストラメイト；武田薬品工業）2 mlを筋肉内投与し、発情を同期化した。第三節の方法に準じて裸化未成熟卵子をピルビン酸添加培地で成熟培養後、体外受精・体外培養を行って得られた2個のDay 7胚盤胞を1個ずつ2頭の受胎牛に移植した。また、対照区として卵丘細胞卵子複合体をピルビン酸添加培地で成熟培養後、体外受精・体外培養を行って得られたDay 7胚盤胞1個を1頭の受胎牛に移植した。

2. 結果

移植による子牛への発生能を検討するために、裸化未成熟卵子をピルビン酸添加培地で成熟培養後、体外受精・体外培養を行って得られた2個のDay 7胚盤胞を1個ずつ2頭の受胎牛に移植した結果、2頭とも受胎した。図16は妊娠36日目及び妊娠86日目の超音波診断による胎仔を示した。受胎牛は妊娠を継続し、2頭の正常な雄子牛（妊娠期間及び生時体重：286日，36kg及び293日，50kg）が生まれた。これは、裸化未成熟卵子を無血清培地を用いて体外成熟・受精・培養して得られた胚盤胞の移植による世界初の産子である（図17）。その後、子牛は順調に発育し、120日齢体重はそれぞれ111.9kg及び119.6kgであった。卵丘細胞卵子複合体（ピルビン酸ナトリウム添加区）由来の胚盤胞を移植した対照区の1頭は受胎しなかった。



妊娠36日目の胎仔 ×:心拍動



妊娠86日目の胎仔 +:眼球

図16 超音波診断装置による妊娠診断



図17 裸化未成熟卵子由来の子牛
(1999年3月7日生)

第5節 考察

マウス裸化卵子の体外成熟培養においてピルビン酸は裸化卵子の成熟を促すが、グルコースは卵丘細胞との共培養においてのみ成熟を促す [Biggersら, 1967]。また、マウス卵丘細胞はグルコースや乳酸からピルビン酸を作り出し [Leese & Barton, 1985]、ブタ卵丘細胞卵子複合体もピルビン酸を作り出す [Engら, 1986]。さらに、ウシ裸化卵子のピルビン酸の代謝は体外成熟中に増加するが、グルコースの代謝は成熟培養を通して低い [Rieger & Loskutoff, 1994]。今回成熟培地の基本培地として用いたmTCM199はグルコースを、mCR1aaはピルビン酸及び乳酸を、mTLはグルコース、ピルビン酸及び乳酸を含んでいる。今回、裸化卵子の体外成熟において、ピルビン酸を含まないmTCM199では約半数の卵子が第1成熟分裂後期から第2成熟分裂前期の時期で成熟を停止したが、ピルビン酸ナトリウムを含むmTL、mCR1aa及びピルビン酸を添加したmTCM199においては、第2成熟分裂中期への成熟が認められた。これらのことから、卵丘細胞を取り去ったウシ未成熟卵子の体外成熟のためには、エネルギー源としてピルビン酸が必要であり、ウシにおいても卵丘細胞の役割のひとつとして卵子へのピルビン酸の供給が示唆された。しかしながら、mCR1aaを用いた場合に裸化卵子では成熟するものの、卵丘細胞卵子複合体では卵核胞期から第1成熟分裂中期の時期で成熟が停止した理由については不明であり、さらなる検討が必要である。

体外成熟・体外受精時の卵丘細胞の存在は、胚発生に有益に機能することが知られている。今回の結果あるいはこれまでの報告 [Staigmiller & Moor, 1984; Sirardら, 1988] にあるように、裸化卵子は成熟可能であるが、その正常受精率や胚盤胞への発生率はきわめて低い。マウスにおいては、卵丘細胞卵子複合体で成熟させた場合の受精率は、裸化卵子の場合に比べて有意に高いことが報告されている [Schroeder & Eppig, 1984]。一方、今回の結果において、成熟培養時の卵丘細胞の有無による精子進入率の差は認められなかったものの、ピルビン酸無添加の裸化卵子区の正常受精率は卵丘細胞卵子複合体あるいはピルビン酸添加の裸化卵子の正常受精率に比べて有意に低かった。この原因としては、ピルビン酸無添加の裸化卵子の培養24時間における成熟率が低く、約半数の卵子が第1成熟分裂前期から第二成熟分裂前期で停止していたことが原因とも考えられる。また、ピルビン酸添加培地で成熟培養した裸化卵子は卵丘細胞卵子複合体と同様な正常受精率を示すものの、4細胞期や胚盤胞への発生率は有意に低かった。しかし、ピルビン酸添加裸化卵子由来胚

の一部はハッチング可能であり，移植により産子へ発育可能であることが明らかとなった。

以上のことから，成熟培養中にピルビン酸以外に卵丘細胞由来の何かが未成熟卵子の成熟・受精後の発生に必要である可能性が推察される。

マウス [Calvinら, 1986]，ハムスター [Perreaultら, 1988]，ブタ [Yoshidaら, 1993] 及びウシ [Miyamuraら, 1995; de Matosら, 1996; de Matosら, 1995]において卵子の成熟中にグルタチオンが合成されることが知られている。また，受精後の精子の脱凝縮や雄性前核形成にグルタチオンが関与することも報告されている [Calvinら, 1986; Perreaultら, 1988; Perreaultら, 1984; Yoshidaら, 1992; Yoshidaら, 1993]。さらに，グルタチオンは細胞の還元状態を保ち，酸素傷害から細胞を保護する [Limら, 1996; Meister, 1983]。しかしながら，抗酸化能力は限られており，その貯蔵量は急速に減少する [Del Corsoら, 1994]。一方，低分子チオール化合物は細胞内のグルタチオン濃度を高めてウシ4から8細胞期の胚を胚盤胞までの発育を促進すること [Takahashiら, 1993]，また，卵丘細胞等の共培養細胞はシスチンを卵子が利用可能なシステインに変換し，グルタチオンの合成を助けること [Takahashiら, 1995] が報告されている。今回，成熟培養前後の卵子のグルタチオン量を測定したところ，卵丘細胞卵子複合体由来卵子のグルタチオン量は裸化卵子に比べて有意に高かった。以上のことから，成熟培養中の卵丘細胞の役割の一つは，シスチンをシステインに変換し，卵子のシステインの取り込みを高め，グルタチオン濃度をあるレベルまで高めてその後の胚の正常受精率や胚盤胞期への発生率を増加させることであると考えられる。

今回，我々はピルビン酸無添加の無血清培地を用いて成熟培養した裸化卵子由来の胚盤胞の移植により，正常な産子を得た。卵丘細胞が付着した卵子に比べて移植可能な胚盤胞の時期まで発生する胚の割合は低くなるものの，卵丘細胞を取り去った未成熟卵子もピルビン酸添加無血清培地を用いて成熟培養後に体外受精・培養することにより移植可能な胚盤胞の時期まで発育可能であり，これらの胚盤胞も移植により子牛まで発育することが明らかとなった。

以上の結果より，卵丘細胞卵子複合体の成熟培地としては，mTCM199あるいはmTALPが，裸化卵子の体外成熟培地としてはピルビン酸添加mTCM199，mTALPあるいはmCR1aa等のピルビン酸添加培地が利用できる可能性が示された。また，裸化卵子の核の成熟にはピルビン酸が不可欠であるが，ピルビン酸添加培地で裸化卵子を成熟培養した場合においても，4細胞期や胚盤胞期への発生率は低いことから，成熟培養時においてピル

ビン酸以外の何らかの卵丘細胞が関与する因子がその後の胚盤胞への発生に影響を与えていることが推察された。ただし、ピルビン酸添加無血清培地で成熟培養させた裸化卵子も体外受精・体外培養後に胚盤胞，さらには子牛にまで発育可能である。一方，成熟培養時の卵丘細胞は卵丘細胞卵子複合体のグルタチオン合成を促進し，胚盤胞への発生に重要な役割を果たすことが明らかとなった。さらに，裸化卵子における発生率の低下の原因のひとつとして成熟後のグルタチオン含量の低さが考えられることから，今後は成熟培地へのシステアミン等の添加によって裸化卵子の成熟培養後のグルタチオン含量を高めることにより体外受精・体外培養後の胚の発生率の向上が図れるかどうか等を検討する必要がある。

第六節 摘要

ウシ卵巢より卵丘細胞が緊密に付着した卵子(CEOs)を採取し，約半数は卵丘細胞を除去した(CDOs)。0.02 AU/ml FSH, 3 mg/ml ポリビニルピロリドン添加培地を用い，CEOsあるいはCDOsを24時間成熟培養した。①HEPES緩衝TCM199 (mTCM199) , mCR1aa (BSAを除いたCR1aa) あるいはmTL (BSAを除いたTALP) を用いて基本培地の違いが成熟率に及ぼす影響を検討した結果，CEOsの場合にはmCR1aaで，CDOsの場合にはmTCM199で有意に成熟率が低かった。②mCR1aaの場合，5.56mMグルコース添加の有無にかかわらずCEOsの成熟率はCDOsに比べて低かった。③mTCM199への0.2mMピルビン酸ナトリウム添加によりCDOsの成熟率はCEOsと同等となった。④③の方法を用いて体外成熟後に体外受精・培養を行った結果，正常受精率はピルビン酸無添加のCDOsが他の処置区に比べて有意に低かった。また，4細胞期や胚盤胞期への発生率はCDOsがCEOsに比べて有意に低かった。さらに，成熟培養後のCDOsのグルタチオン含量は成熟培養前のGV期あるいは成熟培養後のCEOsに比べて低かった。⑤ピルビン酸添加mTCM199で成熟培養したCDOs由来の胚盤胞を受卵牛に移植した結果，正常な雄子牛が生まれた。以上の結果から，裸化卵子の体外成熟にはピルビン酸の存在が必要であること，成熟時の卵丘細胞の存在は体外成熟後の胚発生に影響することが明らかとなった。

第七章 ウシ体外受精由来胚盤胞の短期保存におけるβ-メルカプトエタノールの添加効果に関する検討

第一節 緒言

受精卵移植による子牛生産を効率的に行うためには、胚の安定供給が重要である。牛胚の長期保存法としては凍結保存法があるが、高額な機械を必要とすること、また凍結胚の受胎率は一般に新鮮胚に比べて低いという問題点がある〔Schneiderら, 1980〕。ところが、宅急便等の物流システムの発達した今日では、短期間のうちに胚を全国に輸送できる。新鮮胚の保存が短期間でも可能となれば胚の利用期間を長くすることができ、遠隔地への胚の輸送が可能となるとともに、低温条件下での胚の発育調節（抑制）によって、胚の発育ステージと受卵牛の性周期を一致させて移植することが可能となり、受精卵移植の実用化をより一層推進することができる。一方、最近、牛の体外受精由来6～8細胞期胚はβ-メルカプトエタノールあるいはシステアミン添加培地を用いることにより、共培養細胞が無くとも、高率に胚盤胞へ発生することが報告されている〔Takahashiら, 1993〕。また、β-メルカプトエタノールの添加が37～39℃での短期保存における牛体外受精由来胚の生存性向上に有効であることが報告された〔Takahashiら, 1996〕。そこで、本章においては、媒精後7日目（Day 7）あるいは8日目（Day 8）に胚盤胞へと発育したウシ体外受精由来胚盤胞を用いて5℃あるいは25℃で24時間短期保存を行い、胚盤胞への発育速度、保存温度あるいは保存液へのβ-メルカプトエタノールの添加の有無が保存後の胚の拡張胚盤胞期への発生率を指標とした生存性に及ぼす影響について検討した。

第二節 ウシ体外受精由来胚盤胞の短期保存におけるβ-メルカプトエタノールの添加効果に関する検討

本節においては、牛体外受精由来胚盤胞を用いて5℃あるいは25℃で24時間短期保存を行い、保存温度あるいは保存液へのβ-メルカプトエタノールの添加の有無が保存後の胚の拡張胚盤胞期への発生率を指標とした生存性に及ぼす影響について検討した。

1. 材料と方法

(1) 卵子の体外成熟・受精・培養法

体外成熟・体外受精・体外培養法は、当場の常法にしたがって、2%二酸化炭素・98%空気、38.5℃の炭酸ガス培養器中で行った。すなわち、食肉処理場より採取した卵巣より未成熟卵胞卵子を18Gの注射針をつけた5mlの注射筒を用いて吸引採取し、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 HEPES緩衝TCM199+10%牛胎仔血清+0.02AU/ml卵胞刺激ホルモン）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, 1975] 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）添加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、流動パラフィン（ナカライテスク）で覆った。ついで、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、媒精を行い、6時間後に卵子を発生培地に移し、卵丘細胞との共培養条件下で発生培養を行った。発生培地としては5%過排卵処置牛血清添加25mM HEPES緩衝TCM199 [下司ら, 1993] を用い、培地の交換は48時間毎に行った。媒精日をDay 0としてDay 7あるいはDay 8に胚盤胞期まで発生した胚を保存試験に供した。

(2) 短期保存方法

保存液への β -メルカプトエタノールの添加の有無が保存後の体外受精由来胚盤胞の生存性に及ぼす効果について検討した。すなわち、 β -メルカプトエタノール添加あるいは無添加の20%牛血清加修正TCM199（20mM HEPES, 0.35g/l炭酸水素ナトリウム）を保存液として用いて、0.25mlの移植用ストローにDay 7あるいはDay 8の体外受精由来胚盤胞を封入し、5℃あるいは25℃の恒温器中に24時間遮光保存した。その後、卵丘細胞を単層培養した100 μ M β -メルカプトエタノール、10%牛血清添加25mM HEPES緩衝TCM199のマイクロドロップ中に胚を移し、38.5℃、2%二酸化炭素・98%空気の炭酸ガス培養器中で培養し、保存後の体外培養により拡張胚盤胞期まで発生したものを生存胚とした。また、保存せずに炭酸ガス培養器内で直接培養したものを対照区とした。

(3) 統計処理

有意性の検定は χ^2 -testによって行った。

2. 結果

24時間保存後の胚の生存率（拡張胚盤胞への発生率）を図18に示した。Day 7胚を5℃で24時間保存した場合、100 μ M β -メルカプトエタノールの添加により、低温保存せずに炭酸ガス培養器内で直接培養した対照区と同様の生存率を得た。25℃保存の場合、保存後の生存率は5℃保存に比較して高いものの、保存中に拡張胚盤胞に発生するものが認められた。胚盤胞期への発育の遅かったDay 8胚の場合は、5℃あるいは25℃保存のいずれの場合も保存後の体外受精由来胚盤胞の生存率の低下が認められた。

第三節 短期保存胚盤胞の正常性の検討

媒精後7日に胚盤胞まで発生したDay 7胚を100 μ M β -メルカプトエタノール、20%牛血清添加修正TCM199を保存液として用いてストロー中に胚を封入し、5℃で24時間保存した場合に、低温保存せずに炭酸ガス培養器内で直接培養した対照区と同様の生存率が得られたことから、本節においては、短期保存後の胚の個体への発生能を検討するために、移植試験を実施した。

1. 材料と方法

黄体期の受胎牛にプロスタグランジンF₂ α 類縁物質（エストラメイト；武田薬品工業）2mlを筋肉内投与し、発情を同期化した。短期保存後の胚の個体への発生能を検討するために、媒精後7日に胚盤胞まで発生したDay 7胚を供試し、100 μ M β -メルカプトエタノール、20%牛血清添加修正TCM199を保存液として用いてストロー中に胚を封入し、前節と同様の条件で5℃、24時間保存した。その後、保存後の胚（1または2個）を受卵牛に非外科的に移植した。移植試験は計3回、のべ14頭に実施した。新鮮胚の移植を対照区とした。

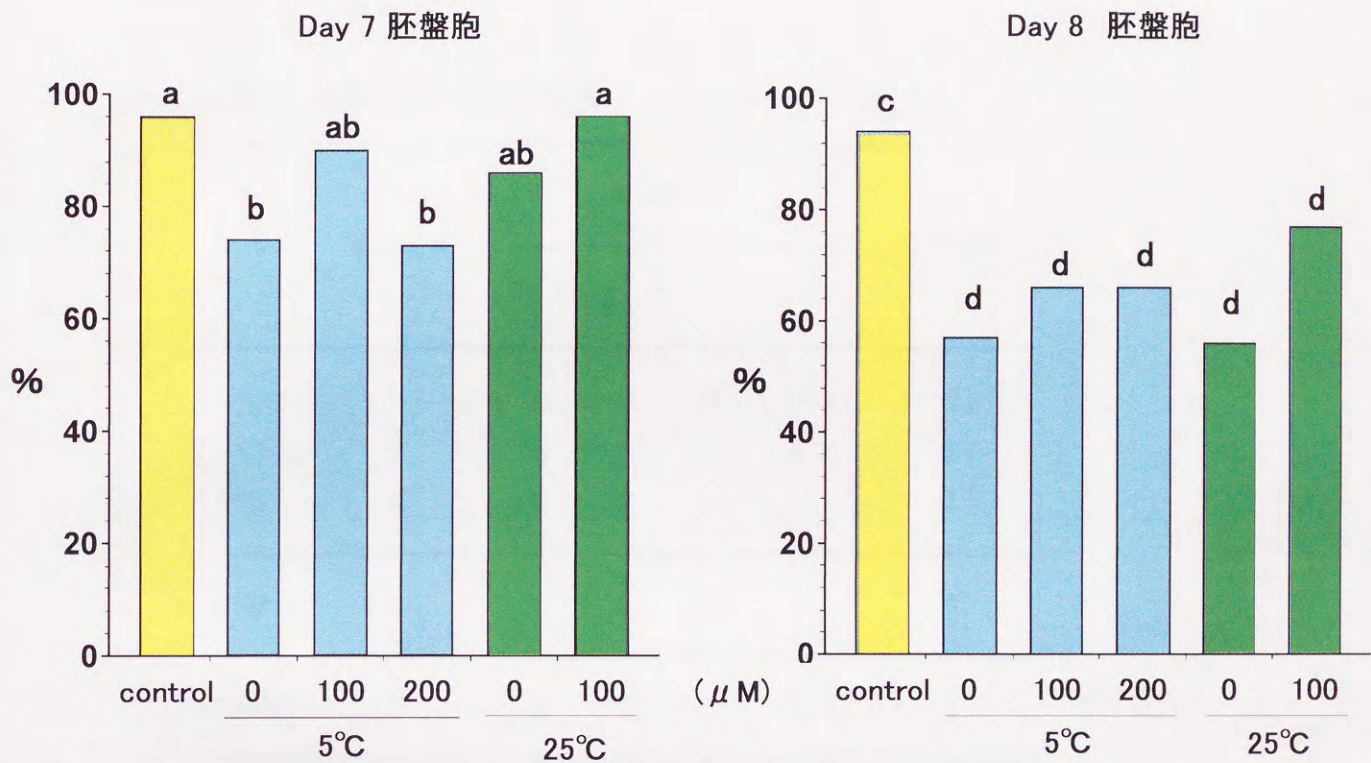


図18. 保存培地へのβ-メルカプトエタノール添加が体外成熟・受精由来胚盤胞の短期保存後の生存性に及ぼす影響

control: 短期保存せずに、培養を行った。

保存培地には0、100あるいは200 μM β-メルカプトエタノール、20%牛血清添加修正TCM199を用いた。

a-b、c-d: 同一ステージ異符号間に有意差あり(P<0.05; χ²-test)。

表1 低温保存胚の移植成績

ロット	受胚頭数	妊娠頭数				分娩頭数
		30*	40*	60*	80*	
1	6	0	0	0	0	0
2	4	3	3	3	3	2
3	4	2	2	1	1	1
計	14	5	5	4	4	3
対照区	5	2	2	1	1	1

*：移植後日数

超音波診断装置により胎仔の確認できたものを受胎とした。

2回目の移植試験の一頭は120日頃に流産した。

対照区は新鮮胚を移植した。

2. 結果

媒精後7日に胚盤胞まで発生したDay 7胚を100 μ M β -メルカプトエタノール, 20%牛血清添加修正TCM199を保存液として用いて5°Cで24時間保存し, 保存後の胚を延べ14頭に移植した時の移植成績を表1に示した。移植後80日に超音波診断装置を用いて妊娠診断した結果, 4頭受胎, 内2頭は双胎妊娠であった。ただし, 受胎例の内1頭は移植後120日頃に流産した。これらの受胎牛のうち, 2頭が単子を, 1頭が双子を正常に分娩した。対照区では, 5頭の移植により1頭が妊娠し, 単子を分娩した。

第四節 考察

牛胚の低温下での短期保存の試みは多くの研究者により行われている。Linderら(1985)は, 発情後7~8日に生体から回収した胚盤胞の4°C保存では, 3日間の保存であれば受胎率が低下しないと報告している。また, 青柳ら(1986)も, 発情後6~7日目に回収したAランク胚の4°C保存において24時間程度の保存であれば, 採卵後すぐに培養したコントロールと体外培養による発生率に差は認められないと報告している。一方, 体外受精由来胚盤胞においては, Yangら(1991)は, 4, 20あるいは39°Cで保存した場合, 4~6時間であれば保存可能であるが, 24時間以上の保存では体外培養による発生率及び受胎率の低下が認められたと報告している。今回の実験においても, 5°C保存において無添加区では生存率の低下が認められたことから, 体外受精由来胚は生体からの回収胚に比べて低温感作に弱い可能性が推察された。このような違いは胚の凍結保存においても問題とされており[Leibo & Loskutoff, 1993], 体外受精由来胚を保存する場合には, 注意が必要と考えられる。また, 青柳らは, 胚の品質が保存後の生存性に大きく影響することを報告している。Sahaら(1995)は, Day 7~9に得られた体外受精由来拡張胚盤胞の凍結保存において, 細胞数には差は認められないものの, 凍結融解後の胚の生存性は, 胚盤胞への発育の遅いものほど著しく低下することを報告している。本実験では, 胚盤胞への発育の遅かったDay 8胚は発育の早かったDay 7胚に比べて, 保存後の生存性が低かったが, このことはSahaら(1995)の結果と一致するものである。また, 25°C保存の場合には保存後の生存性は高いものの, 保存中に一部の胚は発育を継続することから, 発育を抑えて保

存するという意味からは問題が残された。

最近、牛の体外受精由来6～8細胞期胚はβ-メルカプトエタノールあるいはシステアミン添加培地を用いることにより、共培養細胞が無くとも、高率に胚盤胞へ発生することが報告されている [Takahashiら, 1993]。これは、これらチオール化合物が培養液中のシスチンをシステインに還元し、このシステインを胚が取り込んで細胞内グルタチオン濃度が高まり、細胞を酸素傷害から保護し、細胞内環境を望ましいものにしたのではと考察している [Takahashiら, 1993]。今回の実験においては、細胞内グルタチオン濃度は測定していないが、チオール化合物が胚を酸素傷害から保護するとともに胚の低温への耐性を高めた可能性も推察される。また、これら受胎牛が正常に分娩したことから、低温保存後の胚も正常に子牛へ発育しうることが示唆された。以上のことから、100 μM β-メルカプトエタノール添加培地を用いることにより、5℃24時間保存においても、保存中の発育を抑えながら、保存後の体外受精由来胚盤胞の生存性維持に有効であることが示唆された。今後は、さらに長時間保存の可能性についても検討する必要がある。

第五節 摘要

媒精後7日目 (Day 7) 及び8日目 (Day 8) に胚盤胞期へと発生した牛体外受精由来胚を、5℃あるいは25℃で24時間保存し、胚盤胞への発育速度、保存温度及び保存液へのβ-メルカプトエタノール添加の有無が、保存後の胚の生存性 (拡張胚盤胞期への発生率) に及ぼす影響について検討した。その結果、Day 7胚を5℃で24時間保存した場合、100 μM β-メルカプトエタノール (β-ME) の添加により、低温保存せずに培養した対照区と同様の拡張胚盤胞期への発生率が得られた。25℃保存の場合、保存後の生存性は高いものの、保存中に拡張胚盤胞期へと発生するものが認められた。また、Day 8胚はDay 7胚に比べて保存後の生存性が低かった。さらに、100 μM β-メルカプトエタノール添加培地を用いて5℃24時間保存後の胚の移植試験を実施した結果、分娩例を得た。以上のことから、牛体外受精由来胚盤胞の5℃24時間保存において、100 μM β-メルカプトエタノールの添加は保存後の胚の生存性向上に有効であることが示唆された。

第八章 総括

本研究では、ウシ体外受精技術を用いた効率的な胚生産方法の確立を目指すために、まず体外受精胚の培養方法について添加血清の種類、培養液の組成や培養環境が胚盤胞への発生率に及ぼす影響を検討した。次に、胚盤胞期への発育率のさらなる向上を目指して、体外成熟培養方法の検討を加えるとともに、成熟培養時の卵丘細胞の役割についても検討した。さらに、作出胚盤胞の有効活用を目指して短期保存法の検討を行なった。また、裸化未成熟卵子由来の胚盤胞あるいは低温保存胚の正常性を検討するために、移植試験を実施した。

1. 発生培地への添加血清の種類がウシ体外成熟・受精卵子の胚盤胞への発生率に及ぼす影響

5種類の非働化血清（牛胎仔血清、新生子牛血清、子牛血清、雌牛血清及び過排卵処置牛血清）を用い、発生培地への添加血清の種類が、体外成熟・体外受精後の牛卵子の胚盤胞への発生に及ぼす影響について検討した。雌牛血清は性周期の8日目に、過排卵処置牛血清は過排卵処置時の発情後8日目にそれぞれ採取して作製した同一牛の血清を用いた。その結果、卵割率（2細胞期以上への発生胚）は牛胎仔血清又は過排卵処置牛血清を用いた場合に、8細胞期あるいは胚盤胞期への発生率は過排卵処置牛血清を用いた場合に有意に高い値を示した。以上の結果から、体外成熟・受精胚の体外培養の際に発生培地へ添加する血清として、反応性が良好で正常胚の回収された過排卵処置牛由来血清を用いることにより、ウシ体外成熟・受精胚の胚盤胞への発生率を向上させることが明らかとなった。

2. 培養気相中の二酸化炭素濃度および発生培地への β -メルカプトエタノールの添加が共培養条件下でのウシ未成熟卵子の成熟率・受精率あるいはその後の胚盤胞への発生率に及ぼす影響

培養気相中の二酸化炭素濃度は、成熟率・受精率および卵割率には影響しなかった。しかし、2%二酸化炭素下での胚盤胞期への発生率は、5%二酸化炭素下で培養したときよりも有意に高かった。また、5%二酸化炭素下で共培養後の培養液のpH(7.26)は、2%

二酸化炭素下で共培養後の発生培養液のpH (7.45) よりも低かった。次に、体外成熟・体外受精によって作成した4~8細胞期胚を種々の濃度 (0, 5, 10, 50 μ M) の β -メルカプトエタノールを添加した発生培養液を用いて、2%二酸化炭素の培養気相下で卵丘細胞と共培養した結果、10 μ M添加区における胚盤胞への発生率は0あるいは50 μ M添加区に比べて、有意に高かった。以上のことから、卵丘細胞との共培養系を用いる場合には、二酸化炭素濃度を通常の細胞培養で用いる5%二酸化炭素・95%空気ではなく2%二酸化炭素・98%空気を用いて培養を行うことにより、また、媒精2日後に発生した4~8細胞期の胚を β -メルカプトエタノール添加培地で卵丘細胞と共培養することにより、ウシ体外成熟・受精胚の胚盤胞への発生率が向上することが明らかとなった。

3. 発生培地の種類あるいは培養気相中の酸素分圧が胚盤胞への発生率に及ぼす影響

mTCM199あるいはmCR1aa培地を基本培地として用いて発生培養用の基本培地および培養気相中の酸素分圧の違いならびに共培養細胞の有無がウシ体外成熟・受精卵の胚盤胞期への発生に及ぼす影響について調べた。その結果、ウシ体外成熟・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期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、胚発生には血清またはBSA等の添加を必要とした。さらに、非共培養系では、通常培養に用いられている酸素分圧 (20%) よりも低い5%の酸素の培養気相を用いることにより、胚盤胞への発生率が高まった。以上のことから、体外受精後に非共培養系で培養する場合には、通常培養に用いられている酸素分圧 (20%) よりも低い5%の酸素分圧下でCR1aaを用いて培養することにより、胚盤胞への発生率が高まることが明らかとなった。

4. ウシ未成熟卵子の成熟培養方法が成熟率・受精率及びその後の胚発生に及ぼす影響

成熟培地への血清添加の有無は、ウシ未成熟卵子の体外成熟率や体外受精後の発生率に影響を及ぼさなかった。ウシ卵丘細胞卵子複合体を0, 0.5, 5, 50あるいは500 μ Mシステアミン添加PVA-HEPES-TCM199を用いて24時間成熟培養後、体外受精、体外培養した。その結果、成熟培地へのシステアミンの添加は卵子の成熟率や受精率には影響を与えな

った。しかしながら、成熟培地への5 μ Mのシステアミンの添加は、胚盤胞への発生率を高めた。0あるいは0.5 μ Mシステアミン添加区の成熟培養後のグルタチオン含量は培養前のGV期の卵子に比べて低かった。しかしながら、5 μ M添加区のグルタチオン含量は培養前の卵子と同レベル、50あるいは500 μ M添加区では有意に高かった。以上の結果から、無血清成熟培地へのシステアミンの添加は、体外成熟卵子のグルタチオン含量を高めることにより、ウシ体外成熟卵子の胚盤胞への発生率を高めることが明らかとなった。

5. ウシ裸化未成熟卵子の体外成熟培養法に関する検討

HEPES緩衝TCM199 (mTCM199) , mCR1aa (BSAを除いたCR1aa) あるいはmTL (BSAを除いたTALP) を用いて基本培地の違いが成熟率に及ぼす影響を検討した結果、卵丘細胞卵子複合体の場合にはmCR1aaで、裸化卵子の場合にはmTCM199で有意に成熟率が低かった。mCR1aaの場合、5.56mMグルコース添加の有無にかかわらず卵丘細胞卵子複合体の成熟率は裸化卵子に比べて低かった。mTCM199への0.2mMピルビン酸ナトリウム添加により裸化卵子の成熟率は卵丘細胞卵子複合体と同等となったが、正常受精率はピルビン酸無添加の裸化卵子が他の処置区に比べて有意に低かった。また、4細胞期や胚盤胞期への発生率は裸化卵子が卵丘細胞卵子複合体に比べて有意に低かった。さらに、成熟培養後の裸化卵子のグルタチオン含量は成熟培養前のGV期あるいは成熟培養後の卵丘細胞卵子複合体由来卵子に比べて低かった。ピルビン酸添加mTCM199で成熟培養した裸化卵子由来の胚盤胞を受卵牛に移植した結果、世界初の正常な雄子牛が生まれた。以上の結果から、裸化卵子の体外成熟にはピルビン酸の存在が必要であること、成熟培養時の卵丘細胞の存在は体外成熟後の胚発生に影響することが明らかとなった。また、ピルビン酸添加無血清培地で成熟培養させた裸化卵子も体外受精・体外培養後に胚盤胞、さらには子牛にまで発育可能であることが明らかとなった。

6. ウシ体外受精由来胚盤胞の短期保存における β -メルカプトエタノールの添加効果に関する検討

媒精後7日目 (Day 7) 及び8日目 (Day 8) に胚盤胞期へと発生した牛体外受精由来胚盤胞を用いて5 $^{\circ}$ Cあるいは25 $^{\circ}$ Cで24時間短期保存を行い、胚盤胞への発育速度、保存温

度あるいは保存液への β -メルカプトエタノールの添加の有無が、保存後の胚の拡張胚盤胞期への発生率を指標とした生存性に及ぼす影響について検討した。その結果、Day 7 胚を 5°C で24時間保存した場合、 $100\ \mu\text{M}$ β -メルカプトエタノールの添加により、低温保存せずに培養した対照区と同様の拡張胚盤胞期への発生率が得られた。 25°C 保存の場合、保存後の生存性は高いものの、保存中に拡張胚盤胞期へと発生するものが認められた。また、胚盤胞への発育の遅かったDay 8 胚は、発育の早かったDay 7 胚に比べて保存後の生存性が低かった。さらに、 $100\ \mu\text{M}$ β -メルカプトエタノール添加培地を用いて 5°C 24時間保存後の胚の移植試験を実施した結果、正常な産子を得た。以上のことから、牛体外受精由来胚盤胞の 5°C 24時間保存において、 $100\ \mu\text{M}$ β -メルカプトエタノールの添加は保存後の胚の生存性向上に有効であることが示唆された。

謝辞

本論文の執筆するにあたり、御指導、御助言をいただいた東北大学大学院・農学研究科 佐藤英明 教授に深く感謝の意を表す。また、本論文を執筆するに当たり、御助言をいただいた東北大学大学院・農学研究科 山岸敏宏 教授ならびに小原嘉昭 教授に深く感謝の意を表す。

本研究の推進及び論文執筆に当たり、御指導いただいた農林水産省・畜産試験場・繁殖部・受胎機構研究室長 永井 卓 博士，農林水産省・技術会議事務局 鈴木 修 博士ならびにアメリカ合衆国アイオワ州立大学 Curtis R. Youngs博士に心から深く感謝の意を表す。また、実験を行う際の手助けをしていただいた，農林水産省・東北農業試験場・畜産部 高橋政義 博士，竹之内直樹 室長，農林水産省・家畜改良センター 米内美晴 博士，農林水産省・北海道農業試験場・畜産部 坂口 実 博士，農林水産省・畜産試験場 山内伸彦 博士ならびに元東北農業試験場・畜産部 臨時職員 山内絵理さんに感謝の意を表す。また，ウシ卵巣の採取に協力いただいた，東北農業試験場・企画連絡室・業務2科，株式会社岩手畜産流通センター及び岩手県紫波食肉衛生検査所の職員の方々に謝意を表す。

引用文献

- Allworth AE, Albertini DF. Meiotic maturation in cultured bovine oocytes is accompanied by remodeling of the cumulus cell cytoskeleton. *Dev Biol*, 1993; 158: 101-121.
- 青柳敬人・岩住安晃・和地秀一・古館誠・藤井勝巳・福井豊・小野斉. 牛の胚ならびに卵胞内卵子の非凍結低温下での短期保存について. *家畜繁殖誌*, 1986; 32: 138-143.
- Biggers JD, Whittingham DG, Donahue RP. The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. *Proceedings of the National Academy of Science*, 1967, 58: 560-567.
- Binor Z, Wolf DP. In vitro maturation and penetration of mouse primary oocytes after removal of zona pellucida. *J Reprod Fertil*, 1979; 56: 309-314.
- Brackett BG, Oliphant G. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol Reprod* 1975; 12: 260-274.
- Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol Reprod*, 1982; 27: 147-158.
- Brinster RL. Studies on the development of mouse embryos in vitro. I. The effect of osmolarity and hydrogen ion concentration. *J Exp Zool*, 1965; 158: 49-58.
- Buccione R, Schroeder AC, Eppig JJ. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol Reprod*, 1990; 43: 543-547.
- Caamano JN, Ryoo ZY, Thoma JA, Youngs CR. β -mercaptoethanol enhances blastocyst formation rate of bovine in vitro-matured / in vitro-fertilized embryos. *Biol Reprod*, 1996; 55: 1179-1184.
- Caamano JN, Ryoo ZY, Youngs CR. Promotion of development of bovine embryos produced in vitro by addition of cysteine and β -mercaptoethanol to a chemically defined culture system. *J Dairy Sci*, 1998; 81: 369-374.
- Calvin HI, Grosshans K, Blake EJ. Estimation and manipulation of glutathione levels in prepuberal mouse ovaries and ova: relevance to sperm nucleus transformation in the fertilized egg. *Gamete Res*, 1986; 14: 265-275.
- Chian RC, Niwa K, Sirard MA. Effect of cumulus cells on male pronuclear formation and subsequent early development of bovine oocytes in vitro. *Theriogenology*, 1994; 41:1499-1508.
- de Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Baldassarre H. Effect of cysteamine on glutathione level and development of bovine oocyte matured in vitro. *Mol Reprod Dev*, 1995; 42: 432-436.
- de Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Martinez AG, Matkovic M. Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Mol Reprod Dev*, 1996; 45: 451-457.
- Del Corso A, Cappiello M, Mura U. Thiol dependent oxidation of enzymes: The last chance against oxidative stress. *Int J Biochem*, 1994; 26: 745-750.

- Eng LA, Kornegay ET, Huntington J, Wellman T. Effects of incubation temperature and bicarbonate on maturation of pig oocytes in vitro. *J Reprod Fert*, 1986; 76: 657-662.
- Eppig JJ. The relationship between cumulus cell-oocyte coupling, oocyte meiotic maturation and cumulus expansion. *Dev Biol*, 1982; 89: 268-272.
- Eyestone WH., Vignieri J, First NL, Co-culture of early bovine embryos with oviductal epithelium. *Theriogenology*, 1987; 27: 228(abstract).
- Eyestone WH, First NL. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J Reprod Fert*, 1989; 85: 715-720.
- Fukuda Y, Ichikawa M, Naito K, Toyoda Y. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells in vitro up to the blastocyst stage. *Biol Reprod*, 1990; 42: 114-119.
- Fukui Y, McGowan LT, James RW, Pugh PA, Tervit HR., Factors affecting the in-vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *J Reprod Fert*, 1991; 92: 125-131.
- Funahashi H, Cantley TC, Stumpf TT, Terlouw, SL, Day BN. In vitro development of in vitro-matured porcine oocytes following chemical activation or in vitro fertilization. *Biol Reprod*, 1994; 50: 1072-1077.
- Ganz MB, Boyarsky G, Sterzel RB, Boron WF. Arginine vasopressin enhances pHi regulation in the presence of HCO₃ by stimulating three acid-base transport systems. *Nature*, 1989; 337: 648-651.
- Gardner DK, Leese HJ. Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism in vitro. *J Reprod Fert*, 1990; 88: 361-368.
- 下司雅也・米内美晴・花田博文・小宮山鐵朗・高橋政義. 発生培地への添加血清の種類が牛体外成熟・体外受精卵の胚盤胞への発生に及ぼす影響. *日畜会報*, 1993; 64: 480-483.
- Geshi M, Yonai M, Sakaguchi M, Nagai T. Improvement of in vitro co-culture systems for bovine embryos using a low concentration of carbon dioxide and medium supplemented with β -mercaptoethanol. *Theriogenology*, 1999; 51: 551-558.
- Gilula NB, Epstein ML, Beers WH. Cell to cell communication and ovulation: A study of the cumulus-oocytes complex. *J Cell Biol*, 1978; 78: 58-75.
- Goto K, Kajihara Y, Kosaka S, Koba M, Nakanishi Y, Ogawa K. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from in-vitro fertilization of in-vitro matured follicular oocytes. *J Reprod Fert*, 1988; 83: 753-758.
- Goto K, Kajihara Y, Kosaka S, Koba M, Nakanishi Y, Ogawa K, Oku T, Fujiyama M, Yoshida Y. Normalities of calves obtained from the transfer of blastocysts produced by totally in vitro technique. *Asian-Aust J Anim Sci*, 1989; 2: 591-593.
- Gruppen CG, Nagashima H, Nottle MB. Cysteamine enhances in vitro development of porcine oocytes matured and fertilized in vitro. *Biol Reprod*, 1995; 53: 173-178.

- Hamano S, Kuwayama M, Takahashi M, Okamura N, Okano A, Nagai T. Effect of β -mercaptoethanol on the preimplantation development of bovine embryos fertilized in vitro. *J Reprod Develop*, 1994; 40: 355-359.
- 花田 章・塩谷康生・鈴木達行. 体外成熟卵子の体外受精により得られた牛胚の非外科的移植による受胎出産例. 第78回日本畜産学会講要, 1986; 18 (講演要旨 I-36) .
- Hasler JF, Henderson WB, Hurtgens PJ, Jin ZQ, McCauley AD, Mower SA, Neely B, Shuey LS, Stokers JE, Trimmer SA. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, 1995; 43: 141-152.
- Heyman Y, Menzo Y, Chesne P, Camus S, Garniar V. In vitro cleavage of bovine and ovine early embryos; improved development using co-culture with trophoblastic vesicles. *Theriogenology*, 1987; 27: 59-68.
- Hyttel P, Xu KP, Smith S, Callesen H, Greve T. Ultrastructure of final nuclear maturation of bovine oocyte in vitro. *Anatomy and Embryology*, 1987; 176:35-40.
- Ishii T, Hishinuma I, Bannai S, Sugita Y. Mechanism of growth promotion of mouse lymphoma L1210 cells in vitro by feeder layer or 2-mercaptoethanol. *J Cellular Physiology*, 1981; 107: 283-293.
- Ito K, Takahashi M, Kawahata K, Goto T, Takahashi J, Yasuda Y. Supplementation effect of early pregnancy factor-positive serum into Bovine in vitro fertilization culture medium. *Am J Reprod Immunol*, 1998; 39: 356-361.
- 梶原 豊・後藤和文・小坂昭三・中西喜彦・小川清彦. 牛卵胞卵子の体外受精および体外培養によるふ化. *家畜繁殖誌*, 1987; 33: 173-180.
- Kane MT. The effects of pH on culture of one-cell rabbit ova to blastocysts in bicarbonate-buffered medium. *J Reprod Fertil*, 1974; 38: 477-480.
- 小西正人・青柳敬人. 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*, 1994; 40: j1-j4.
- Kruip ThAM, DenDaas JHG. In vitro produced and cloned embryos: Effects on pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology*, 1997; 47: 43-52.
- Leese HJ, Barton AM. Production of pyruvate by isolated mouse cumulus cells. *J Exp Zool*, 1985; 234: 231-236.
- Leibfried ML, Bavister BD. Effects of epinephrine and hypotaurine on in-vitro fertilization in the golden hamster. *J Reprod Fertil*, 1982; 66: 87-93.
- Leibo SP, Loskutoff NM. Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology*, 1993; 39: 81-94.
- Li J, Foote RH. Culture of rabbit zygotes into blastocysts in protein-free medium with one to twenty percent oxygen. *J Reprod Fertil*, 1993. 98:163-167.

- Lim JM, Liou SS, Hansel W. Intracytoplasmic glutathione concentration and the role of β -mercaptoethanol in preimplantation development of bovine embryos. *Theriogenology*, 1996; 46: 429-439.
- Linder GM, Ellis DE. Refrigeration of Bovine Embryos. *Theriogenology*, 1985; 23: 202.
- Lu KH, Gordon I, Chen HB, Gallagher M, McGovern H. Births of twins after transfer of cattle embryos produced by in vitro techniques. *Vet Res*, 1988; 122: 539-540.
- Magnusson C. Role of cumulus cells for rat oocyte maturation and metabolism. *Gamete Res*, 1980; 3: 133-140.
- Mass DHA, Storey BT, Mastroianni LJ. Oxygen tension within the oviduct of the rhesus monkey. *Fertil Steril*, 1976. 27: 1312-1317.
- Mastroianni LJ, Jones R. Oxygen tension within the rabbit fallopian tube. *J Reprod Fertil*, 1965; 9: 99-102.
- McKiernan SH, Bavister BD. Environmental variables influencing in vitro development of hamster 2-cell embryos to the blastocyst stage. *Biol Reprod*, 1990; 43: 404-413.
- Meister A. Selective modification of glutathione metabolism. *Science*, 1983; 220: 472-477.
- Miyanuma M, Yoshida M, Hamano S, Kuwiyama M. Glutathione concentration during maturation and fertilization in bovine oocytes. *Theriogenology*, 1995; 43: 282(abstract).
- Moor RM, Smith MW, Dawson RMC. Measurement of intercellular coupling between oocytes and cumulus cells using intracellular markers. *Exp Cell Res*, 1980; 126: 15-29.
- Nagai T, Ding J, Moor RM. Effect of follicle cells and steroidogenesis on maturation and fertilization in vitro of pig oocytes. *J Exp Zool*, 1993; 266: 146-151.
- Nagao Y, Saeki K, Hoshi M, Kainuma H. Effects of oxygen concentration and oviductal epithelial tissue on the development of in vitro matured and fertilized bovine oocytes cultured in protein-free medium. *Theriogenology*, 1994; 41: 681-687.
- Nakao H, Nakatsuji N. Effects of co-culture, medium components and gas phase on in vitro culture of in vitro matured and in vitro fertilized bovine embryos. *Theriogenology*, 1990; 33: 591-600.
- Nancarrow CD, Wallace ALC, Grewal AS. The early pregnancy factor of sheep and cattle. *J Reprod Fert (Suppl.)*, 1981; 30: 191-199.
- Noda Y, Shiotane M, Goto Y, Nakayama T, Umaoka Y, Mori T. Culture of human embryos in alpha modification of Eagle's medium under low oxygen tension and low illumination. *Fert Steril*, 1994; 62: 1022-1027.
- Oshima R. Stimulation of the clonal growth and differentiation of feeder layer dependent mouse embryonal carcinoma cells by beta-mercaptoethanol. *Differentiation*, 1978; 11: 149-155.
- Parrish JJ, Krogenaes A, Susko-Parrish JL. Effect of bovine sperm separation by swimup or percoll on success of in vitro fertilization and embryo development. *Theriogenology*, 1995; 44: 859-870.
- Perreault SD, Barbee RR, Slott VI. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of

- sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Dev Biol*, 1988; 125: 181-186.
- Perreault SD, Wolff RA, Zirkin BR. The role of disulfide bond reduction during mammalian sperm nuclear decondensation in vivo. *Dev Biol*, 1984; 101: 160-167.
- Pinyopummintr T, Bavister BD. Optimum gas atmosphere for in vitro maturation and in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, 1995; 44: 471-477.
- Quinn P, Harlow GM. The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos in vitro. *J Exp Zool*, 1978; 206: 73-80.
- Reichenbach HD, Liebrich J, Berg V, Brem G. Pregnancy rates and births after unilateral transfer of bovine embryos produced in vitro. *J Reprod Fertil*, 1992; 95: 363-370.
- Rieger D, Loskutoff NM. Changes in the metabolism of glucose, pyruvate, glutamine and glycine during maturation of cattle oocytes in vitro. *J Reprod Fertil*, 1994; 100: 257-262.
- Rosenkrans Jr CF, First NL. Culture of bovine zygotes to the blastocyst stage: Effects of amino acids and vitamins. *Theriogenology*, 1991; 35: 266(abstract).
- Rosenkrans Jr CF, Zeng GQ, McNamara GT, Schoff PK, First NL. Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. *Biol Reprod*, 1993; 49: 459-462.
- Saha S, Rajamahendran R, Boediono A, Cece S, Suzuki T. Viability of bovine blastocysts obtained after 7, 8 or 9 days of culture following vitrification and one-step rehydration. *Theriogenology*, 1995; 43: 311(abstract).
- Schneider HJ jr, Castleberry RS, Grillin JL. Commercial aspects of bovine embryo transfer. *Theriogenology*, 1980; 13: 73-85.
- Schroeder AC, Eppig JJ. The developmental capacity of mouse oocytes that matured spontaneously in vitro is normal. *Dev Biol*, 1984; 102: 493-497.
- 塩谷康生・桑山正成・上田修二・斉藤秀一・大田 均・花田 修. 屠場で吸引採取した牛未成熟卵胞卵子の体外受精後の発生能. *家畜繁殖誌*, 1988; 34: 39-44.
- Sinclair KD, McEvoy TG, Maxfield EK, Maltin CA, Young LE, Wilmut I, Broadbent PJ, Robinson JJ. Aberrant fetal growth and development after in vitro culture of sheep zygotes. *J Reprod Fertil*, 1999; 116: 177-186.
- Sirard MA, Parrish JJ, Ware CB, Leibfried-Rutledge ML, First NL. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biol Reprod*, 1988; 36:546-552.
- Staimmiller RB, Moor RM. Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. *Gamete Res*, 1984; 9: 221-229.
- 鈴木達行・高橋芳幸・下平乙夫・桶谷良至・斎藤則夫. ウシ受精卵の非外科的移植と過排卵処置牛の7～8日目に採取した血清を含む培地内での培養試験. *家畜繁殖誌*, 1982; 28: 119-122.
- Takahashi H, Kuwayama M, Hamano S, Takahashi M, Okano A, Kadokawa H, Kariya T, Nagai T.

- Effect of β -mercaptoethanol on the viability of IVM/IVF/IVC bovine embryos during long-distance transportation in plastic straws. *Theriogenology*, 1996; 46: 1009-1015.
- Takahashi M, Nagai T, Hamano S, Kuwayama M, Okamura N, Okano A. Effect of thiol compounds on in vitro development and intracellular glutathione content of bovine embryos. *Biol Reprod*, 1993; 49: 228-232.
- Takahashi M, Nagai T, Okamura N, Okano A. Effect of co-culture cells on the uptake of cystine into bovine embryos. *Theriogenology*, 1995; 43: 332(abstract).
- Takahashi Y, First NL. In vitro development of bovine one-cell embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology*, 1992; 37: 963-978.
- Thompson JGE, Simpson AC, Pugh PA, Donnelly PE, Tervit HR. Effect of oxygen concentration on in vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos. *J Reprod Fertil*, 1990; 89: 573-578.
- Thompson JT, Gardner DK, Pugh PA, MacMillan WH, Tervit HR. Lamb birth weight is affected by culture system utilized during in vitro pre-elongation development of ovine embryos. *Biol Reprod*, 1995; 53: 1385-1391.
- Vanderhyden BC, Armstrong DT. Role of cumulus cells and serum on the in vitro maturation, fertilization, and subsequent development of rat oocytes. *Biol Reprod*, 1989; 40:720-728.
- Vansteenbrugge A, Van Langendonck A, Scutenaire C, Massip A, Dessy F. In vitro development of bovine embryos in buffalo rat liver- or bovine oviduct-conditioned medium. *Theriogenology*, 1994; 42: 931-940.
- Van Wagendonck-De Leeuw AM, Aerts BJB, DenDaas JHG. Abnormal offspring following in vitro production of bovine preimplantation embryos: A field study. *Theriogenology*, 1998; 49: 883-894.
- Walker SK, Hartwich KM, Seamark RF. The production of unusually large offspring following embryo manipulation: Concepts and challenges. *Theriogenology*, 1996; 45: 111-120.
- Wang WL, Jiang HS, Lu KH, Gordon I, Polge C. The effect of gas phase on the in vitro development of bovine embryos derived from in vitro maturation and fertilization of ovarian oocytes. *Theriogenology*, 1992; 37: 320(abstract).
- Watson AJ, Watson PH, Warnes SK, Armstrong DT, Seamark RF. Preimplantation development of in vitro-matured ovine zygotes: comparison between co-culture on oviduct epithelial cell monolayers and culture under low oxygen atmosphere. *Biol Reprod*, 1994; 50: 715-724.
- Yamauchi N, Nagai T. Male pronuclear formation in denuded porcine oocytes after in vitro maturation in the presence of cysteamine. *Biol Reprod*, 1999; 61: 828-833.
- Yang BK, Yang X, Foote RH. Early development of IVM/IVF bovine embryos cultured with or without somatic cells in a simple serum-free medium with different concentration of CO₂ and O₂. *J Reprod Dev*, 1994; 40: 197-205.

- Yang NS, Duff R, Lu KH, Gordon I, Polge C. Effect of storage temperature and time on the viability of bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology*, 1991; 35: 297.
- Yoshida M. Role of glutathione in the maturation and fertilization of pig oocyte in vitro. *Mol Reprod Dev*, 1993; 35: 76-81.
- Yoshida M, Ishigaki K, Pursel VG. Effect of maturation media on male pronuclear formation in pig oocytes matured in vitro. *Mol Reprod Dev*, 1992; 31: 68-71.
- Yoshida M, Ishigaki K, Nagai T, Chikyu M, Pursel VG. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Biol Reprod*, 1993; 49: 89-94.
- Young L, Sinclair KD, Wilmut I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev Reprod*, 1998; 3:155-163.
- Younis AI, Brackett BG, Fayer-Hosken RA. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Gamete Res*, 1989; 23: 189-201.
- Zhang LI, Jiang S, Wozniak PJ, Yang X, Godke RA. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro. *Mol Reprod Dev*, 1995; 40: 338-344.

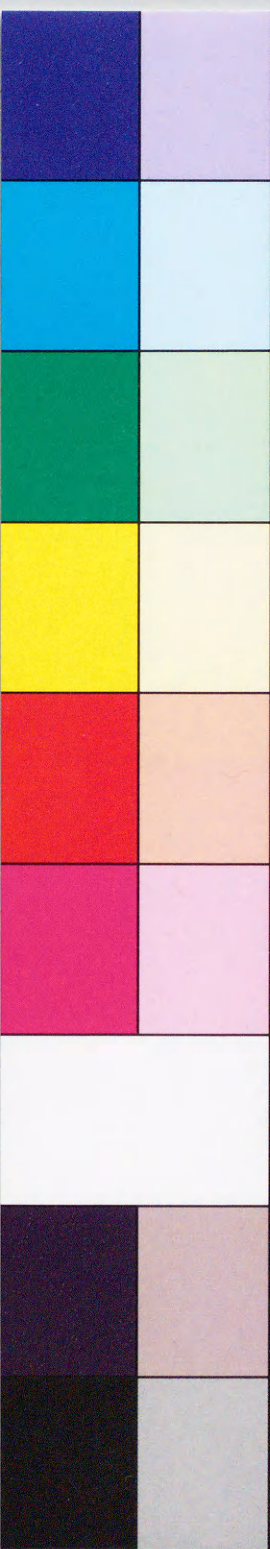


inches
cm
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 8

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

