

氏 名(本籍) 下 司 雅 也

学位の種類 博 士 (農 学)

学位記番号 農 第 6 2 9 号

学位授与年月日 平 成 13 年 2 月 8 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文題目 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

論文審査委員 (主 査) 教 授 佐 藤 英 明  
教 授 山 岸 敏 宏  
教 授 小 原 嘉 昭

# 論文内容要旨

## 第一章 緒論

受精卵移植技術は、牛の改良・増殖手段として成果をあげつつあり、胚の需要は年々増加している。しかし、過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、食肉処理場で廃棄される卵巣内の未成熟卵子を利用して、安価で良質な移植可能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。また、体外受精技術は、核移植や遺伝子導入技術等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。

ウシ体外成熟・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が1987年梶原らにより報告されて以降、次々と体外培養胚による子牛生産の報告がなされるようになったが、移植可能な胚盤胞期まで発生する胚は供試卵の数十%であり、その受胎率も生体由来胚に比べて低く、よりよい発生培養法の確立が望まれている。一方、卵巣から採取し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連絡し、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ものの、その役割については未だ不明な点が多い。移植可能胚を効率よく生産するためにも、卵丘細胞の機能を解明する必要がある。さらに、受精卵移植を効率的に行うためには胚の供給方法が重要であるが、新鮮胚の低温短期保存が可能となれば、物流システムの発達した今日では遠隔地への胚の輸送が可能となるとともに、低温で胚の発育を抑制することにより胚の発育ステージと受卵牛の発情周期を一致させて移植することが可能となる。

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し、まず体外受精卵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、胚盤胞への発生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検討のために、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

成熟及びその後の発生において発情周期20日目の血清添加が優れている、ヒト血清より牛胎仔血清を用いた方が発生率が高い、過排卵処置により回収した桑実胚の培養において羊血清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等、添加血清により成熟率や胚盤胞への発生率に差があることが知られている。そこで、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ウシ体外成熟・受精卵の胚盤胞への発生率に及ぼす影響について検討した。雌牛血清は発情周期8日目に，過排卵処置牛血清は過排卵処置時の発情後8日目に採取した同一牛の血清を用いた。その結果，過排卵処置牛血清添加区における8細胞期あるいは胚盤胞期への発生率は，他の血清添加区に比べて有意に高く，発生培地への添加血清として過排卵処置牛血清の有効性が示された（図1）。

### 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

培養気相中の二酸化炭素濃度は培養液のpH維持に重要であり，TCM199は5%二酸化炭素下で約pH7.4を示す。しかし，ウシ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ってpHが低下し，胚発生が抑制される可能性も考えられる。また，発生培地への低分子チオール化合物[β-メルカプトエタノール(β-ME)またはシステアミン]の添加は，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ているが，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。そこで，まず，二酸化炭素濃度が成熟率や胚発生に及ぼす影響を検討したところ，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・98%空気での胚盤胞への発生率は，5%二酸化炭素・95%空気のとより有意に高く（図2），5%二酸化炭素での共培養後の発生培地のpH(7.26)は，2%二酸化炭素での共培養後の培地のpH(7.45)よりも低かった（図3）。次に，発生培地へのβ-ME添加が体外成熟・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について検討した結果，10μM添加区における胚盤胞への発生率は，0あるいは50μM添加区に比べて有意に高かった（図4）。以上の結果から，卵丘細胞との共培養系を用いる場合には，通常用いる5%二酸化炭素・95%空気ではなく2%二酸化炭素・98%空気を用いて共培養を行い，媒精2日後より10μMβ-ME添加培地で共培養を継続することにより，ウシ体外成熟・受精卵の胚盤胞への発生率が向上す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

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単

純な培養系が必要である。また、体外受精由来産子に過大子が多くみられ、その原因として添加血清や共培養細胞の影響が指摘されている。さらに、培養気相中の酸素分圧も胚発生に影響を及ぼす可能性が報告されている。一方、ウシ体外受精卵の発生培地として広く用いられているTCM199が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。そこで、TCM199あるいは共培養細胞を必要としない培地として開発されたCR1aaからBSAを除いたmCR1aa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あるいは酸素分圧がウシ体外成熟・受精卵の胚盤胞への発生率に及ぼす影響について検討した。その結果、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。また、卵丘細胞を用いない非共培養系ではmCR1aa区がTCM199区に比べて有意に胚盤胞への発生率が高かったが、両培地とも共培養系に比べて胚盤胞への発生率は低下した（図5）。また、非共培養系では、mCR1aaを基本培地とした場合でも胚盤胞への発生には血清あるいはBSAの添加を必要とすること（図6）、通常用いられる酸素分圧（20%）よりも低い5%酸素・5%二酸化炭素・90%窒素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（図7）。

## 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

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成熟培地の使用が不可欠である。そこで、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胚盤胞への発生率に及ぼす影響について検討した結果、成熟培地への血清添加の有無は、ウシ未成熟卵子の成熟率や体外受精後の発生率に影響を及ぼさないことが明らかとなった（図8）。ところで、成熟培地へのシステアミン添加は卵子のグルタチオン含量を高めて、体外成熟・受精ブタ卵子の胚盤胞への発生率を向上させることが報告された。細胞中のグルタチオンは、雄性前核形成や細胞を酸素傷害から守るためにも大きな役割を果たすことから、無血清成熟培地へのシステアミン添加が、ウシ未成熟卵子の成熟率、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。その結果、成熟培地へのシステアミンの添加は成熟率や受精率には影響を与えなかった（図9）。しかし、成熟培地への5  $\mu$ M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（図10）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（図9）。

## 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

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連絡しており、卵子の成熟やその後の胚発生に重要な役割をはたす。裸化未成熟卵子由来成熟卵子も、形態的には卵丘細胞卵子複合体由来成熟卵子と差は認められないが、裸化未成熟卵子由来胚の発生率は卵丘細胞卵子複合体由来胚に比べて低く、この発生率の差は、卵丘細胞の有無により細胞質の成熟に違いがおこるためと推察される。しかし、卵子の成熟の際の卵丘細胞の役割については未だ不明な点も多い。そこで、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成熟率、受精率及び胚盤胞への発生率に及ぼす影響を検討した。その結果、裸化未成熟卵子は、ピルビン酸を含む成熟培地で成熟培養することにより核の成熟は可能であった（図11, 12, 13）。しかし、成熟培地へのピルビン酸添加の有無に関わらず、裸化未成熟卵子の体外成熟・受精・培養後の4細胞期や胚盤胞への発生率は卵丘細胞卵子複合体に比べて有意に低く（図14）、成熟培養後のグルタチオン含量も、成熟培養前の卵子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（図15）。すなわち、成熟時の卵丘細胞の存在は体外成熟後のグルタチオン含量や胚発生に影響することが明らかとなった。ただし、ピルビン酸添加無血清培地で成熟させた裸化卵子も無血清培地を用いた体外受精・体外培養により胚盤胞へ発生可能であり、この胚盤胞の移植により裸化未成熟卵子由来の子牛が世界で初めて得られた（図16）。

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

新鮮胚の低温短期保存が可能となれば、遠隔地への輸送が可能となるとともに、胚の発生を抑制することにより胚の発生ステージと受卵牛の発情周期を一致させて移植することが可能となる。また、近年、 $\beta$ -MEの添加が37~39℃での短期保存における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ている。そこで、媒精後7日（Day 7）及び8日（Day 8）に胚盤胞へと発生した体外受精胚を用いて5℃あるいは25℃で24時間保存し、胚盤胞への発育速度、保存温度あるいは保存液への $\beta$ -ME添加が保存後の胚の拡張胚盤胞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℃で24時間保存した場合、100 $\mu$ M  $\beta$ -ME添加により対照区と同様の拡張胚盤

胞への発生率が得られた（図17）。25℃保存の場合、保存後の生存率は高いものの、保存中に拡張胚盤胞へと発生するものが認められた（図17）。また、胚盤胞への発育の遅いDay 8 胚は、発育の早いDay 7 胚に比べて保存後の生存性が低かった（図17）。さらに、100  $\mu$  M  $\beta$ -ME 添加培地で5℃24時間保存後の胚の移植試験により産子が得られた（表1）。以上のことから、保存培地への100  $\mu$  M  $\beta$ -ME 添加は、5℃24時間保存後のウシ体外受精由来胚盤胞の生存性向上に有効であることが示された。

#### まとめ

1. 発生培地に添加する血清として過排卵処置牛血清が有効であった。
2. 卵丘細胞との共培養の場合には、2%二酸化炭素・98%空気の気相下で培養を行ない、媒精2日後に10  $\mu$  M  $\beta$ -メルカプトエタノール添加培地で共培養を継続することにより、ウシ体外成熟・受精胚の胚盤胞への発生率が向上した。
3. 非共培養系では、通常酸素分圧（20%）よりも低い5%酸素・5%二酸化炭素・90%窒素の気相下でCR1aaを用いて培養することにより、胚盤胞への発生率が向上した。
4. 無血清成熟培地への5  $\mu$  M システアミン添加は、体外成熟卵子のグルタチオン含量を成熟培養前のレベルに維持することにより、体外成熟卵子の胚盤胞への発生率を高めた。
5. 裸化卵子の体外成熟にはピルビン酸の存在が必要であり、成熟時の卵丘細胞の存在は体外成熟後のグルタチオン含量や胚発生に影響した。また、ピルビン酸添加mTCM199で成熟培養した裸化未成熟卵子由来の胚盤胞の移植による子牛を世界で初めて得た。
6. 保存培地への100  $\mu$  M  $\beta$ -ME 添加は、5℃24時間保存後のウシ体外受精由来胚盤胞の生存性向上に有効であった。

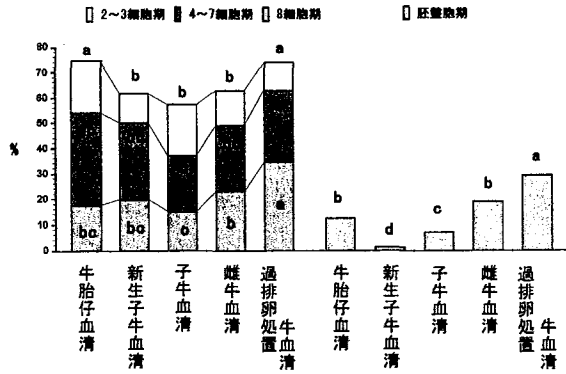


図1. 添加血清の種類がウシ体外成熟・体外受精卵の初期発生率あるいは胚盤胞期への発生率に及ぼす影響

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

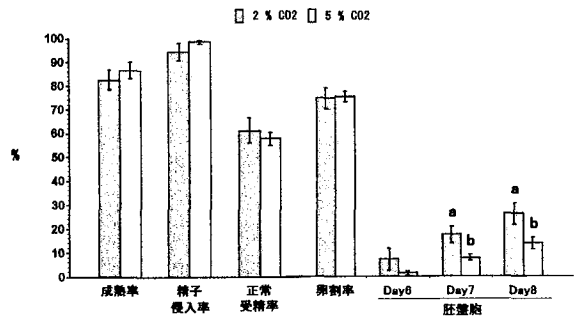


図2. 培養気相中の二酸化炭素濃度が成熟率・受精率及びその後の発生率に及ぼす影響

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

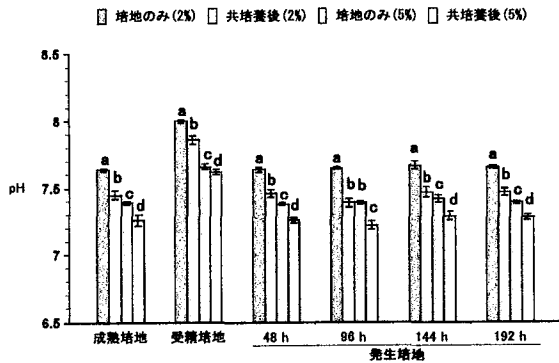


図3. 培養気相中の二酸化炭素濃度が培養液のpHに及ぼす影響

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)

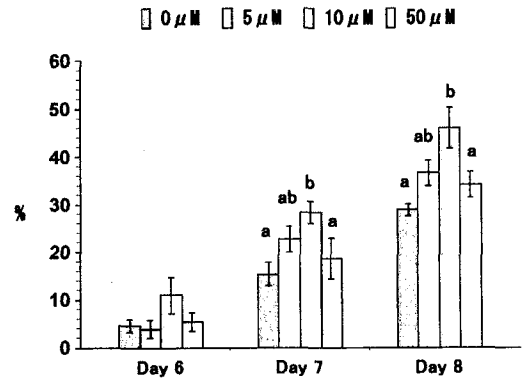


図4. 共培養系における発生培地へのβ-メルカプトエタノールの添加が体外成熟・受精・培養ウシ4~8細胞期胚の胚盤胞への発生率に及ぼす影響

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

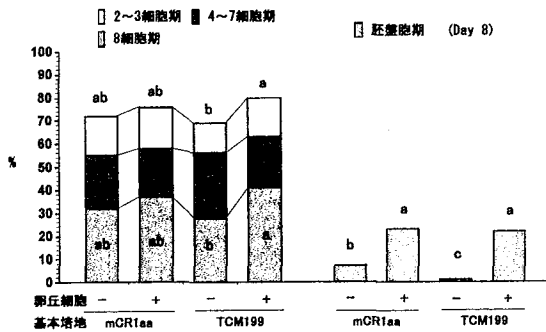


図5. 発生用基本培地の違い及び卵丘細胞の有無がウシ体外成熟・受精卵の発生率に及ぼす影響

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

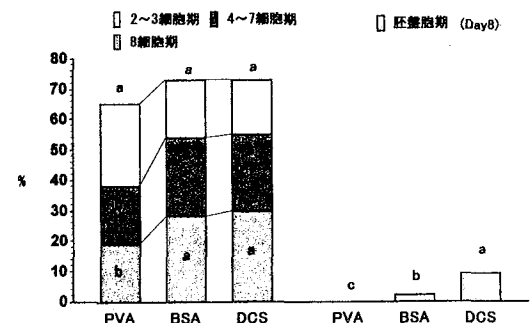


図6. 発生培地へのPVA、BSAあるいは血清の添加が非共培養系におけるウシ体外成熟・受精卵の発生率に及ぼす影響

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;  $\chi^2$ -test)

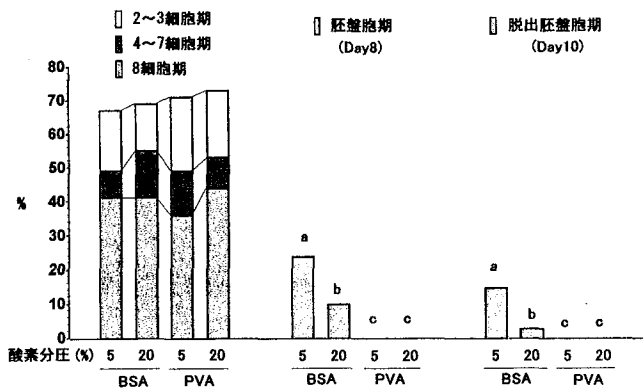


図7. 培養気相中の酸素分圧が体外成熟・受精卵の発生率に及ぼす影響

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

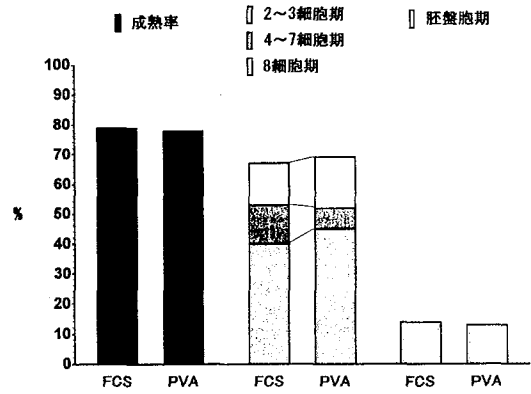


図8. 成熟培地への血清添加の有無がウシ未成熟卵子の成熟率及び体外受精後の発生率に及ぼす影響

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)

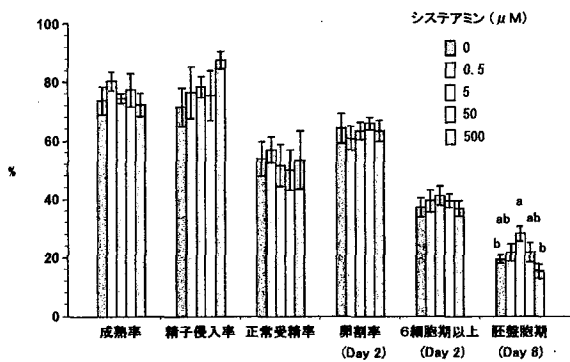


図9. 無血清成熟培地へのシステアミンの添加がウシ未成熟卵子の成熟率・受精率及びその後の発生率に及ぼす影響

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

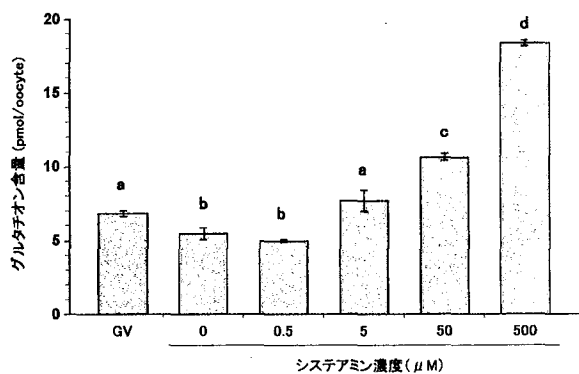


図10. 無血清成熟培地へのシステアミンの添加が成熟培養前後の卵子のグルタチオン含量に及ぼす影響

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)

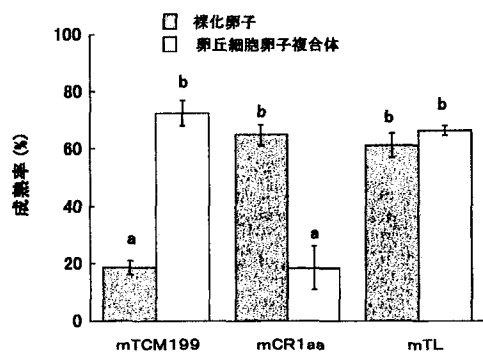


図11. 無血清成熟培地の種類あるいは卵丘細胞の有無がウシ未成熟卵子の体外成熟率に及ぼす影響

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)

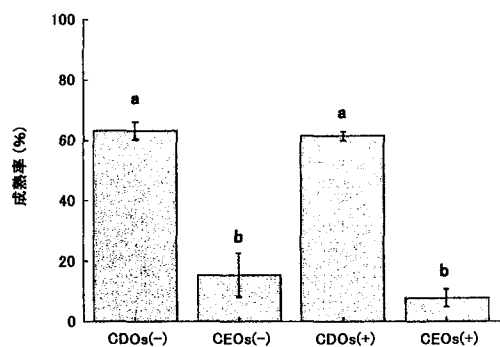


図12. mCR1aaへのグルコースの添加あるいは卵丘細胞の有無がウシ未成熟卵子の成熟率に及ぼす影響

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)



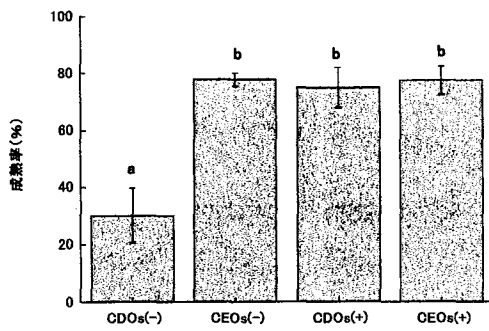


図13. mTCM199へのピルビン酸ナトリウムの添加あるいは卵丘細胞の有無がウシ未成熟卵子の成熟率に及ぼす影響

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)

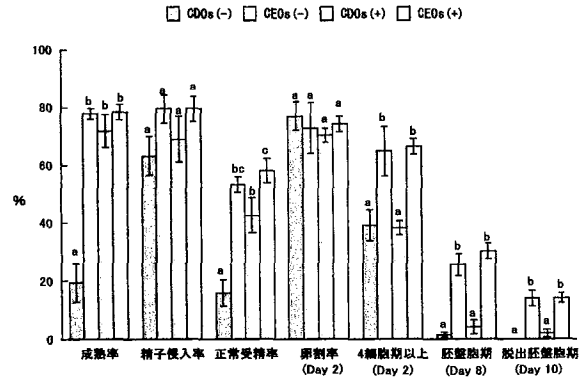


図14. 無血清成熟培地へのピルビン酸ナトリウムの添加あるいは卵丘細胞の有無がウシ未成熟卵子の成熟率・受精率及びその後の胚盤胞への発生率に及ぼす影響

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)

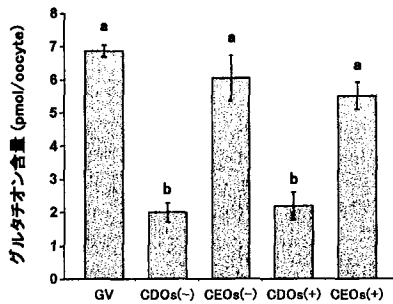


図15. 無血清成熟培地へのピルビン酸ナトリウム添加あるいは卵丘細胞の有無が卵子のグルタチオン含量に及ぼす影響

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)



図16 裸化未成熟卵子由来の子牛

(1999年3月7日生)

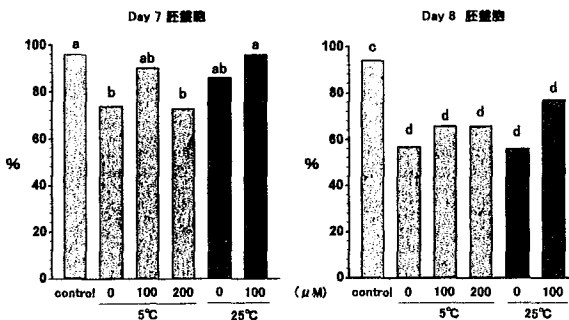


図17. 保存培地へのβ-メルカプトエタノール添加が体外成熟・受精由来胚盤胞の短期保存後の生存性に及ぼす影響

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200µM 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; χ<sup>2</sup>-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	
2	4	3	3	3	2	
3	4	2	2	1	1	
計	14	5	5	4	3	
対照区	5	2	2	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。

## 論文審査結果要旨

受精卵移植技術は、ウシの改良・増殖手段として成果をあげつつあり、胚の需要は年々増加している。しかし、過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、食肉処理場で廃棄される卵巣内の未成熟卵子を利用して、安価で良質な移植可能胚を多量に作出する技術の開発が必要である。そこで、本研究では、未成熟卵子の体外成熟・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し、まず体外受精卵の発生培養方法について検討した。その結果、発生培地に添加する血清として過排卵処理牛血清を用いること、卵丘細胞との共培養系の場合には、通常用いられている5%二酸化炭素・95%空気だけではなく、2%二酸化炭素・98%空気の気相下で培養を行い、媒精2日後に発生した4～8細胞期の胚を10 $\mu$ M $\beta$ -メルカプトエタノール添加培地で共培養を継続することにより、体外成熟・受精胚の胚盤胞への発生率が向上することを明らかにした。また、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%酸素・5%二酸化炭素・90%窒素の気相下でCR1aaを用いて培養することにより、胚盤胞への発生率が向上することを明らかにした。

次に、胚盤胞への発生率の更なる向上を目指して体外成熟培養方法の検討を行い、無血清成熟培地への5 $\mu$ Mシステアミン添加により、体外成熟卵子のグルタチオン含量を成熟培養前のレベルに維持することが可能となり、体外成熟卵子の胚盤胞への発生率を高めることができた。また、裸化卵子の体外成熟にはピルビン酸の存在が必要であり、成熟時の卵丘細胞の存在は体外成熟後の卵子のグルタチオン含量や胚発生に影響することを明らかにするとともにピルビン酸添加mTCM199で成熟培養した裸化卵子由来の胚盤胞の移植による子牛を世界で初めて得ることに成功した。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い、体外受精由来胚盤胞の5℃24時間保存において、保存液への100 $\mu$ M $\beta$ -メルカプトエタノールを添加することにより、低温保存後の体外受精由来胚盤胞の生存性が向上することを明らかにした。これらのことは応用動物科学分野において高く評価される。よって博士(農学)の学位を授与できるものと判定した。