

凍結融解後の生存性を高めるウシ体外受精由来胚の発生培養方法の検討

岡崎尚之 前原 智 高仁敏光 白石忠昭

要 約 本試験では、体外発生培養時の培養条件(酸素濃度および培養液)の違いが発生した体外受精胚の凍結融解後の生存性に及ぼす影響について調査した。

食肉処理場由来の卵巣から採取した卵子を常法に従い、体外成熟および媒精後、5%血清加CR1aaで72時間培養したのち、5%および20%の酸素濃度の違いとTCM199およびCR1aaの培養液の違いにより4区に区分した。胚は媒精後10日目まで発生培養を行い、発生率および凍結融解後の生存性を調査した。

5%酸素濃度のCR1aaで培養した場合の胚盤胞期胚への発生率は39.4%であり、20%酸素濃度のTCM199およびCR1aaの発生率に比べ高率であり($p<0.05$)、胚盤胞期胚の栄養膜細胞数も多かった($p<0.05$)。

CR1aaの5%酸素気相で発生した胚の生存率および脱出胚盤胞率は61.0%および19.5%であり脱出胚盤胞率において、20%酸素濃度で培養した胚に比べ高率であった($p<0.05$)。

以上の成績から、5%の低酸素濃度条件下で培養液にCR1aa液を用いた体外発生培養を行って発生した胚盤胞期胚は、凍結融解後の脱出胚盤胞率が高まることが明らかとなった。

Key words:

島根県立畜産試験場研究報告第33号,5-9,2000

ウシ体外受精(IVF)由来胚は体内由来の胚に比べ、凍結傷害に対する感受性が高いことが指摘されており^{4,16,19)}、IVF胚の凍結に用いる凍結媒液²⁶⁾、凍結方法^{13,22)}、植氷後の冷却温度^{5,14,18)}ならびに耐凍性の高いIVF胚の発生培養方法^{8,21)}について検討されている。

またIVF胚は細胞数が少なく^{6,9)}、個々の細胞の比重が軽い¹⁵⁾ことから体内由来胚に比べ品質が劣ると言われている^{6,9,15)}。初期胚の培養気相中の酸素濃度は5~10%濃度で培養することにより羊胚の発育が改善されることが古くから報告されており²⁴⁾、牛胚においても発生率が向上することが報告され^{17,23)}、20%酸素濃度培養で得られた胚盤胞より品質の良い胚盤胞を作出できることが示唆されている²³⁾。

そこで、発生培養気相中の酸素濃度と培養液の違いが、体外受精由来胚の発生率および発生した胚の凍結融解後の生存性について調査し、耐凍性の高い体外受精由来胚の発生培養方法について検討した。

材料および方法

未成熟卵子の体外成熟および体外受精:食肉処理場由来の卵巣から採取した卵子の体外成熟および体外受精は既報¹⁾に準じて行った。採取した卵子は、5%炭酸ガス(CO₂)、95%空気、38.5 条件下で、ミネラルオイル(SQUIBB)で覆った5%子ウシ血清(CS、GIBCO)添

加の25mMHEPES緩衝TCM199(GIBCO)500 μ lに卵子40~50個を入れ、22~24時間成熟培養を行った。体外受精は、ミネラルオイルで覆われた精子浮遊液ドロップ100 μ lに成熟卵子を15~20個の成熟卵子を導入し、5%CO₂、95%空気、38.5 条件下で6時間培養した後、0.025%ヒアルロニダーゼを加えたリン酸緩衝液(PBS(-))で5分間ルテックスすることにより卵丘細胞を卵子から除去した。裸化した卵子は、安部らの方法²⁾に準じ、5%CO₂、95%空気、38.0 の気相条件の5%CS+CR1aa²⁰⁾で培養した(40個/500 μ l)。受精後72時間目に卵割検査を行い、正常に卵割した胚を以下の試験に供した。実験1:体外受精後の体外発生培養における酸素濃度および培養方法がその後の発生率に及ぼす影響を観察するため、以下の4区を設けた。各区の構成は、5%O₂、5%CO₂、90%N₂、38.0 の気相条件下の5%CS+TCM199で卵丘細胞と共培養する199-5%O₂区および5%CS+CR1aaで培養するCR1-5%O₂区、5%CO₂、95%空気、38.0 の条件下の5%CS+TCM199で卵丘細胞と共培養する199-20%O₂区および5%CS+CR1aaで培養するCR1-20%O₂区で、受精後10日目まで培養を継続し、受精後6日目から24時間間隔で胚盤胞期胚への発生検査を行った。培養液量は各区とも500 μ lとし、この培養液に25~30個の胚を入れ培養した。

各区の7~8日目に発生した胚盤胞期胚は、二重壺

光染色により細胞数を計測した。発生した胚盤胞期胚は、5%CO₂、95%空気、38.0 °Cの条件下の10μg/mlのヘキスト33342(SIGMA)と10μl/mlのヨウ化プロピジウム(和光)を加えた5%CS+CR1aaで30分間インキュベーションした後、4隅にワセリン・パラフィンを配したスライドガラス上に置き、カバーガラスで圧した後、蛍光顕微鏡下で観察した。

実験2 :実験1において、受精後6~8日目に発生した胚盤胞および拡張胚盤胞期胚の凍結融解後の生存性を調査するため、以下の方法で凍結した。

供試胚は、1.5Mエチレングリコールと0.1Mシュウクロースを加えた20%CS加修正リン酸緩衝液(m-PBS)を基礎媒液とし、これにウシリノール酸アルブミン(LAA)を4.0mg/ml加えた凍結媒液で凍結した。凍結方法は各凍結媒液中に胚を入れ10分間平衡後、0.25 mlのストローに充填した。ストローは-7.0 °Cに冷却したプログラムフリーザーの冷却槽に入れ、植氷後、10分間保持し、-0.3 °C/分で-30 °Cまで冷却した後、液体窒素(LN₂)に投入した。

胚の融解は、LN₂から取り出したストローを、10秒間空気中で保持後、30 °Cの温湯中で融解した。ストローから取り出した胚は38.0 °Cのm-PBS中で10分間静置した後、5%CO₂、95%空気、38.0 °C条件下の5%CSと50μMのメルカプトエタノールを加えたTCM199で96時間培養した。胚の生存は胞胚腔の再形成により確認し、さらに脱出胚盤胞への発育についても観察した。細胞数の計測

は、融解、耐凍剤除去後、30分~2時間培養したのち、実験1の方法で行った。

統計処理 :胚盤胞期胚への発生率、凍結融解後の胚の生存率および孵化率については²検定あるいはFisherの直接確率計算法を用いて検定を行い、胚盤胞期胚の平均細胞数については検定により行った。

成 績

実験1 :各区の胚盤胞期胚への発生率(表1)は、199-5%O₂区が36.3%(105/289)、CR1-5%O₂区が39.4%(110/279)、199-20%O₂区が30.1%(85/282)、CR1-20%O₂区が31.3%(88/281)で、CR1-5%O₂区は199-20%O₂区およびCR1-20%O₂区に比べ、高率であった(p<0.05)。

発生した胚盤胞期胚の細胞数を計測した結果(表2)、栄養膜細胞数(平均値±標準誤差)は、CR1-5%O₂区が88.6±22.9個であり、199-20%O₂区の68.3±16.6個およびCR1-20%O₂区の74.4±18.6個と比べ多かった(p<0.05)。また、総細胞数においてもCR1-5%O₂区が135.8±35.1個であり、199-20%O₂区の111.5±27.0個と比較して多かった(p<0.05)が、内細胞塊細胞数においては、各区に差は認められなかった。

各区の胚盤胞期胚の出現日別発生状況は表3に示すとおりで、8日目までの胚盤胞期胚への発生率は、199-5%O₂区が86.7%(91/105)、CR1-5%O₂区が92.7%(102/110)、199-20%O₂区が75.3%(64/85)、

表1 培養気相中の酸素濃度および培養液が胚盤胞期胚への発生に及ぼす影響

培養方法	培養液 O ₂ 濃度	供試卵子数	卵割胚数(%) ^{*1}	胚盤胞期胚数(%) ^{*2}
199-co	5	289	223(77.2)	105(36.3)
CR1aa	5	279	215(77.1)	110(39.4) ^a
199-co	20	282	212(75.2)	85(30.1) ^b
CR1aa	20	281	229(81.5)	88(31.3) ^b

^{*1}卵割率：卵割胚数 / 供試卵子数 × 100
^{*2}発生率：胚盤胞期胚数 / 供試卵子数 × 100
 異符号間に有意差あり a,b : p<0.05

表2 免疫蛍光二重染色による胚盤胞期胚の細胞数計測

培養方法	培養液 O ₂ 濃度	供試胚数	胚盤胞期胚の細胞数 [*]		
			内細胞塊細胞	栄養膜細胞	総細胞数
199-co	5	23	43.8 ± 9.3	81.1 ± 17.3 ^a	124.9 ± 26.6
CR1aa	5	16	47.2 ± 12.2	88.6 ± 22.9 ^{a, c}	135.8 ± 35.1 ^a
199-co	20	18	43.2 ± 10.5	68.3 ± 16.6 ^b	111.5 ± 27.0 ^b
CR1aa	20	17	41.1 ± 10.3	74.4 ± 18.6 ^d	115.5 ± 28.9

^{*}:平均値±標準誤差
 異符号間に有意差あり a,b,c,d : p<0.05

表3 体外受精後の胚盤胞期胚への発生日別割合

培養方法		胚盤胞期胚の発生日*				
培養液	O ₂ 濃度	6日目	7日目	8日目	9日目	10日目以降
199-co	5	6.7 (7/105)	33.3 (35/105)	46.7 (49/105)	11.4 (12/105)	1.9 (2/105)
CR1aa	5	20.0 (22/110)	38.2 (42/110)	34.5 (38/110)	4.5 (5/110)	2.7 (3/110)
199-co	2 0	9.4 (8/ 85)	28.2 (24/ 85)	37.6 (32/ 85)	17.6 (15/ 85)	7.1 (6/ 85)
CR1aa	2 0	14.8 (13/ 88)	39.8 (35/ 88)	31.8 (28/ 88)	10.2 (9/ 88)	3.4 (3/ 88)

* : 媒精日 = 0
()内は発生日数 / 総発生日数

CR1-20%O₂区が86.4%(76/88)であった。CR1aaあるいは低酸素で培養した区は、胚盤胞期胚への発生日別割合傾向であった。

実験2 :各区の凍結融解後の生存率および脱出胚盤胞率は表4に示すとおりで、生存率には差は認められなかったが、脱出胚盤胞率においては、CR1-5%O₂区が19.5%(8/41)と、199-20%O₂区 の 5.2%(3/58)およびCR1-20%O₂区 の 4.9%(2/41)と比べ高率であった (p<0.05)。

表4 凍結融解処理した胚盤胞期胚の生存率と脱出胚盤胞率

培養方法		供試胚数	生存胚数(%) ^{*1}	脱出胚盤胞数(%) ^{*2}
培養液	O ₂ 濃度			
199-co	5	4 5	2 3 (51.1)	5 (11.0)
CR1aa	5	4 1	2 5 (61.0)	8 (19.5) ^a
199-co	2 0	5 8	3 4 (58.6)	3 (5.2) ^b
CR1aa	2 0	4 1	2 1 (51.2)	2 (4.9) ^b

*1 生存率 : 生存胚数 / 供試胚数 × 100

*2 脱出胚盤胞率 : 脱出胚盤胞数 / 供試胚数 × 100

異符号間に有意差あり a, b : p<0.05

表5 凍結融解処理した胚盤胞期胚の生存細胞数の計測

培養方法		供試胚数	胚盤胞期胚の細胞数 ^{*1}		
培養液	O ₂ 濃度		生細胞数	総細胞数	生存率(%) ^{*2}
CR1aa	5	1 3	65.9±5.3	101.2±5.1 ^a	64.9±3.4
199-co	2 0	1 4	55.6±3.1	87.9±3.6 ^b	64.2±3.7

*1 : 平均値 ± 標準誤差

*2 生存率 : 生細胞数 / 総細胞数 × 100

異符号間に有意差あり a, b : p<0.05

CR1-5%O₂区および199-20%O₂区について、凍結融解後の平均細胞数を計測した結果(表5)、CR1-5%O₂区 101.2±5.1個(平均値 ± 標準誤差)であり 199-20%O₂区 の87.9± 3.6個と比べ多く(p<0.05)、生存細胞数も多い傾向であった。

考 察

IVF初期胚の培養気相は、一般には5%CO₂を含む空気、つまり約20%の酸素濃度で培養が行われているが、ウサギ、ラットおよびハムスターなどの卵管や子宮内の酸素分圧は大気中の約4分の1と報告されており⁴⁾、牛の卵管および子宮内酸素分圧も同程度と考えられる。羊胚において、初期胚の酸素濃度を5~10%濃度で培養することにより発育が改善されることが古くから報告されており⁴⁾、牛胚においても5%の酸素濃度で発生培養することにより胚盤胞への発生率が向上し^{7, 23)}、発生した胚盤胞の細胞数も増加することが報告されている^{2, 3)}。実験1において、TCM-199で卵丘細胞との共培養した場合、5%の低酸素濃度での培養が胚盤胞期胚への発生率および胚の平均細胞数とも良好であったことから、5%の低酸素濃度で培

養することにより細胞数の多い、品質の高い胚盤胞を作出できることが可能と思われた。

初期胚発生培養の際、卵丘顆粒膜細胞等の体細胞との共培養は、胚発生促進物質を分泌することに加えて、TCM199中の過剰なグルコースの消費により至適濃度に調整すること、また培養液中の酸素を消費することによって生体内の酸素分圧に近づけることにより胚発生を促進すると推察されている⁷⁾。しかし、共培養を行う場合、細胞の種類⁶⁾あるいは細胞の活性状態²³⁾により胚発生効果が異なる。Kobayashiら¹¹⁾は、共培養条件下では通常の20%酸素培養における胚盤胞発生率が5%酸素培養での発生率に比べ高く、非共培養条件下では逆に5%の低酸素培養における発生率が、20%の酸素培養に比べ高率であったと報告している。Nagaoら¹⁷⁾も同様な報告をしているが、実験1ではKobayashiらおよびNagaoらの報告とは逆に、共培養下での低酸素培養における発生率が高い結果となった。これは培養液量あたりの培養胚数の違い、共培養に用いた卵丘細胞の細胞数および活性状態が最適であったことなどが考えられる。

各種体細胞との共培養を必要としない合成培養液であるCR1aa¹²⁾を用いた低酸素培養は、TCM199で卵丘細胞との共培養を低酸素濃度で行った場合と同程度の胚盤胞期胚への発生率が得られ、また、胚盤胞期胚への発育速度はCR1aaの低酸素培養がTCM199の場合に比べ、早い傾向にあった。後藤ら⁶⁾は胚の発育速度と品質との関係については発育速度の速い胚が割球数が多く、染色体異常が少ないことを報告している。今回は染色体検査は行っていないが、CR1aaの5%酸素培養により発生した胚盤胞の平均細胞数は20%酸素培養のTCM199で発生した胚に比べ多く、CR1aaを用いた低酸素培養は、品質の高い胚を作出することができる培養方法であることが示唆された。

Leiboら¹⁴⁾は、凍結保存後の体内由来胚の孵化率は80%以上であるのに対し、IVF胚は僅か20%でありIVF胚の凍結傷害に対する感受性が高いこと、Betteridgeら³⁾は、胚の細胞数と移植後の受胎性について細胞数が少ないと胚の生存性の低下がみられることを指摘している。Iwasakiら¹⁰⁾も、凍結融解後の生存細胞数特に内細胞塊の死滅細胞数の増加が受胎性の低下の一因であると推察している。実験2において、CR1aaを用いた低酸素条件下で発生した胚の脱出胚盤胞率が20%酸素濃度のTCM199で発生した胚に比べ高率であったのは、BetteridgeらおよびIwasakiらの報告と同様に、凍結融解後の総細胞数が多く、生存細胞数も高い傾向であった

ためと考えられることから、CR1aaによる低酸素培養は耐凍性の高いIVF胚を作出する培養方法であると思われる。

以上の成績から、体外受精後72時間からのIVF初期胚の培養は、5%の低酸素濃度条件下でCR1aaを用いて体外発生培養を行うことにより、胚盤胞期胚への発生率を向上させ、さらに凍結融解後の生存性および脱出胚盤胞率を高めることが明らかとなった。しかし、近年、牛や羊のIVF胚移植により生まれた産子は、人工授精および体内由来胚移植により生まれた産子と比べ生時体重の増加、難産や早死産が多いという報告²⁷⁾がある。さらに、このような事例は、羊において血清添加の発生培養液で生産されたIVF胚に特異的な現象であることが示唆されている²⁵⁾。このため、今後、5%の低酸素濃度条件下でCR1aaを用いた発生培養により生産されたIVF胚は移植試験を行い、受胎性および産子の生時体重、異常産等の分娩状況を調査する必要があると思われる。

引用文献

- 1) 安部茂樹, 塩谷康生, 日畜会報, 64(1):32-37(1993).
- 2) 安部茂樹ら, 平成8年度島根県畜産関係機関業績発表会集録: 64-68 (1996).
- 3) Betteridge K. J. and N. M. Loskutoff, Mol. Reprod. Dev., 36: 262-265 (1993).
- 4) Fisher B. and B. D. Bavister, J. Reprod. Fertil., 99: 673-679 (1993).
- 5) 福島護之ら, 家畜繁殖誌, 38:j49-j54(1992).
- 6) 後藤和文, et al., 家畜繁殖誌, 38: j165-j171 (1992).
- 7) 星 宏良, 畜産の研究, 49:981-986(1995).
- 8) Imai K., et al., Theriogenology, 47:347abstr.(1997).
- 9) Iwasaki S., et al., J. Reprod. Fertil., 90: 279-284 (1990).
- 10) Iwasaki S., et al., Mol. Reprod. Dev., 37: 272-275 (1994).
- 11) Kobayashi K., et al., In Vitro Cell & Dev. Biol., 30A:556-558(1994).
- 12) 小西正人, 青柳敬人, 家畜繁殖誌, 40:j1-j4(1994).
- 13) Kuwayama M., et al., J. Reprod. Fertil., 96: 187-193 (1992).
- 14) Leibo S. P. and N. M. Loskutoff, Theriogenology, 39:81-94(1993).
- 15) Leibo S. P., et al., Theriogenology, 43: 265 abstr. (1995).
- 16) Massip A. et al., Reprod. Nutr. Dev., 35: 3-10

(1995).

17) Nagao Y., et al., *Theriogenology*, 41:681-687(1994).

18) 中川邦昭ら, 第89回日本繁殖生物学会講演要旨:
92 (1996).

19) Pollard J. W. and S .P. Leibo, *Theriogenology*, 41:
101-106(1994).

20) Rosenkrans Jr., C.F. and N.L. First, *Theriogenology*,
35:266abstr.(1991).

21) Shamsuddin M., et al., *Theriogenology*, 41:
1033-1043(1994).

22) Tachikawa S., et al., *Mol.Reprod.Dev.*, 34:266-271

(1993).

23) 高橋芳幸, *日本胚移植学誌*, 17:38-42(1995).

24) Tervit H. R., et al., *J. Reprod. Fertil.*, 30: 493-497
(1972).

25) Thompson J.G., et al., *Biol.Reprod.*, 53:1385-1391
(1995).

26) Voelkel S. A. and Y. X. Hu, *Theriogenology*, 37:
23-37 (1992).

27) Walker S. K. et al., *Theriogenology*, 45: 111-120
(1996).