

# 体外成熟培地へのリノール酸ウシアルブミン添加がガラス化保存ウシ体外成熟卵母細胞の体外受精後の胚発生に及ぼす影響

山田 彰 司   長谷川 清 寿   佐々木 恵 美   安部 茂 樹

**要約** リノール酸ウシアルブミン (LAA) を添加した体外成熟培地で培養した卵母細胞をガラス化保存し、LAA添加が体外受精後の胚発生に及ぼす影響について調べた。

卵母細胞は、食肉処理場由来の卵巣から採取し、LAA添加濃度を調製した培地中で20時間成熟培養した。成熟培養後、卵母細胞は周囲の卵丘細胞を完全に除去し、第1極体を有する裸化卵母細胞を選別した。裸化卵母細胞は、成熟培地へのLAA添加濃度あるいはガラス化保存有無によって5区に分け、それぞれ体外受精した。すなわち、成熟培地へLAAを0.3mg/ml添加しガラス化保存した区 (区)、LAA濃度を1mg/mlとしガラス化保存した区 (区)、LAA濃度が3mg/mlでガラス化保存した区 (区)、LAAを添加せずガラス化保存した区 (区) およびLAAを添加せずガラス化保存を行わなかった区 (対照区) とした。体外受精および発生培養は既報に従って行い、体外受精後10日目までに発生した胚盤胞期胚の発生率を比較した。

各区の胚盤胞期胚への発生率は、区19.0% (40/211)、区18.8% (39/208)、区14.8% (31/210)、区18.6% (37/199)、対照区37.2% (77/207) であり、区、区、および区の発生率は、対照区のそれと比べ有意 ( $p < 0.01$ ) に低率であったが、ガラス化保存した区、区、および区においてはLAA添加濃度による発生率の差は認められなかった。

このことから、体外成熟裸化卵母細胞は、ガラス化保存することで体外受精後の胚盤胞期胚への発生率が低率となり、これは成熟培地へのLAAの添加で改善されないことが明らかとなった。

**キーワード** : ウシ ガラス化保存 成熟卵母細胞 リノール酸ウシアルブミン 体外受精

ウシ卵母細胞を液体窒素中で長期間保存できれば、遺伝資源として活用することができ、世代を越えた交配が可能となる。卵母細胞は低温域に感作されると体外受精時の精子進入率の低下、正常受精の減少、活性化の誘起などの低温障害が認められ<sup>2, 3, 4, 15)</sup> 発生の進んだ胚に比べて凍結保存が極めて困難であることが報告<sup>5, 6, 7, 18)</sup> されている。この低温障害が起こる温度域を、毎分2万以上の温度下降によって素早く通過させることができるガラス化保存法が開発され、卵母細胞の保存に有効であると報告<sup>16, 19, 21)</sup> された。しかし、これらの報告においてガラス化した卵母細胞の体外受精後の胚盤胞期胚への発生率は、ガラス化保存しない場合と比べ低率であり、ガラス化保存の影響が少なからず存在すると指摘されている。

培養液に添加されたリノール酸ウシアルブミン (LAA) は、細胞膜脂肪酸の不飽和度を増加させることで膜に流動性を与え、体外受精胚の凍結保存後の生存率向上に効果が認められると報告<sup>9, 10, 11)</sup> されている。そこで今回、LAAを体外成熟培地に添加して成熟培養した体外成熟卵母細胞をガラス化保存した場合、ガラス化融解後の体外受精、体外発生に及

ぼす影響について調べた。

## 材料および方法

### 成熟培養およびガラス化処理

供試卵母細胞は、食肉処理場で摘出された卵巣から吸引採取した。卵巣の摘出から卵胞液の吸引までに要した時間は概ね20時間であり、その間の卵巣保存は、抗生物質を添加して約20に保温したDulbecco's PBS中で行った。成熟培養は、卵丘細胞が緊密に付着した卵母細胞を用い、5%子牛血清 (CS) 加TCM-199 (Gibco BRL) 中、38.5%、5% CO<sub>2</sub>、95%空気の気相条件下で20時間行った。その後、全ての供試卵母細胞は、0.1% (W/V) Hyaluronidase (Sigma) 液中でのピペッティングによって、周囲の卵丘細胞を除去した。そして、20% CS加20mM-HEPES緩衝TCM-199 (199A) で洗浄中に、第1極体が確認できない卵母細胞は取り除いた。

卵母細胞のガラス化処理は、Papis<sup>19)</sup> らの方法に準拠して行った。すなわち、3% (V/V) エチレングリコール (EG; Sigma) 液中で10ないし15分間浸漬し、30% (V/V) EGおよび1Mシュークロース (Su; Wako) を加えた液 (ガラス化液) 中に導入後、

30秒以内に卵母細胞を含むガラス化液の微小滴を液体室素中に直接滴下した。加温融解は、ガラス化微小滴を37℃に保温した0.3M Su溶液中に直接投入し3分間静置後、さらに基礎溶液中で5分間保持することで行った。ただし、ガラス化処理の基礎溶液は199Aを用いた。

試験区の設定は、成熟培地中にLAAを0.3mg/ml添加しガラス化処理した区(区)、LAAを1mg/ml添加しガラス化処理した区(区)、LAAを3mg/ml添加しガラス化処理した区(区)、LAAを添加せずガラス化処理した区(区)、ならびにLAAを添加せずガラス化処理を行わなかった区(対照区)とした。

#### 体外受精および発生培養

供試卵母細胞は、各区ごとに調製した成熟培地中で1時間培養後、既法<sup>1)</sup>に従い媒精処理を行うとともに、体外受精後に形態的に異常(細胞質の矮小化、希薄化および偏在化)と判定した卵母細胞を取り除いた。発生培養は、38.5℃、5%CO<sub>2</sub>、95%空気の気相条件下の5%CS加CR1aa培地内で行い、3日目時点でウシ卵丘細胞をシートした培地に移し換えた。卵割検査は発生培養3日目に、発生検査は10日目まで継続して行った。

### 結 果

体外受精後に形態学的異常と判定した卵母細胞の割合は、区16.9%(43/254)、区19.1%(49/257)、区12.9%(31/241)、区17.8%(43/242)および対照区5.5%(12/219)であり、区、区、区および対照区の割合が対照区と比べ有意(p<0.01)に高率であった(表1)。

体外受精後3日目における2細胞以上への卵割率は、区84.4%(178/211)、区76.0%(158/208)、区75.2%(158/210)、区72.4%(144/199)および対照区87.9%(182/207)であり対照区と区が、区、区および区と比べ有意(p<0.05)に高率であった(表2)。

胚盤胞期胚への発生率は、区19.0%(40/211)、区18.8%(39/208)、区14.8%(31/210)、区18.6%(37/199)および対照区37.2%(77/207)であり対照区の発生率が、区、区および区の発生率に比べ有意(p<0.01)

に高率であった。

LAAを添加した区、区、区および対照区の胚盤胞期胚の発生率には差を認めなかった。

### 考 察

本試験において、LAAが膜の固相-液相の転移温度を低くし、低温下での細胞膜の流動性を維持させることで卵母細胞の耐凍性を増加させることを期待して、卵母細胞のガラス化保存に応用したところ、ガラス化保存した体外成熟裸化卵母細胞は、加温融解・体外受精後に形態学的に異常と判定した割合が高く、また、胚盤胞期胚への発生率は、LAA添加濃度による差は認められず14.8%から19.0%であり、対照区の37.2%と比べ有意に低率だった。

本試験と同様の方法によってガラス化した卵母細胞を用いた体外受精において、Papisら<sup>19)</sup>は胚盤胞期胚への発生率は30%(新鮮対照群の発生率42%)であったと報告している。また、Martinoら<sup>16)</sup>は、成熟培養後の卵丘卵母細胞複合体をマイクログリッド上に置き、極微量のガラス化液とともに液体室素中に投入することでガラス化保存し、体外受精後の胚盤胞期胚への発生率は、15%(新鮮対照群の発生率36%)であったと報告している。さらに、Vajtaら<sup>21)</sup>は、細く引き伸ばしたストローに極微量のガラス化液とともに成熟卵母細胞を入れ、両端を封印しないで直接液体室素内に投入することでガラス化保

表1 LAAを添加し成熟培養した裸化卵母細胞の体外受精後の異常卵母細胞の出現割合

試験区	体外成熟供試卵母細胞	第1極体放出卵母細胞数 <sup>1)</sup> (%)	異常卵母細胞数 <sup>2)</sup> (%)
	470	254 (54.0)	43 (16.9) <sup>b</sup>
	488	257 (52.7)	49 (19.1) <sup>b</sup>
	470	241 (51.3)	31 (12.9) <sup>b</sup>
	453	242 (53.4)	43 (17.8) <sup>b</sup>
Control	453	219 (48.3)	12 (5.5) <sup>a</sup>

1) 区、区、区および対照区はガラス化保存。

2) %: 異常卵母細胞数/第1極体放出卵母細胞数。

2 検定法で異符号間に有意差ありa-b: p<0.01

表2 成熟培地へのLAA添加濃度が裸化卵母細胞のガラス化保存・融解後の体外受精後の胚発生に及ぼす影響

試験区	体外受精供試卵母細胞数	2細胞以上卵割率(%)	胚盤胞期胚数*(%)
	211	178 (84.4) <sup>b</sup>	40 (19.0) <sup>b</sup>
	208	158 (76.0) <sup>b</sup>	39 (18.8) <sup>b</sup>
	210	158 (75.2) <sup>b</sup>	31 (14.8) <sup>b</sup>
	199	144 (72.4) <sup>b</sup>	37 (18.6) <sup>b</sup>
Control	207	182 (87.9) <sup>a</sup>	77 (37.2) <sup>a</sup>

\* 媒精後7から10日目までに発生した胚盤胞期胚数。

2 検定法で異符号間に有意差ありa-b: p<0.01

存し、体外受精で25% (新鮮対照群の発生率52%) の胚盤胞期胚への発生率を得たと報告している。これらで報告されている胚盤胞期胚の発生率は、本試験での胚盤胞期胚への発生率とほぼ同様の値であり、また、その発生率も新鮮対照区と比べほぼ半分程度であったことから、成熟培地へのLAA添加が体外受精後の胚盤胞への発生率に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

ウシ胚の凍結保存において、Imaiら<sup>11)</sup>は、体外受精後の発生培養で用いるCR1aa液にLAAを0.25から1.0 mg/ml添加した場合に、得られた胚盤胞期胚の耐凍性が改善したと報告した。また、LAAを添加し体外発生培養を行うことで体外受精由来胚の他の発育ステージにおいても耐凍性が改善したことが確認されている<sup>10, 20)</sup>。また、Hochiら<sup>9)</sup>は、LAAを0.1%の割合で体外成熟培養液および体外受精培地に添加し、作出した前核期卵を1.5M EGおよび0.3M Suを用い凍結保存し、これを融解後体外培養した場合、胚盤胞期胚の発生率が向上したと報告している。このように、体外受精直後の前核期卵母細胞から移植可能な胚盤胞期胚までの凍結保存にLAAが有効であるとされているが、これは、LAAが、脂質二重層のリン脂質における相対的不飽和度を上昇させたり、コレステロール代謝に影響してコレステロール：リン脂質比を低下させることによって細胞膜の流動性を増加させ冷却行程での脱水の促進に寄与したことによると思われる。植物においても、低温処理によって細胞膜の脂質構成が変化し、細胞膜の脂肪酸の不飽和度が増加し、流動性が増加することが明らかになっており、リノール酸などの不飽和脂肪酸が低温下での細胞膜の液晶状態を維持することで保護作用を高めるとされている<sup>12, 13)</sup>。受精直後の前核期卵母細胞から胚盤胞期胚までの凍結保存で耐凍性が向上したことは、LAAを添加することでリノール酸などの不飽和脂肪酸が細胞により多く取り込まれ、膜の固相 - 液相の転移温度が低くなり、低温下での細胞膜の流動性を維持しているためと推測される。

一方、ウシ卵母細胞中には飽和脂肪酸であるパルミチン酸、ステアリン酸あるいは不飽和度が低いオレイン酸含量が多く<sup>17)</sup>、細胞膜の不飽和脂肪酸および飽和脂肪酸の構成比は飽和脂肪酸の比率が高くなり、高い温度域での固相化が誘起され耐凍性が低いと考えられる。ウシ卵母細胞は、体外で成熟培養すると培養液中から脂肪が取り込まれ、脂肪酸組成に変化が生じる<sup>14)</sup>ことから、本試験において、卵母細胞内に不飽和脂肪酸の取り込みを促し、細胞膜の流

動性を維持させることでガラス化保存後の生存性向上を目的とし、体外成熟培養液にLAAを添加した。しかし、体外成熟した裸化卵母細胞は、ガラス化保存後には体外受精後の胚盤胞期胚への発生率が低率となり、LAAの添加効果は認められなかった。

卵母細胞は、0、10分程度の短時間の低温感作で傷害を受けることが知られており<sup>15)</sup>、卵母細胞が冷却行程でこの危険な温度域を通過する際に、LAAの添加が細胞膜の流動性を増加させ脱水の促進に寄与するのであれば、LAAの添加効果は、危険温度域を瞬時に通過するガラス化保存よりむしろ緩慢に通過する冷却法において発揮されると考えられる。

以上のことから、体外成熟裸化卵母細胞は、ガラス化保存することで体外受精後の胚盤胞期胚への発生率が低率となり、これは成熟培地へのLAAの添加で改善されないことが明らかとなった。

#### 参 考 文 献

- 1) 安部茂樹ら. 日本畜産学会報, 64:1-5, 1993.
- 2) Amann R et al. Biology and Reproduction, 50: 103-110, 1994.
- 3) Carroll J. et al. Journal of Reproduction and Fertility, 90:547-553, 1990.
- 4) Dinnyes A. et al. Cryobiology, 31:569-570, 1994.
- 5) Fuku E. et al. Cryobiology, 29:485-492, 1992.
- 6) Hamano S. et al., Theriogenology, 38:1085-1090, 1992.
- 7) Hochi S. et al., Theriogenology, 49:487-796, 1998.
- 9) Hochi S. et al. Journal of Mammalian Ova Research, 16:19-22, 1999.
- 10) Hochi S. et al., Theriogenology, 52 (3):497-504, 1999.
- 11) Imai K. et al. Theriogenology, 47:347, 1997.
- 12) Kasamo K. et al. Plant Cell Physiology, 33 (5): 609-616, 1992.
- 13) 笠毛邦弘, 研究ジャーナル, 16 (1):7-13, 1993.
- 14) Kim J. et al. Reproduction, 122 (1):131-138, 2001
- 15) Martino A. et al. Molecular Reproduction and Development, 45 (4):503-512, 1996.
- 16) Martino A. et al. Biology and Reproduction, 54:1059-1069, 1996.
- 17) McEvoy T. Journal of Reproduction and Fertility, 118 (1):163-170, 2000.

- 18) Otoi T. et al. Theriogenology, **40**:801–807.1993. Medical Science, **62** (4):465–467, 2000.  
19) Papis K. et al. Theriogenology, **51**:173, 1999. 21) Vajta G. et al. Molecular Reproduction and  
20) Tominaga K. et al., Journal of Veterinary Development, **51**:53–58.1998.