

## ウシ体外受精由来胚盤胞の内細胞塊細胞数の検討

亀山 祐一・丹野 直美・石島 芳郎  
東京農業大学生物産業学部, 網走市 099-24

Cell number of inner cell mass of bovine blastocyst fertilized and cultured *in vitro*

Yuichi KAMEYAMA, Naomi TANNO, Yoshiro ISHIJIMA

Laboratory of Animal Resources, Faculty of Bioindustry,  
Tokyo University of Agriculture 196 Yasaka, Abashiri-shi 099-24

キーワード：ウシ, 体外受精, 胚盤胞, 内細胞塊, 二重蛍光染色法

Key words : bovine, *in vitro* fertilization, blastocyst, inner cell mass, double fluorochrome dye technique

## 要 約

培養方法がウシ体外受精由来胚盤胞の内細胞塊(ICM)の細胞数に及ぼす影響について検討した。培養方法は、A法：1%のウシ胎児血清(FCS)を添加したTCM 199(TCM 199+1%FCS)を用い、卵丘細胞が付着した卵母細胞を単層の卵丘細胞と共培養、B法：TCM 199+1%FCSを用い、卵丘細胞が付着した卵母細胞を微小滴培養、C法：TCM 199+1%FCSを用い、卵母細胞に付着した卵丘細胞を除去した卵母細胞を微小滴培養、D法：A法で18時間培養した後に卵母細胞に付着した卵丘細胞を除去し、この卵母細胞を10%のFCSを添加したSOF(SOF+10%FCS)で微小滴培養、E法：SOF+10%FCSを用い、卵母細胞に付着した卵丘細胞を除去した卵母細胞を微小滴培養、の5法を用いた。培養9日(媒精日を0日とする)までの胚盤胞発生率は、A法：10.4%、B法：8.8%、C法：0%、D法：4.0%、E法：3.4%であった。二重蛍光染色法を用いて培養8日に胚盤胞の内細胞塊(ICM)と栄養外胚葉の細胞数を計測したところ、胚盤胞の平均総細胞数はA法：72.5個、B法：89.0個、D法：54.7個、E法：54.0個であり、平均ICM細胞数(総細胞数に対するICM細胞の割合)はA法：20.1個(27.7%)、B法：28.5個(32.0%)、D法：15.0個(27.4%)、E法：12.3個(24.1%)であった。これら胚盤胞における総細胞数とICMの細胞数は培養方法により有意差はみられたが、総細胞数に対するICMの細胞数の割合には培養方法による有意差がみられなかった。以上の結果より、培養方法はウシ体外受精における胚盤胞発生率と胚盤胞の総細胞数およびICM

細胞数に影響を及ぼすが、胚盤胞の総細胞数に対するICM細胞数の割合には影響を及ぼさないことが示唆された。

## 緒 言

ウシの受精卵移植では胚盤胞の品質が受胎率を左右する重要な要因とされており、胚盤胞の品質は胚の総細胞数と比例することが知られている(岩崎ら; 1990)。一方、完全体外培養系で作出したウシ胚盤胞は、体内で受精して子宮から回収したものおよび体外受精後にウサギ卵管内で培養したものよりも細胞数の少ないことが指摘されており(IWASAKI *et al.*; 1990)、このことが体外受精由来胚盤胞における低受胎率の一因と考えられる。現在までに体外受精由来胚盤胞の総細胞数を計測した報告は多くみられるが(後藤ら; 1992, 梶原ら; 1988, MATSUYAMA *et al.*; 1993)、将来胎児を形成する内細胞塊(ICM)の細胞数を計測した報告はあまりみられない(岩崎ら; 1990, IWASAKI *et al.*; 1990)。そこで、本実験では二重蛍光染色法を用いてウシ体外受精由来胚盤胞におけるICMと栄養外胚葉(TE)の細胞数を計測し、培養方法が胚盤胞におけるICMの細胞数に及ぼす影響について検討した。

## 実験方法

卵母細胞の回収：実験に供試したホルスタイン種の卵巣は、食肉処理場にて採取した。卵母細胞はm-PBS(+) (梶原ら; 1990)を用い、直径2~5mmの卵胞から吸引法で回収した。

体外成熟および体外受精：卵丘細胞が厚く緊密に付着した卵母細胞を用い、梶原ら(1990)の方法で実施した。成熟培養は5%のウシ胎児血清(FCS)を添加したTCM 199を用い、2mlの培地に50~100個の卵

母細胞を入れて21時間行った。体外受精にはホルスタイン種の人工授精用凍結精液を供試した。精子の洗浄、前培養および媒精は、テオフィリン：5mM、ヘパリン：10 $\mu$ g/ml、BSA：2.5mg/mlを添加したm-BO液を用いて行った。融解した精液は300 $\times$ gで2回洗浄し、10 $\times$ 10<sup>6</sup>精子/mlの濃度に調整した。精子の前培養は0.1mlの微小滴で2.5時間行い、媒精はこの微小滴に10~15個の卵を入れて5時間行った。

実験1：媒精の終了した卵子を下記A~E法で9日間培養し、発生を観察した。A法；1%のFCSを添加したTCM 199（以下TCM 199+1%FCS）を用い、卵丘細胞が付着した卵母細胞を2mlの培地に30~100個入れて単層の卵丘細胞と共培養。共培養のディッシュは成熟培養の際に卵丘細胞が付着したディッシュを培地交換して作製し、培養3、5および7日（媒精日を0日とする）に培地交換。B法；TCM 199+1%FCSを用い、卵丘細胞が付着した卵母細胞を0.1mlの微小滴に10~15個入れて培養。C法；TCM 199+1%FCSを用い、卵母細胞に付着した卵丘細胞を除去した卵母細胞を0.1mlの微小滴に10~15個入れて培養。D法；A法で18時間培養し、卵母細胞に付着した卵丘細胞を除去した。次いで10%のFCSを添加したSOF（TERVIT *et al.*；1972、SOF+10%FCS）を用い、卵丘細胞除去卵を0.1mlの微小滴に10~15個入れて培養。E法；SOF+10%FCSを用い、卵母細胞に付着した卵丘細胞を除去した卵母細胞を0.1mlの微小滴に10~15個入れて培養。これら方

法における胚の発生は、培養9日まで観察した。

実験2：実験1で出現した培養8日の初期~拡張胚盤胞を用い、二重蛍光染色法（岩崎ら；1990、IWASAKI *et al.*；1990）でICMとTEの細胞数を計測した。

培養条件：培養は35mmのディッシュ（Falcon, 3001）を用い、温度39 $^{\circ}$ C、炭酸ガス5%、空気95%の条件で行った。

統計処理：すべての実験は5回以上実施した。統計処理は $\chi^2$ 検定法および多重範囲検定法を用いて行った。

### 結果および考察

実験1の結果を表1に示した。2細胞期胚への発生率はB法（70.6%）、A法（55.7%）、D法（19.6%）、E法（17.9%）、C法（10.0%）の順に高く、B法とA、D、EおよびC法、A法とDおよびE法、DおよびE法とC法間に有意差が認められた（ $P<0.05$ ）。8細胞期胚への発生率はB法：56.2%、A法：37.9%、D法：11.6%、E法：9.5%、C法：0%であり、各方法間における統計的有意差の関係は2細胞期胚の段階と変わらなかった。桑実胚への発生率は、B法：25.6%、A法：22.6%、D法：9.5%、E法：7.3%であった。この場合、B法とA法間に有意差はなかったが、BおよびA法とDおよびE法間に有意差が認められた（ $P<0.05$ ）。胚盤胞への発生率はA法（10.4%）、B法（8.8%）、D法（4.0%）、E法（3.4%）の順に高く、AおよびB法とDおよびE法間に有意差が認められ

表1 各培養方法におけるウシ体外受精卵の発生

| 培養方法* | 培養胚数  | 発生胚数 (%)                   |                            |                            |                            |
|-------|-------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|       |       | 2細胞期胚 $\leq$               | 8細胞期胚 $\leq$               | 桑実胚 $\leq$                 | 胚盤胞 $\leq$                 |
| A     | 1,115 | 621 <sup>b</sup><br>(55.7) | 423 <sup>b</sup><br>(37.9) | 253 <sup>a</sup><br>(22.6) | 116 <sup>a</sup><br>(10.4) |
| B     | 160   | 113 <sup>a</sup><br>(70.6) | 90 <sup>a</sup><br>(56.2)  | 41 <sup>a</sup><br>(25.6)  | 14 <sup>a</sup><br>(8.8)   |
| C     | 120   | 12 <sup>d</sup><br>(10.0)  | 0 <sup>d</sup><br>(0)      | 0 <sup>c</sup><br>(0)      | 0 <sup>c</sup><br>(0)      |
| D     | 275   | 54 <sup>c</sup><br>(19.6)  | 32 <sup>c</sup><br>(11.6)  | 25 <sup>b</sup><br>(9.5)   | 11 <sup>b</sup><br>(4.0)   |
| E     | 262   | 47 <sup>c</sup><br>(17.9)  | 25 <sup>c</sup><br>(9.5)   | 19 <sup>b</sup><br>(7.3)   | 9 <sup>b</sup><br>(3.4)    |

\* A：TCM 199+1%FCSを用い、卵丘細胞が付着した卵を単層の卵丘細胞と共培養、B：TCM 199+1%FCSを用い、卵丘細胞が付着した卵を微小滴培養、C：TCM 199+1%FCSを用い、卵自身に付着した卵丘細胞を除去した卵を微小滴培養、D：Aの方法で18時間培養した後に卵自身に付着した卵丘細胞を除去し、この卵をSOF+10%FCSで微小滴培養、E：SOF+10%FCSを用い、卵自身に付着した卵丘細胞を除去した卵を微小滴培養。すべての方法における培養期間は9日（媒精日を0日とする）までとした。

\*\* 異符号間で有意差あり（ $P<0.05$ ）

表2 ウシ体外受精由来胚盤胞を構成する細胞数の内訳に及ぼす培養方法の影響

| 培養方法* | 計測胚数<br>/供試胚数<br>(%) | 胚盤胞を構成する細胞数の内訳** (平均±S.E.)           |                         |                            |
|-------|----------------------|--------------------------------------|-------------------------|----------------------------|
|       |                      | ICM (%)                              | TE (%)                  | 合計 (%)                     |
| A     | 25/32<br>(78.1)      | 20.1<br>±1.57 <sup>b</sup><br>(27.7) | 51.8<br>±3.19<br>(71.4) | 72.5<br>±4.46 <sup>b</sup> |
| B     | 11/14<br>(78.6)      | 28.5<br>±1.01 <sup>a</sup><br>(32.0) | 60.5<br>±1.89<br>(67.9) | 89.0<br>±1.74 <sup>a</sup> |
| D     | 9/11<br>(81.8)       | 15.0<br>±1.11 <sup>c</sup><br>(27.4) | 39.6<br>±3.73<br>(72.4) | 54.7<br>±3.86 <sup>c</sup> |
| E     | 6/9<br>(66.7)        | 12.3<br>±0.21 <sup>c</sup><br>(24.1) | 42.0<br>±3.19<br>(82.4) | 51.0<br>±2.80 <sup>c</sup> |

\* A: TCM 199+1%FCS を用い、卵丘細胞が付着した卵を単層の卵丘細胞と共培養, B: TCM 199+1%FCS を用い、卵丘細胞が付着した卵を微小滴培養, C: TCM 199+1%FCS を用い、卵自身に付着した卵丘細胞を除去した卵を微小滴培養, D: Aの方法で18時間培養した後に卵自身に付着した卵丘細胞を除去し、この卵をSOF+10%FCSで微小滴培養, E: SOF+10%FCSを用い、卵自身に付着した卵丘細胞を除去した卵を微小滴培養。すべての方法における培養期間は、9日(媒精日を0日とする)までとした。

\*\* ICM: 内細胞塊, TE: 栄養外胚葉

\*\*\* 異符号間で有意差あり (P<0.05)

た (P<0.05)。

今回用いたA~Eの培養方法は、培養液、FCSの濃度、培地交換などの条件が統一されていないため、すべての発生率の差を詳細に論じることはできない。しかし、B法とC法間の発生率の差は卵丘細胞の有無に起因するものであり、培養液としてTCM 199+1%FCSを用いた場合は卵丘細胞の有無がウシ体外受精卵の発生に影響を及ぼすことが示された。

実験2の結果を表2に示した。供試胚に対する計測可能な胚の割合は、66.7~81.8%であった。計測不能な胚は操作中に胚が崩壊したもの、観察時に細胞の境界が不明瞭なもの、および分染できなかったものであり、これらの胚は割球の一部もしくは胚全体が変性しつつあると思われた。胚盤胞の平均総細胞数はA法: 72.5±4.46個, B法: 89.0±1.74個, D法: 54.7±3.86個, E法: 51.0±2.80個であり、B法とA, DおよびE法, A法とDおよびE法の間有意差が認められた (P<0.05)。ICMの平均細胞数はA法: 20.1±1.57個, B法: 28.5±1.01個, D法: 15.0±1.11個, E法: 12.3±0.21個であり、各方法間における統計的有意差の関係は総細胞数と同じであった。また、胚盤胞の総細胞数に対するICM細胞の割合はA法: 27.7%, B法: 32.0%, D法: 27.4%, E法: 24.1%であり、培養方法による差は認められなかった。

本実験のAおよびB法で得られた胚盤胞の総細胞数は、1~5%のFCSを添加したTCM 199を用いて単

層の卵丘細胞上で体外受精卵を8~10日間共培養した報告(梶原ら;1988, 初期胚盤胞:68個, 拡張胚盤胞:100個), 2.5~10%のウシ血清を添加したTCM 199を用いて単層の卵丘細胞上で体外受精卵を8日間共培養した報告(後藤ら;1992, 胚盤胞:69個, 拡張胚盤胞:115個)とほぼ一致した。しかし、DおよびE法で得られた胚盤胞の総細胞数は10%のヒト血清を添加したSOFを用いて体外受精卵を8日間培養した報告(MATSUYAMA *et al.*;1993, 拡張胚盤胞:117個)よりも低値を示した。また、IWASAKIら(1990)は10%のFCSを添加したTCM 199を用いて単層の卵丘細胞上で体外受精卵を8~12日間共培養し、初期胚盤胞の総細胞数:44個, ICM細胞数(総細胞数に対するICM細胞の割合):8個(16%), 拡張胚盤胞の総細胞数:77個, ICM細胞数(総細胞数に対するICM細胞の割合):11個(15%)の成績を得ている。本実験のAおよびB法で得られた胚盤胞の結果はこの報告と胚盤胞の総細胞数でほぼ一致したが、ICM細胞数と総細胞数に対するICM細胞の割合で高値を示した。ウシ体外受精由来胚盤胞における総細胞数に対するICM細胞の割合は発育が進むにつれて低下するとされている(岩崎ら;1990)ことから、本実験では培養8日の胚盤胞を用いたために総細胞数に対するICM細胞の割合が高かったと考えられた。

以上の結果より、培養方法はウシ体外受精における胚盤胞発生率と胚盤胞の総細胞数およびICM細胞数

に影響を及ぼすが、胚盤胞の総細胞数に対する ICM 細胞数の割合には影響を及ぼさないことが示唆された。

### 謝 辞

本研究の遂行にあたり、卵巣採取にご協力いただいた北見畜産公社ならびに北海道網走保健所東藻琴食肉検査事務所、凍結精液を分与していただいた北海道家畜改良事業団北見事業所の関係各位に深謝いたします。

### 文 献

後藤和文・岩井規子・市川恭子・石原亜子・宅萬義弘・元石睦郎・徳丸元幸・中西善彦, (1992) ウシ体外受精由来初期胚の体外培養. *J. Reprod. Dev.*, **38**: j165-j171.

岩崎説雄・吉田 豊・渡辺誠喜・中原達夫, (1990) 二重蛍光染色法による体外受精由来牛胚盤胞の栄養外胚葉と内細胞塊の分別染色と細胞数の計測. *家畜繁殖誌*, **36**: 60-65.

IWASAKI, S., N. YOSHIDA, H. USHIJIMA, S. WATANABE and T. NAKAHARA, (1990) Morphology and proportion of inner cell mass of blastocysts fertilized *in vitro* and *in vivo*. *J. Reprod. Fert.*, **90**: 279-284.

梶原 豊・後藤和文・徳丸元幸・木庭正光・中西善彦・小川清彦, (1988) ウシ卵胞卵子の体外成熟・体外受精により得られた胚盤胞の割球数と染色体分析. *家畜繁殖誌*, **34**: 191-198.

梶原 豊・米谷尚子・菱山和洋, (1990) 最新バイオテクノロジー全書 家畜の繁殖と育種 (体外受精技術の項執筆, 最新バイオテクノロジー全書編集委員会編), 第1版, 168-183, 農業図書, 東京.

MATSUYAMA, K., H. MIYOSHI and Y. FUKUI, (1993) Effect of glucose levels during the *in vitro* culture in synthetic oviductal fluid medium on *in vitro* development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, **40**: 595-605.

TERVIT, H. R., D. G. WHITTINGHAM and L. E. A. ROWSON, (1972) Successful culture of *in vitro* of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fert.*, **30**: 493-497.