

研究ノート

体外成熟培地および体外発生培地へのシステアミン添加が
ウシ初期胚の体外発生に及ぼす影響

長友 啓明・川原 学*

北海道大学大学院農学研究院

〒060-8589 札幌市北区北9条西9丁目

*連絡著者 (Corresponding author) : k-hara@anim.agr.hokudai.ac.jp

Cysteamine supplementation in in vitro maturation medium, in vitro culture
medium or both media promotes the development of bovine embryosHiroaki NAGATOMO¹, Manabu KAWAHARA¹¹Laboratory of Animal Breeding and Reproduction, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University

連絡先 (Corresponding author) : k-hara@anim.agr.hokudai.ac.jp

キーワード : ウシ、初期胚、胚盤胞期胚、システアミン

Key words : bovine, embryo, blastocyst, cysteamine

要約

ウシ卵母細胞および初期胚の培養時に受ける酸化ストレスは、胚盤胞期までの発生能力に大きな影響を及ぼすことが知られている。そこで、還元剤システアミンを体外成熟培地 (IVM) および体外発生培地 (IVC) への添加による、ウシ胚の体外での発生能力に及ぼす影響について調べた。IVM培地のみ5、50 μ Mシステアミンを添加した際、胚盤胞期胚への発生率に有意差はみられなかった。また、IVM/IVC双方の培地にシステアミンを5 μ M添加することで、胚盤胞期胚への発生率が無添加区と比較して有意に増加した。また、作出した胚盤胞期胚の内部細胞塊 (ICM) と栄養外胚葉 (TE) の細胞数を計測し、全細胞数 (TCN) との比率を調べたところ、システアミンをIVM培地のみ、および、IVM/IVC両培地に添加した場合、ICM/TCN比率が33.1%および33.6%となり、無添加区と比較して有意に高くなった。以上の結果から、IVM/IVC間の両培地に5 μ Mのシステアミンを添加することにより、酸化ストレスを防御してICM細胞数の割合が高いウシ胚盤胞期胚を効率よく作出できる可能性が示唆された。

緒言

ウシ胚盤胞期胚を体外培養により作出するためには、食肉処理場由来の未成熟卵母細胞を採取し体外成熟培養 (*in vitro* maturation ; IVM)、体外受精 (*in vitro* fertilization ; IVF)、体外発生培養 (*in vitro* culture ; IVC) の過程が必要である。通常、受精卵移植は受精後約7.5日の着床前期の胚盤胞期まで発生した初期胚が使用される。ウシの育種改良や効率的増産のためにこれら繁殖技術は重要となっている。また、ヒトの不妊治療の研究分野においてもウシ卵母細胞や初期胚が研究材料として頻繁に用いられ、畜産分野のみならず様々な研究分野においてウシ初期胚の体外生産系は必要不可欠な基盤技術となっている。

哺乳類胚の培養時において、酸素由来フリーラジカルが関わる酸化還元環境の胚発生に及ぼす作用が注目されている (Goto *et al.*, 1993)。哺乳類胚を培養する際に、生体内の気相に近い低酸素 (約5%) で行くと、通常用いられる約20%酸素濃度培養条件と比較して発生率の向上が、多くの哺乳動物胚で報告されている (McKiernan *et al.*, 1990, Jianming *et al.*, 1993)。また、マウスの体外発生胚で、細胞内過酸化水素量の増加が高酸素濃度条件下でみられることや、活性酸素除去酵素や還元物質の添加が胚発生に有効であることも報告されている (Noda *et al.*, 1991)。このような活性酸素等

の酸化ストレス物質は反応性の高いフリーラジカルを生じ、細胞のタンパク質や核酸に直接、間接的な障害を与えることが知られている (Mello *et al.*, 1984, Liu *et al.*, 2000)。

これらの酸化ストレスによる胚発生への悪影響を除去するため、IVM培地への還元作用を持つ低分子チオールの添加が胚発生を促進させる手段として、有効である (Matos *et al.*, 1996)。低分子チオールの添加は、高酸素培養条件下でも低酸素条件下での発生率に匹敵する発生率の向上効果を示すことが認められている (Oyamada *et al.*, 2004)。また、6-8細胞期胚でIVC培地に低分子チオールを添加することで、発生が改善される (Takahashi *et al.*, 1993)。β-メルカプトエタノール (β-ME) の培地中への添加によりウシ胚発生成績の向上が報告されているが、β-MEは劇毒物指定物質であることと、化学的に不安定であることから胚発生への影響も懸念される。一方、β-MEより化学的に安定しており、保存が容易で、取り扱いも簡便なシステアミンをIVM培地に添加することで発生率が改善されたことが報告されている (Balasubramanian *et al.*, 2007)。本研究では、初期胚の発生成績に大きく関与する酸化ストレスに注目して、還元剤であるシステアミンの培地への添加時期について検討し、ウシ初期胚発生に及ぼす影響について調べた。

材料および方法

体外受精胚の作出は、阿部らの方法に基づいて行った (Abe *et al.*, 2005)。

未成熟卵母細胞の採取と体外成熟培養 (*in vitro* maturation ; IVM)

食肉処理場由来のウシ卵巣 (黒毛和種) は、0.85%生理食塩水入り水筒に入れ4℃を保ち30分以内に研究室に持ち帰った。なお、4℃は卵巣保存として一般的ではないが、卵巣の低温保存は体外受精成績に影響がないとの報告がある (Lucci *et al.*, 2004)。卵巣は室温の0.85%生理食塩水で数回洗浄後、18G注射針 (TERUMO, Tokyo, Japan) 付10ml注射筒 (TERUMO) で直径約2~8mmの卵胞から卵丘細胞-卵母細胞複合体 (COCs) を卵胞液と共に吸引採取した。卵丘細胞が3層以上密着したCOCsを選別し、インキュベータ内 (5%CO₂, 38.5℃、湿度100%) で6時間以上平衡化したIVM培地 (5%FBS添加NaHCO₃-buffered TCM199) で3回洗浄後、5%CO₂, 38.5℃、湿度100%の条件下で22時間培養した。

体外受精 (*in vitro* fertilization ; IVF)

凍結ストロー精液 (黒毛和種) 0.2ml/本を37℃の温水で融解し、ストローを切断後に15ml遠沈管に精液を取り出した。0.45mg/mlテオフィリン (和光純薬) 添加BO液 (Brackett and Oliphant, 1975) を10ml加え700G、8分間で遠心した。上清を除去し、この操作を再度繰り返した。上清除去後BO液を加え510μlにし1.5mlチューブ (Watson, Tokyo, Japan) に移した。精子数測定後、精子濃度を10×10⁶/mlに調整した。35mmディッシュにBSA添加BO液50μlの微小滴を作製し、濃度調整した精子懸濁BO液50μlを加え、終濃度を5×10⁶/mlにした。流動パラフィンで覆ったIVF培地の各微小滴にIVM後のCOCsを10-20個ずつ入れた。5%CO₂, 38.5℃、湿度100%の条件下で18時間媒精した。

体外発生培養 (*in vitro* culture ; IVC)

18時間媒精後、BSA添加mSOFai培地 (Abe *et al.*, 2005) に移し、内径120μm程度に加工したガラスピペットを用いてCOCsをピペッティングすることにより卵丘細胞を除去した。除去後、mSOFai IVC培地で3回洗浄し、体外培養に供した。100μlの微小滴あたり20個の受精卵とした。5%CO₂, 38.5℃、湿度100%の条件下で培養し、培養開始2日目で分割率および8日目で胚盤胞期胚への発生率を調べた。

システアミンの添加濃度の決定

システアミン ((β-メルカプトエチルアミン) SIGMA ALDRICH, INC., Spruce Street, St.Louis) をIVM培地、IVC培地、あるいは両者の培地に添加した場合のウシ体外受精胚の発生率への影響を調べるため、システアミンをIVM培地では0、5、50μMとなるように添加し、培養2日目で卵割率および8日目で胚盤胞期胚の発生率を検討した。さらに、IVC培地にも5μMのシステアミンを添加し、IVM培地およびIVC培地それぞれにシステアミン添加および無添加の試験区を設けた。また、IVM培地のシステアミン濃度を5μMの一定条件とし、IVC培地に0、5、10、20、50、100μMシステアミンを添加し、同様に発生率を調べた。

胚盤胞期胚二重染色

IVM培地およびIVC培地それぞれにシステアミン添加および無添加の試験区から得られた胚盤胞期胚を二重染色し、内部細胞塊 (ICM)、栄養外胚葉 (TE)、および、全細胞数 (TCN) の細胞数を調べた。二重染色は

Thouasらの方法に従った(Thouas *et al.*, 2001)。0.2% TritonX-100 (和光純薬工業、Osaka, Japan) 添加PBS (-)300 μ l中にプロピジウムアイオダイド (PI) SIGMA) 0.1mg/mlとなるように調整した。また、99.5% エタノール (和光純薬) に25 μ g/ml濃度でHoechst33342 (SIGMA)を希釈した溶液を300 μ l用意した。これらのPI溶液Hoechst溶液を300 μ lずつ4-well ディッシュ (Thermo Fisher Scientific K.K., Kanagawa, Japan) に分注した。胚盤胞期胚を60秒間PI溶液に入れ、顕微鏡下で、表面の細胞がわずかに縮小したことを観察した後、直ちにHoechst溶液に移してパラフィルムでディッシュを密封し、遮光して2時間程度4°Cで保存した。染色後胚盤胞をグリセリンで洗浄しグリセリンとともにスライドガラスに移しカバーガラスで封入した。蛍光顕微鏡 (Leica Microsystems, Tokyo, Japan) で観察し、青色のICM、赤色のTEそれぞれの細胞数を測定した。

統計解析

得られたデータは統計解析用ソフトウェア STATVIEW (Abacus concepts.INC., Berkeley, CA.) を用い、分散分析を行った。また、各値間の有意差の検定は、FisherのPLSDtestによって行った。

結果および考察

抗酸化剤の一種であるシステアミンを体外成熟 (IVM) 培地に0、5、50 μ Mで添加して得た成熟卵子を体外受精後、胚盤胞期までの発生率を調べた(図1)。卵割率、胚盤胞期胚の発生率を比べると5 μ M添加区においてわずかに高かったが、有意差はみられなかった。このことから、IVM培地へのシステアミン添加は卵割率、胚盤胞形成率にそれほど大きな影響を与えないと考えられた。これまでの研究では、IVM培地にシステアミンを100 μ M添加すると胚盤胞形成率が有意

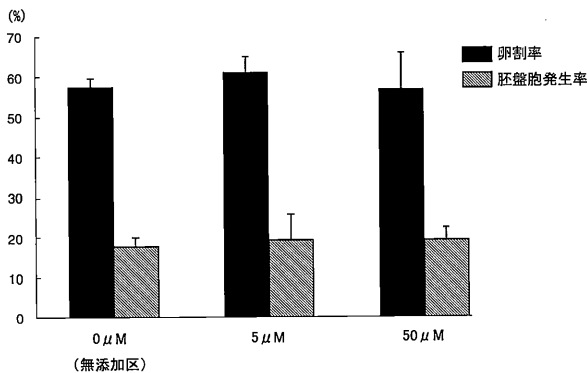


図1 卵母細胞の体外成熟培地へのシステアミン添加 (0, 5, および50 μ M) が胚発生に及ぼす影響

に高くなるという報告がある (Matos *et al.*, 2002)。しかし一方で、システアミンの添加は体外培養に影響はなく、むしろ過剰な添加は胚発生に悪影響を及ぼすとの報告もある (Guyader *et al.*, 1998)。IVM培地へのシステアミン濃度は添加血清の濃度や成熟培養液への添加緩衝剤の種類等、培養環境によって、より慎重な検討が必要であると考えられる。

図1の結果から、システアミンをIVM培地に添加しても胚盤胞期胚への発生率には影響がみられなかった。そこで、胚盤胞期胚の細胞数について、二重染色によって内部細胞塊 (ICM) の細胞数を調べ、全細胞数 (TCN) との割合 (ICM/TCN) を比較した。試験区に、5 μ Mシステアミンを、IVM培地のみ、体外発生 (IVC) 培地のみ、IVM/IVC双方の培地に添加した3区画を設けた。また対照区にシステアミン無添加区を設け、全4試験区の体外培養により作出した胚盤胞期胚を二重染色に供した結果、IVM培地に5 μ M添加した場合、TCNは無添加区と変化はなかったが、ICMの割合が無添加区の29.52%に対し33.15%と有意に増加した (表1および図2)。また、IVCのみのシステアミン添加区では、TCN、ICMの割合において無添加区と比べて有意差はみられなかった。さらに、IVMとIVCに両培地に添加すると、TCN、ICMの数は無添加区と比較して有

表1 卵母細胞体外成熟培地および初期胚発生培地におけるシステアミン添加が胚盤胞期胚の内部細胞塊、栄養外胚葉および全細胞数に及ぼす影響

システアミン IVM-IVC (μ M)	供試卵数	TCN \pm S.E.	ICM \pm S.E.	TE \pm S.E.	ICM/TCN(%) \pm S.E.
0-0	15	122.67 \pm 6.1 ^a	36.20 \pm 2.3 ^a	86.47 \pm 4.5 ^a	29.52 \pm 0.93 ^a
5-0	13	125.77 \pm 3.2 ^a	41.69 \pm 1.2 ^a	84.08 \pm 2.3 ^a	33.15 \pm 0.52 ^b
0-5	15	133.00 \pm 3.9 ^a	42.33 \pm 2.1 ^a	90.67 \pm 2.1 ^a	31.83 \pm 0.73 ^{ab}
5-5	20	156.10 \pm 3.0 ^b	52.20 \pm 1.1 ^b	103.90 \pm 2.3 ^b	33.62 \pm 0.55 ^b

TCN: 全細胞数 ICM: 内部細胞塊 TE: 栄養外胚葉
P<0.01 異符号間で有意差あり

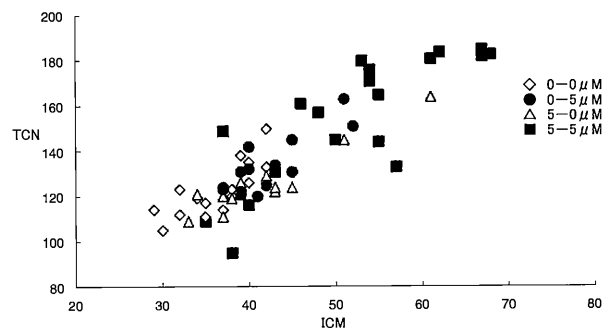


図2 体外成熟培地および体外発生培地においてシステアミン添加/無添加の場合の胚盤胞内部細胞塊・全細胞数の分布

■;IVMにおいて5 μ M、IVCで5 μ M添加した胚盤胞期胚 (5-5 μ M)、同様に◇;0-0 μ M、△;5-0 μ M、●;0-5 μ M添加した。TCNは全細胞数、ICMは内部細胞塊の細胞数を示す。各処理区におけるTCNとICMの最大値および最小値はそれぞれ、◇ (TCN:150-105、ICM:42-29)、● (TCN:163-120、ICM:52-37)、△ (TCN:164-109、ICM:61-33)、■ (TCN:185-95、ICM:68-37) であった。

意差に増加した ($P < 0.01$)。一般に、ICMの割合が高い胚盤胞期胚は、その後の発生能力も高い傾向があり初期胚の細胞数は胚の品質の指標となる (Sugimura *et al.*, 2010)。以上のことから、IVM培地へのシステアミン添加処理は胚盤胞期胚のICMの割合を向上させ、IVC培地へのシステアミン添加処理は胚盤胞期胚の全細胞数を増加させる傾向がみられた。さらに、IVMおよびIVCの両培地にシステアミンを添加することによってICM細胞数および全細胞数を共に増加させることが判明した。

最後に、IVM培地のシステアミン添加濃度を $5 \mu\text{M}$ に固定し、IVC培地に $0, 5, 10, 20, 50, 100 \mu\text{M}$ で添加し、胚盤胞期までの発生率を比較した (図3)。実験の結果、卵割率に処理区間で有意差はみられなかったが、胚盤胞期胚への発生率は $5 \mu\text{M}$ で 21.9% 、 $10 \mu\text{M}$ で 18.4% となり、他の処理区と比較して有意に高い値を示した ($P < 0.05$)。そのため、本研究の培養系におけるIVC培地に添加するシステアミンの至適濃度は $5 \mu\text{M}$ と推測された。他のグループの研究では、システアミンのIVC培地への添加濃度を $50 \mu\text{M}$ にすることで胚盤胞形成率が向上すると報告されている (Takahashi *et al.*, 1993)。しかし、用いたIVC培地が高橋らと異なること、および、本研究ではIVM培地へもシステアミンを添加していることなど培養条件の違いにより結果が異なったものと考えられる。今後、培地の種類およびIVM培地へのシステアミン濃度との関連を考慮しながら、IVM/IVC双方の培地における至適システアミン濃度を決定する必要がある。

本研究において、IVM培地へのシステアミン添加により、胚盤胞期胚のICM細胞数の割合が高まり、胚の品質が向上することが判明した。マウスにおいても卵子の成熟から受精の間に活性酸素の急激な増加がみられ、これが原因となって酸化ストレスが胚の発生率を低下させることが知られている (Nasr *et al.*, 1991)。さらに、IVMの期間に酸化ストレスを減少させると卵母

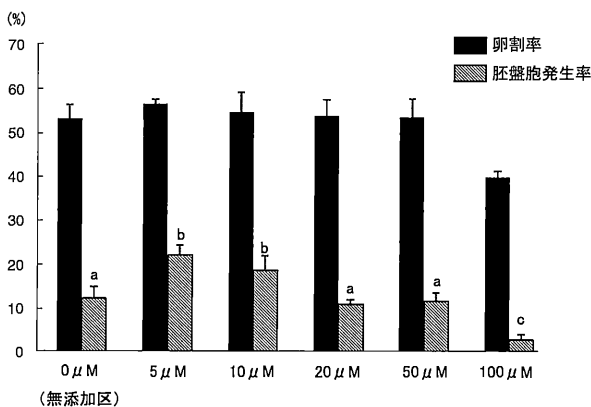


図3 初期胚体外発生培地へのシステアミン添加 ($0, 5, 10, 20, 50$, および $100 \mu\text{M}$) が胚発生率に及ぼす影響 ($P < 0.05$ 異符号間で有意差あり)

細胞の細胞質成熟を改善できたとの報告もされている (Tatemoto *et al.*, 2004)。これらのことから、IVM培地にシステアミンを添加することで卵母細胞の酸化ストレスが緩和され、十分に細胞質の成熟が進み、結果としてICMの割合を向上させたと考えられる。また、IVC培地へのシステアミン添加処理は胚盤胞期胚の全細胞数を増加させる傾向がみられた。これはシステアミンの取り込みにより、初期胚が酸化ストレスより防御され、割球の正常な有糸分裂が促進された結果と推測される (Bergelson *et al.*, 1994)。以上の結果からIVMおよびIVC双方の培地へのシステアミン添加処理は、ウシ体外受精後の胚盤胞期胚までの体外発生率の向上に効果があるものと考えられる。

謝辞

ウシ凍結精液を御提供頂いた、佐賀県畜産試験場の職員の方々および、ウシ卵巣の採取にあたり、御協力頂いた佐賀県畜産公社の職員の方々に心より御礼申し上げます。

参考文献

- ABE, Y., K. HARA, H. MATSUMOTO, J. KOBAYASHI, H. SASADA, H. EK WALL, H. RODRIGUEZ and E. SATO (2005) Feasibility of a nylon-mesh holder for vitrification of bovine germinal vesicle oocytes in subsequent production of viable blastocysts. *Biol.Reprod.*, 72:1416-1420.
- BALASUBRAMANIAN, S. and G-J. RHO (2007) Effect of cysteamine supplementation of in vitro matured bovine oocytes on chilling sensitivity and development of embryos. *Anim.Reprod.Sci.*, 98:282-292.
- BERGELSON, S., R. PINKUS and V. DANIEL (1994) Intracellular glutathione levels regulate Fos/Jun induction and activation of glutathione S-transferase gene expression. *Cancer.Res.*, 54:36-40.
- GOTO, Y., Y. NODA, T. MORI and M. NAKANO (1993) Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. *FreeRadic.Biol.Med.*, 15:69-75.
- GUYADER-JOLY, C., P. GUÉRIN, J.P. RENARD, J. GUILLAUD, S. PONCHON and Y. MÉNÉZO (1998) Precursors of taurine in female genital tract: effects on developmental capacity of bovine embryo produced in vitro. *Amino.Acids.*, 15:27-42.
- LI, J. and R.H. FOOTE (1993) Culture of rabbit zygotes into blastocysts in protein-free medium with one to twenty per cent oxygen. *J.Reprod.Fertil.*, 98:163-167.
- LIU, L., J.R. TRIMARCHI and D.L. KEEFE (2000)

- Involvement of mitochondria in oxidative stress-induced cell death in mouse zygotes. *Biol.Reprod.*, **62**:1745-1753.
- LUCI, C.M., M.A. KACINSKIS, L.H. LOPES, R. RUMPF and S.N. BÃO (2004) Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. *Theriogenology.*, **61**:1101-1114.
- MATOS, D.G., C.C. FURNUS, D.F. MOSES, A.G. MARTINEZ and M. MATKOVIC (1996) Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Mol.Reprod.Dev.*, **45**:451-457.
- MATOS, D.G., C. HERRERA, R. CORTVRINDT, J. SMITZ, A. VAN SOOM, D. NOGUEIRA and R.S. PASQUALINI (2002) Cysteamine supplementation during in vitro maturation and embryo culture: a useful tool for increasing the efficiency of bovine in vitro embryo production. *Mol.Reprod. Dev.*, **62**:203-209.
- MCKIERNAN, S.H. and B.D BAVISTER (1990) Environmental variables influencing in vitro development of hamster 2-cell embryos to the blastocyst stage. *Biol.Reprod.*, **43**:404-413.
- MELLO FILHO, AC., M.E. HOFFMANN and R. GHINI (1984) Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Biochem.J.*, **218**:273-275.
- NASR-ESFAHANI, M.M. and M.H. JOHNSON (1991) The origin of reactive oxygen species in mouse embryos cultured in vitro. *Development.*, **113**:551-560.
- NODA, Y., H. MATSUMOTO, Y. UMAOKA, K. TATSUMI, J. KISHI and T. MORI (1991) Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block. *Mol.Reprod.Dev.*, **28**:356-360.
- OYAMADA, T. and Y. FUKUI (2004) Oxygen tension and medium supplements for in vitro maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined medium. *J.Reprod.Dev.*, **50**:107-117.
- SUGIMURA, S., T. AKAI, S. TAMA'S, M. HIRAYAMA, Y. AIKAWA, M. OHTAKE, H. HATTORI, S. KOBAYASHI, Y. HASHIYADA, K. KONISHI, and K. IMAI (2010) Time-Lapse Cinematography-Compatible Polystyrene-Based Microwell Culture System: A Novel Tool for Tracking the Development of Individual Bovine Embryos. *Biol.Reprod.*, **83**:970-978.
- THOUAS, G.A., N.A. KORFIATIS, A.J FRENCH, G.M. JONES and A.O. TROUNSON (2001) Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. *Reprod.Biomed.*, **3**:25-29.
- TAKAHASHI, M., T. NAGAI, S. HAMANO, M. KUWAYAMA, N. OKAMURA and A. OKANO (1993) Effect of thiol compounds on in vitro development and intracellular glutathione content of bovine embryos. *Biol.Reprod.*, **49**:228-232.
- TATEMOTO, H., N. MUTO, I. SUNAGAWA, A. SHINJO, T. NAKADA (2004) Protection of porcine oocytes against cell damage caused by oxidative stress during in vitro maturation: role of superoxide dismutase activity in porcine follicular fluid. *Biol.Reprod.*, **71**:1150-1157.

