

発生培養中の酸素濃度およびリノール酸アルブミンがウシ 体外受精由来胚の凍結・融解後の生存性に及ぼす影響

家田 祥子・堂 地 修・藤 澤 泰 之
張 山 綾 子・小 山 久 一

Effect of oxygen concentration in the gas atmosphere and linoleic acid-albumin (LAA) in the developmental culture medium on the viability of frozen-thawed in vitro-produced bovine embryos

Shoko IEDA, Osamu DOCHI, Yasuyuki FUZISAWA,
Ayako HARIYAMA and Hisaichi KOYAMA
(June 2000)

緒 言

近年、ウシの体外受精技術は急速に進展し、食肉処理場由来の卵巣から採取した卵子の体外受精によって胚が多数生産され、肥育素牛生産や育種改良への利用が進んでいる。体外受精技術に関する研究は、培養法に関する検討が盛んに行われ、その結果、飛躍的な発生率の改善がみられるようになってきた^{8,11,13}。今後は、胚の生産は食肉処理場由来の卵巣から採取した卵子に限らず、生体の卵巣から採取した卵子を用いた胚の生産^{9,9}が増加すると予想される。

体外受精由来胚の広域流通を図り、肥育素牛生産や育種改良へ積極的に利用するためには、胚の凍結保存技術の確立が重要な要因の一つである。しかし、体外受精によって生産される胚の凍結・融解後の生存性（耐凍性）は、体内受精由来胚に比べて低いことが報告されている^{7,10}。また、体外受精由来胚の耐凍性には培養液の組成が影響することも報告されている^{12,16}。今井らは、発生培養液にリノール酸アルブミン（LAA）を添加することにより、得られた胚盤胞の耐凍性が改善されることを報告した⁶。また、発生培養中の酸素濃度が低くすると、細胞数の多い高品質の胚盤胞が得られることも報告されている¹⁴。そこで、本実験ではウシ体外受精由来胚の凍結・融解後の生存性の向上を目的として、発生培養中の酸素濃度が胚発生率および得られた胚盤胞の耐凍性に及ぼす影響について検討した。さらに、低酸素濃度条件下での発生培養液へのLAA添加が胚盤胞の耐凍性に及ぼす影響についても検討した。

材料および方法

1. 卵子の採取

食肉処理場より採取したウシ卵巣を0.1 mg/ml 硫酸カナマイシンを添加した滅菌生理食塩水に入れ、約26℃に保温し4時間以内に実験室に持ち帰った。卵巣は同生理食塩水で数回洗浄した後、滅菌した紙タオルで表面の水分を除去した。未成熟卵子の吸引採取には、3%ウシ血清（CS）を添加した修正ダルベッコリン酸緩衝液（PBS）を用いた。未成熟卵子は18 G注射針を装着した5 ml シリンジに3%CS加PBSを1~2 ml 吸引して、直径3~5 mmの卵胞より吸引採取した。採取した卵子は3%CS加PBSで5回、0.02 AU/ml 卵胞刺激ホルモン（FSH；アントリン、デンカ製薬）と5%CSを添加したヘペス緩衝TCM-199液で3回洗浄した。卵丘細胞が透明帯の周りに緊密に3層以上付着しているものを成熟培養に用いた。

2. 体外成熟培養

成熟培養液は、FSHおよび5%CSを添加したヘペス緩衝TCM-199を用いた。卵子は成熟培養液で洗浄し、流動パラフィンで覆った100 μlのドロップに20~25個を入れて培養した。培養は、38.5℃、5%CO₂、95%空気の湿度飽和気相条件下で21~24時間培養した。

3. 体外受精

成熟培養を終了した卵子は、1頭の雄牛ウシの凍結精液を用いて体外受精を行った。体外受精は、ま

ず精子洗浄のために、Takahashi *et al.*¹⁴⁾の方法に準じ、90%パーコール溶液 2 ml および 45%パーコール溶液 2 ml を 15 ml 容量のプラスチック遠沈管に重層し、ついで 37°C の温水に 30 秒間浸漬して融解した凍結精液を、45%パーコール溶液の上に重層し、2,000 rpm で 20 分間遠心分離を行った後、上清を吸引・除去した。ついで、Brackett and Oliphant¹⁾に準じて BO 液を作製し、遠心分離後の精子濃度に 10 mM ヒポタウリン添加 BO 液を 6 ml 加えて、再び 1,800 rpm で 5 分間遠心分離を行い上清を除去した。洗浄後の精子は、最初に 10 mM ヒポタウリン添加 BO 液で精子数 1×10^7 /ml に調整し、次に 0.02 g/ml ウシ血清アルブミン添加 BO 液で最終精子数を 5×10^6 /ml に調整した。精子浮遊液を用いて 100 μ l 滴下し、流動パラフィンで覆いドロップを作製した。このドロップに成熟卵子 20~25 個を移し、体外成熟と同条件で 18 時間媒精した。

4. 発生培養

実験 1 では酸素濃度を 5 および 20% に調整した気相中で発生培養を行い、酸素濃度の違いが胚発生および得られた胚盤胞の耐凍性に及ぼす影響について調べた。発生培養液には 5%CS 加 CR1aa¹⁾を用いた。媒精を終了した卵子は、5%CS 加 CR1aa とともに 15 ml 遠沈管に移し、ボルテックスを 90 秒間かけ卵丘細胞を完全に剝離させ、5%CS 加 CR1aa で 3 回洗浄した。洗浄した卵子は、50 μ l の 5%CS 加 CR1aa ドロップに 20 個ずつ入れて培養した。培養は、38.5°C、5%CO₂、5%O₂ および 38.5°C、5%CO₂、20%O₂ の 2 種類の気相条件で行った。実験 2 では発生培養液への LAA の添加が発生率や胚盤胞の耐凍性に及ぼす影響について調べた。発生培養液は、0.25 mg/ml LAA を添加した 5%CS 加 CR1aa と対照区として LAA 無添加 5%CS 加 CR1aa を用いた。実験 1 と同じ方法で媒精終了後の卵子より卵丘細胞を剝離および洗浄し、50 μ l のドロップに 20 個ずつ入れて培養した。培養は、38.5°C、5%CO₂、5%O₂ の気相条件で行った。

実験 1 および 2 の発生培養は 9 日間 (媒精日を 0 日) 行い、2 日目に倒立顕微鏡下で観察し、2 細胞期、3~4 細胞期、5 細胞期以上および未受精卵に分類し、また 7 および 8 日目には胚盤胞を調査した。

5. 胚の凍結保存および融解法

胚盤胞の凍結は、Dochi *et al.*²⁾を修正して行った。すなわち、20%CS 添加 PBS を基本液として 1.5 M エチレングリコール (EG) と 0.1 M ショ糖 (SUC)

を加えて凍結媒液を作製した。胚盤胞は、一段階で凍結媒液に移し、直ちに 0.25 ml のプラスチックストロー (ストロー) に吸引し、室温下 (25°C) で 10~20 分間平衡した。ついで、ストローは -7°C に設定したプログラムフリーザーのアルコール液槽に直接移し、約 5 分後に植氷を行った。さらに同温度で 10 分間保持した後、-30°C まで 0.3°C/分の速度で冷却し液体窒素に投入して凍結した。凍結した胚は、液体窒素からストローを取り出し空気中に 6 秒間保持したのち、30°C の水に移して融解した。融解した胚は、0.1 mM β -メルカプトエタノールおよび 5%CS を添加した CR1aa を用い、38.5°C、5%CO₂、5%O₂ の気相下で 48 時間培養した。凍結・融解後の胚の生存性は、培養 0 時間目では変性細胞がなく色調が明るく形態的に正常なもの、培養 24 時間目では胞胚腔に再拡張のみられたもの、培養 48 時間目では拡張胚盤胞以上に发育したものを生存胚とした。

6. 統計処理

体外受精由来胚の卵割率および胚盤胞発生率は分散分析、凍結・融解後の生存率は χ^2 検定を用いた。

結 果

1. 実験 1

酸素濃度 5 および 20% を用いた場合の体外受精由来胚の卵割率および胚盤胞発生率を表 1 に示した。酸素濃度 5% では、卵割率 $64.8 \pm 9.7\%$ 、胚盤胞発生率 $25.8 \pm 8.5\%$ であった。酸素濃度 20% は、卵割率 $65.1 \pm 12.3\%$ 、胚盤胞発生率 $28.4 \pm 10.0\%$ であった。酸素濃度の違いによる卵割率および胚盤胞発生率に差はなかった。また、酸素濃度 5 および 20% の気相中で発生した胚盤胞の凍結・融解後の生存率を表 2 に示した。酸素濃度 5% の生存胚数 (生存率) は、融解直後 (0 時間) で 62 (54.4%)、24 時間で 74 (64.9%)、48 時間で 66 (57.8%) であった。酸素濃度 20% の生存胚数 (生存率) は、融解直後で 59 (48.0%)、24 時間で 77 (62.6%)、48 時間で

Table 1 Effects of oxygen concentration in the gas atmosphere on the development of bovine presumptive zygotes to the blastocyst^{a)} stage

Oxygen concentration (%)	No. of replicates (zygotes)	% of cleaved zygotes	% of blastocysts
5	8(416)	64.8 \pm 9.7	25.8 \pm 8.5
20	8(432)	65.1 \pm 12.3	28.4 \pm 10.0

a) Blastocysts were obtained after culture of zygotes for 7 to 8 days in CR1aa medium supplemented with 5% calf serum. Values are mean \pm SEM.

63 (51.2%) であった。酸素濃度間で凍結・融解後 0~48 時間の体外培養における生存率に差は認められなかったが、酸素濃度 5% の気相条件から得られた胚盤胞の生存率が、酸素濃度 20% の気相条件から得られた胚盤胞に比べて高い傾向がみられた。

2. 実験 2

LAA を発生培養液に添加した場合の体外受精由来胚の卵割率および胚盤胞発生率を表 3 に示した。CR1aa へ LAA を添加しなかった場合 (対照区) は、卵割率 $61.4 \pm 14.7\%$ 、胚盤胞発生率 $25.5 \pm 6.1\%$ であり、LAA 添加した場合は卵割率 $60.0 \pm 12.3\%$ 、胚盤胞発生率 $25.7 \pm 7.4\%$ であった。CR1aa への LAA 添加の有無が体外受精由来胚の卵割率および胚盤胞発生率に及ぼす影響はみられなかった。LAA を添加した発生培養液から得られた胚盤胞の凍結・融解後の生存率を表 4 に示した。LAA 無添加区の生存胚数 (生存率) は、融解直後 (0 時間) で 55 (78.6%)、24 時間で 54 (74.3%)、48 時間で 46 (65.7%) であった。LAA 添加区の生存胚数 (生存率) は、融解直後で 68 (68.0%)、24 時間で 66 (66.0%)、48 時間で 61 (61.0%) であった。本実験では、LAA 添加区と無添加区で胚盤胞の凍結・融解後の生存率に有意な差はみられなかった。

Table 2 Effects of oxygen concentration in the gas atmosphere on the survival of frozen-thawed IVM/IVF bovine blastocysts^{a)}

Oxygen concentration (%)	No. of embryos	No. of survived embryos (%)		
		0h	24h	48h
5	114	62(54.4)	74(64.9)	66(57.8)
20	123	59(48.0)	77(62.6)	63(51.2)

a) Blastocysts were obtained after culture of zygotes for 7 to 8 days in CR1aa medium supplemented with 5% calf serum.

Table 3 Effect of adding LAA in the cultured medium on the development of bovine presumptive zygotes to the blastocyst^{a)} stage

LAA ^{b)}	No. of replicates (zygotes)	% of cleaved zygotes	% of blastocysts
-	5(332)	61.4 ± 14.7	25.5 ± 6.1
+	5(335)	60.0 ± 12.3	25.7 ± 7.4

a) Blastocysts were obtained after culture of zygotes for 7 to 8 days in CR1aa medium supplemented with 5% calf serum.

b) Abbreviated as follows: culture medium containing (+) or deleting (-) 0.25mg/ml LAA
Values are mean \pm SEM.

Table 4 Effect of adding LAA in cultured medium on the survival of frozen-thawed IVM/IVF bovine blastocysts^{a)}

LAA ^{b)}	No. of embryos	No. of survived embryos (%)		
		0h	24h	48h
-	70	55(78.6)	54(74.3)	46(65.7)
+	100	68(68.0)	66(66.0)	61(61.0)

a) Blastocysts were obtained after culture of zygotes for 7 to 8 days in CR1aa medium supplemented with 5% calf serum.

b) Abbreviated as follows: culture medium containing (+) or deleting (-) 0.25mg/ml LAA

考 察

本実験では、酸素濃度の違いは体外受精由来胚の卵割率および胚盤胞発生率に影響しなかった。しかし、Takahashi *et al.*¹⁴⁾ は、血清およびウシ血清アルブミン (BSA) 不含の修正卵管合成液 (mSOF) を用い非共培養、酸素濃度 5% の気相中で体外受精由来胚を培養した場合、酸素濃度 20% で培養した場合に比べて胚盤胞への発育率が 2 倍近くに改善され、ウシ胎子血清加 TCM199 の卵管上皮細胞との共培養と同等の胚盤胞率が得られたことを報告している。さらに、mSOF を用いた酸素濃度 5% の培養条件から得られた胚盤胞の細胞数は、mSOF を用いた酸素濃度 20% の培養条件および胎子血清加 TCM199 の卵管上皮細胞との共培養から得られた胚盤胞の細胞数よりも有意に多かったと報告している。Thompson *et al.*¹⁵⁾ も、BSA 添加 SOF を用いて体内受精由来 2~4 および 8 細胞期胚を培養した実験で、低酸素濃度の気相中で培養すると桑実胚への発育率の高いことを報告している。このように、高酸素濃度の気相条件下での胚の培養は、活性酸素の障害や代謝抑制が起こり¹⁵⁾、その結果、胚の発育に悪影響を与えるため、発育率の低下や得られた胚盤胞の細胞数が少なくなるものと考えられる。しかし、本実験では、酸素濃度の違いによる卵割率および胚盤胞発生率の差異はみられなかった。これは、Takahashi *et al.*¹⁴⁾ や Thompson *et al.*¹⁵⁾ が、血清または BSA 不含の SOF を培養液に用いているのに対して、本実験では CS および BSA を含む CR1aa を用いたため、培養条件の違いにより卵割率および胚盤胞発生率が異なると推察される。したがって、今後は血清や BSA の培養液への添加および酸素濃度と胚発生率の関係について詳細な検討が必要であると考えられる。また、本実験では、胚盤胞の細胞数を調べていないため、得られた胚盤胞の品質評価は形態観察のみで実施した。Takahashi *et al.*¹⁴⁾ が

行っているように胚盤胞の細胞数を調査し、酸素濃度が胚の品質に及ぼす影響も詳細に検討する必要があると思われる。また、酸素濃度間による凍結・融解後の生存率に差は認められなかったが、酸素濃度5%の気相条件から得られた胚盤胞の生存率が、酸素濃度20%の気相条件から得られた胚盤胞に比べてやや高い値が得られた。Takahashi *et al.*¹⁴⁾は、体外受精由来胚を mSOF を用いて低酸素濃度下で培養して得られた胚盤胞は、従来の共培養法（酸素濃度20%）で得られた胚盤胞より胚の品質が高いと報告している。本実験では、体外受精由来胚盤胞の低酸素気相条件による耐凍性の明確な向上は認められなかったが、酸素濃度5%の気相条件で得られた胚盤胞の培養0時間目の生存率が、酸素濃度20%の気相条件で得られた胚盤胞より良好なものが多かった。このことから、低酸素の気相中で发育した胚は、凍結・融解過程で障害を受ける細胞の割合が高濃度の酸素下で发育した胚より少ないものと推察された。

LAA の発生培養液への添加が、体外受精由来胚の卵割率および胚盤胞発生率に影響のないことが明らかになった。今井ら⁵⁾は、0~1.0 mg/ml の LAA を本実験と同じ組成の CR1aa に添加して体外受精由来胚を培養した結果、LAA 添加の有無および濃度の違いによる胚盤胞発生率に差がないことを報告していることから、今井ら⁵⁾と同様の結果が得られた。発生培養液に LAA を添加することによって、ウシ体外受精由来胚の耐凍性が高まることが報告されている^{5,6)}。LAA を発生培養液に添加することによって、総脂肪酸の不飽和度が高くなることに伴い、細胞膜の流動性および透過性も高くなるため、結果的に体外受精由来胚の耐凍性を増強すると考えられている⁴⁾。本実験では胚盤胞の凍結・融解後の耐凍性向上への LAA 添加の効果も認められなかった。しかし、今井ら⁶⁾は LAA 添加の発生培養液から得られた胚盤胞の凍結・融解後の生存率は LAA 無添加の発生培養液から得られた胚盤胞に比べて有意に高かったと報告している。この結果の違いは、今井ら⁶⁾が発生培養時の培養を5%CO₂, 95%空気(酸素濃度約20%)で行っているのに対し、本実験では酸素濃度5%の気相中で培養を行っており、培養条件の違いが関係していると考えられた。また、Hochi *et al.*⁵⁾は0.01~3.0 mg/ml の LAA を添加した mSOF で发育した体外受精由来桑実胚の耐凍性は、1.0 mg/ml LAA を添加した場合に最も高かったことを報告している。したがって、本実験の培養条件下での LAA 添加濃度と凍結・融解後の生存性との関係に

については、さらに検討の必要があると考えられた。

要 旨

ウシ体外受精由来胚の凍結・融解後の耐凍性の向上を目的として、発生培養中の酸素濃度が胚発生率および胚盤胞の耐凍性に及ぼす影響ならびに低酸素濃度条件下でのリノール酸アルブミン (LAA) の発生培養液への添加が胚盤胞の耐凍性に及ぼす影響について検討した。実験には、食肉処理場由来ウシ卵巢の卵胞より吸引採取した卵子を用いた。卵子は21時間体外成熟後、成熟卵子と精子を18時間媒精した。媒精を終了した卵子は5%ウシ血清 (CS) 添加 CR1aa に移した。実験1では酸素濃度が5および20%の気相中で発生培養を行い、酸素濃度の違いによる胚発生および得られた胚盤胞の凍結・融解後の生存性について検討した。実験2では発生培養液に0.25 mg/ml LAA を添加した5%CS加 CR1aa を用い、対照区を LAA 無添加として LAA の添加が胚盤胞の耐凍性に及ぼす影響について調べた。発生培養は9日間(媒精日を0日)行い、7および8日目に発生した胚盤胞を凍結に用いた。本実験において、酸素濃度の違いによる卵割率、胚盤胞発生率および胚の凍結・融解後の生存率に有意な差は認められなかった。また、LAA 添加の有無が体外受精卵の卵割率および胚盤胞発生率に及ぼす影響はみられず、胚の凍結・融解後の生存率にも差は認められなかった。以上の結果より、本実験の培養条件下では酸素濃度の違いと発生培養液への LAA 添加は、体外受精卵の発生率および胚盤胞の凍結・融解後の生存性に影響せず、ウシ体外受精由来胚の凍結・融解後の耐凍性の向上作用は認められなかった。

謝 辞

ウシ卵巢の採取に当たりご協力頂いた北海道畜産公社早来事業所、早来食肉衛生検査所ならびに東藻琴食肉衛生検査所、北海道畜産公社北見事業所の関係各位に深謝する。また、本研究は、財団法人栗林育英学術財団の助成を受けて行ったものである。

文 献

- 1) Brackett, B.G. and Oliphant, G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. Biol. Reprod. 12: 260-274.
- 2) Dochi, O., Imai, K. and Takakura, H. 1995. Birth of calves after direct transfer of thawed bovine embryos stored frozen in ethylene glycol. Anim. Reprod. Sci. 38: 179-185.

- 3) Hasler, J.F., Henderson, W.B., Hurtgen, P.J., Jin, Z.Q., McCauley, A.D., Mower, S.A., Neely, B., Shuey, L.S., Stokes, J.E. and Trimmer, S.A. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 43: 141-152.
- 4) 保地眞一. 1998. リノール酸アルブミンによる体外受精由来ウシ胚の耐凍性増強効果. *日本胚移植学雑誌* 21: 101-105.
- 5) Hochi, S., Kimura, K. and Hanada, A. 1999. Effect of linoleic acid-albumin in the culture medium on freezing sensitivity of in vitro-produced bovine morulae. *Theriogenology* 52: 497-504.
- 6) 今井 敬, 富沢宗高, 的場理子, 小林修司, 後藤裕司, 奥地弘明, 堂地 修, 下平乙夫. 1995. ウシ体外受精胚の発生および耐凍性に及ぼす各種添加物質の影響. *哺乳動物卵子学会誌* 12: S 3.
- 7) Leibo, S.P. and Loskutoff, N.M. 1993. Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology* 39: 81-94.
- 8) 小西正人, 板倉はつえ, 青柳敬人. 1994. ウシ体外受精卵の胚盤胞への発生に及ぼす卵丘細胞との共培養における合成培地へのグルコース添加の影響. *J. Reprod. Dev.* 40: j59-j64.
- 9) Pieterse, M.C., Kappen, K.A., Kruip, T.h.A.M. and Taverne, M.A.M. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of ovaries. *Theriogenology* 30: 751-762.
- 10) Pollard, J.W. and Leibo, S.P. 1993. Comparative cryobiology of *in vitro* and *in vivo* derived bovine embryos. *Theriogenology* 39: 287, abstr.
- 11) Rosenkrans, J.r. C.F. and First, N.L. 1991. Culture of bovine zygotes to the blastocyst stage: effects of amino acids and vitamins. *Theriogenology* 35: 266, abstr.
- 12) Shamsuddin, M., Larsson, B., Gustafsson, H. and Rodrigues-Martinez, H. 1994. A serum-free, cell-free culture system for development of bovine one-cell embryos up to blastocyst stage with improved viability. *Theriogenology* 41: 1033-1043.
- 13) Takahashi, Y. and First, N.L. 1992. *In vitro* development of one-cell bovine embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 37: 963-978.
- 14) Takahashi, Y., Hishinuma, M., Matsui, M., Tanaka, H. and Kanagawa, H. 1996. Development of *in vitro* matured/fertilized bovine embryos in a chemically defined medium: influence of oxygen concentration in the gas atmosphere. *J. Vet. Med, Sci.* 58: 897-902.
- 15) Thompson, J.G.E., Simpson, A.C., Pugh, P.A., Donnelly, P.E. and Tervit, H.R. 1990. Effect of oxygen concentration on *in-vitro* development of preimplantation sheep and cattle embryos. *J. Reprod. Fert.* 89: 573-578.
- 16) Voelkel, S.A., Hu, Y.X., Moor, K. and Bondioli, K.R. 1992. Freeze survival of bovine embryos produced by *in vitro* maturation, fertilization and culture of oocytes. *Theriogenology* 37: 317, abstr.

Summary

The objective of the present study was to investigate the effects of oxygen concentration in the gas atmosphere and linoleic acid albumin (LAA) in the developmental culture medium on the viability of in vitro-produced bovine embryos. In experiment 1, presumptive zygotes were cultured in CR1aa medium supplemented with 5% calf serum (CR1aa+CS) at 38.5°C under gas atmospheres of 5 and 20% O₂. There were no significant differences in the percentages of cleaved zygotes and blastocysts or in the viability of frozen-thawed embryos between the two O₂ concentrations. In experiment 2, presumptive zygotes were cultured in CR1aa + CS supplemented with 0 or 0.25 mg /ml LAA at 38.5 °C under a gas atmosphere of 5% O₂. On day 7 and 8 (fertilization=day 0), blastocysts were frozen and thawed in mPBS (PBS+20% CS) containing 1.5M ethylene glycol and 0.1M sucrose and were cultured for 48 h CR1aa medium supplemented with 5%CS and 0.1mM β-mercaptoethanol. There were no significant differences in the percentages of cleaved zygotes and blastocysts or in the viability of frozen-thawed embryos between the LAA-supplemented

and non-supplemented culture media. These results suggest that O₂ concentration and the addition of LAA to the developmental culture medium had no effect on the *in vitro* development of bovine embryos from zygote to blastocyst or on their viability after freezing-thawing.