

ウシ体外受精時成熟培地へのFSH添加の効果 —受精後の胚盤胞への発育に及ぼすFSHの影響—

前田淳一・小林修一・福井幸昌*・近藤守人*・平井洋士

Effects of FSH on Maturation of Fertilized Bovine
Oocytes in vitro

Junichi MAEDA, Shuichi KOBAYASHI,
Yukimasa FUKUI*, Morito KONDO*, Hiroshi HIRAI

*現福井県嶺南牧場

要 約

ウシ未成熟卵胞内卵子の体外受精培地にFSHを添加し、体外受精後の胚盤胞への発育に及ぼすFSHの影響について検討した。と殺された雌牛の卵巣から卵子を採取し、約20時間の体外成熟培養後に体外受精を行った。FSH添加群(0.01~1.0 mg/ml)と無添加群間には受精後48時間の卵割率(61.5% vs 65.8%)に差を認めなかった。また胚盤胞の発生率は、添加群25.1% (189/753)、無添加群22.5% (197/877)であり差を認めなかった。しかし、胚盤胞の発生日は、FSH添加群が7日目、8日目に各々54.0% (102/189)、31.7% (60/189)であり、無添加群の各々36.5% (72/197)、39.1% (77/197)に比べ胚盤胞期への発生日が早まる傾向が見られた。このことから、成熟培地へのFSH添加は胚の発育を促進する可能性が示唆された。

ABSTRACT

1630 cumulus oocyte complexes were collected from small antral follicles(2~5 mm) of slaughterhouse ovaries. Oocytes were separated FSH supplemented group (0.01~1.0mg/ml FSH, FSH from porcine pituitary, 753 oocytes) and control group (877 oocytes) and cultured in TCM-199+5% calf serum at 39C in 5%CO₂ in air for 20h. The cleavage of embryos after 48h insemination and development to the blastocyst stage by 11day were measured. The cleavage rate and the rate of developing to blastocyst stage were not different with or without FSH supplementation(61.5%vs65.8%, 25.1%vs22.5% respectively). The peak of developing to blastocyst stage with FSH was day7 after insemination, however, without FSH was day8. These results suggest that FSH supplementation may activates bovine embryo development in vitro culture. Key words: FSH, in vitro matured, bovine oocyte, blastocyst.

結 言

ウシの体外受精に関する研究は、Iritani and Niwa¹⁾が初めて体外受精卵子への精子侵入を報告した。花田ら²⁾は、未成熟卵胞内卵子を体外成熟・体外受精後、偽妊娠ウサギの卵管内に仮移植し、4～5日間培養後回収し、胚盤胞期前後に发育したところでウシに移植し産子を得た。ウシの体外受精卵を体外培養のみで发育させると、8細胞期前後で发育は停止すると言われている³⁾。

一方、体外成熟、体外受精したウシ受精卵を卵丘細胞⁴⁾やウシ卵管上皮細胞⁵⁾との共培養により、桑実胚から胚盤胞まで发育させ得るようになった。

ここでは、体外成熟培養液にFSHを添加し体外受精後、卵丘細胞と共培養を行い胚盤胞への发育に及ぼす影響について検討した。

試 験 方 法

未成熟卵胞内卵子の採取は、食肉処理場でと殺された雄牛の卵巣の2～5mm大の小卵胞から、注射器で吸引採取する吸引法または卵巣皮質をメスで切って卵子を採取する細切法によって行った。回収した卵子のうち卵丘細胞が卵子の周囲に緊密に付着し、細胞質が形態的に均一と思われるものを選んで体外成熟培養に供した(写真1)。卵巣1個から吸引法により平均5.2個、細切法により

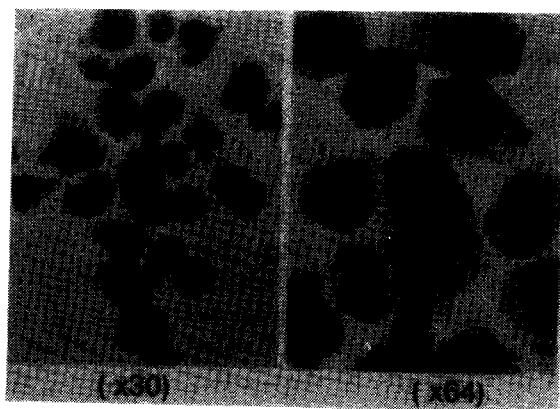


写真1 使用した未成熟卵

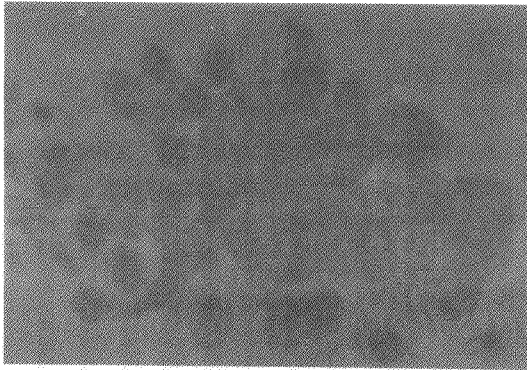
平均13個の供試卵が得られ、これから得た合計1,630個の卵子を実験に使用した。成熟培養液は25mM HEPES 緩衝 TCM199 (GIBCO) に非働化子牛血清 (GIBCO) を5%、ストレプトマイシン100 μ g/ml、ペニシリン100IU/mlを加え、FSH無添加群とFSH (アントリン、デンカ製薬) の7通りの添加群 (0.01、0.025、0.05、0.1、0.25、0.5、1.0mg/ml) を作成した。培養液を流動パラフィン (アミノ酸自動分析用、半井化学) 下の100 μ lの小滴にし、20個ずつの卵子を入れ39°C、5% CO₂、95% 空気の気相下で約20時間培養した。精子は黒毛和種の凍結融解精子を用い、10mM カフェイン (Sigma) 添加BO液⁷⁾ で2回遠心 (500xg、5分) 後、精子濃度を2.5x10⁷/mlに調整した。20mg/mlのウシ血清アルブミン (Sigma) を含むBO液で等量希釈後、100 μ lの小滴にし媒精に供した。媒精は成熟培養約20時間後に、卵子を20個ずつ精子の入った培地に入れ、媒精時間は5時間とした。媒精終了後、卵子を発生培地でよく洗浄し卵子の成熟培養に使った同一のシャーレを発生培地で液換えし、再利用した。発生培地はTCM 199に子牛血清を5%加えた。媒精約48時間後に受精卵を卵丘細胞より遊離させ卵割状況を観察し、あわせて発生培地の液換えを行った。この時点で卵丘細胞はシャーレの底面で単層を形成しており、遊離した受精卵をこの単層上で培養を継続した。その後11日回観察を行い、受精 (0日) 後7～11日の間に发育する胚盤胞数を調べた。

結 果

FSHを成熟培養液に添加して卵子の体外成熟培養を行うと、明瞭な卵丘細胞の expansion が観察された(写真2)。

FSH添加での卵割率は2細胞期以上61.5% (463/753)、4細胞期以上51.0% (384/753)、8細胞期以上25.0% (188/753) で、無添加の各々65.8% (577/877)、50.3% (441/877)、22.6% (198/877) に比較して差はなかった(図1)。

FSHの濃度の違いによる卵割率は濃度に関係



Cumulus expansion

写真2 成熟培養の効果 (×20)

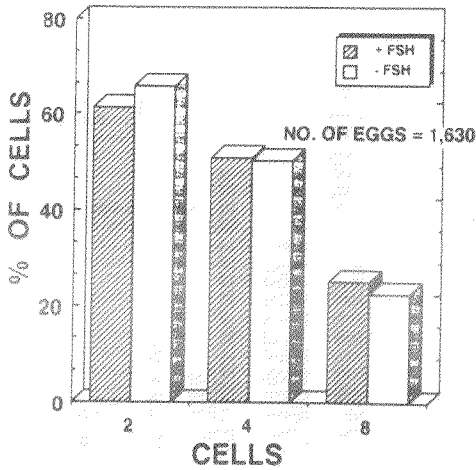


図1 FSH添加による細胞分割

なくほぼ一定した率を示したが、0.25~0.5mg/mlにおいて2細胞期以上(65.2~66.2%)、4細胞期以上(56.5~61.0%)、8細胞期以上(29.9~31.1%)でやや良い成績が得られた(図2)。

胚盤胞の発生率は、添加群25.1%(189/753)で無添加群22.5%(197/877)との間に差を認めなかった(図3、写真3)。

FSHの濃度の違いによる胚盤胞の発生率は、0.01、0.025、0.05、0.1、0.25、0.5、1.0mg/mlにおいて各々18.3%(13/71)、26.9%(25/93)、26.6%(25/94)、25.7%(45/175)、24.7%(19/77)、26.1%(42/161)、24.4%(20/82)であ

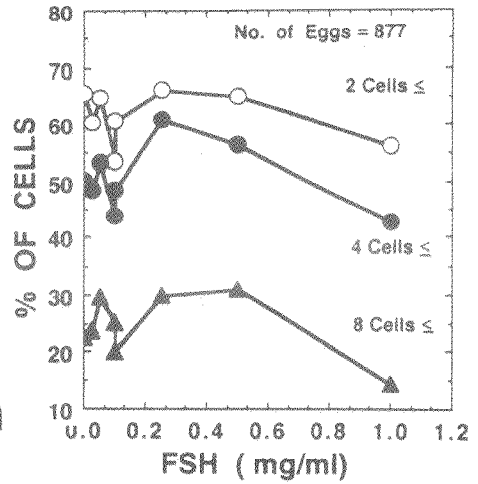


図2 FSHの濃度効果

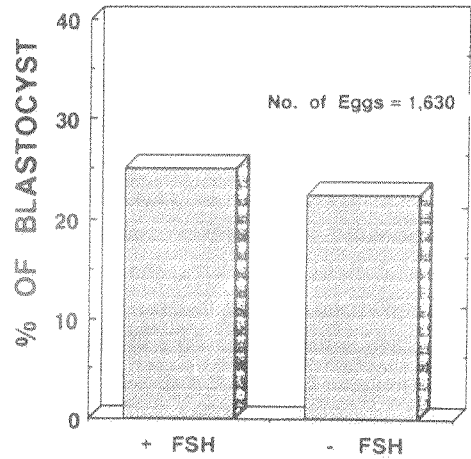
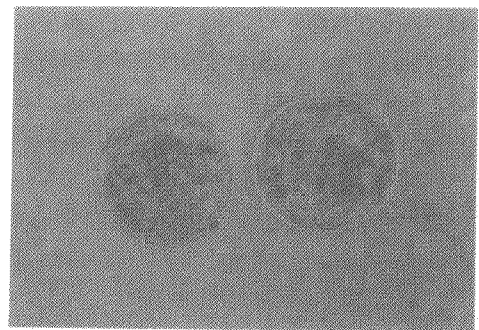


図3 胚盤胞発生率



Blastocyst, +FSH, Day 7, x 200

写真3 胚盤胞に発育した卵

り、0.01mg/mlでやや低い発生率であったが、0.025~1.0mg/mlにおいてはほとんど変わらない発生率であった(図4)。

添加群と無添加群の胚盤胞の発生日を図5に示した。添加群は発生した胚盤胞のうち、受精後7日目で全体の54.0% (102/189)が胚盤胞に発育し、8日目31.7% (60/189)、9日目11.6% (22/189)、10日目1.6% (3/189)、11日目1.1% (2/189)であり、胚盤胞の発生日のpeakは7日目であった。一方、無添加群は7日目で全体の36.5% (72/197)が胚盤胞に発育し、8日目にはpeakの39.1% (77/197)、9日目18.3% (36/197)、10日目5.6% (11/197)、11日目0.5% (1/197)であり添加群において胚盤胞の発生日が早まる傾向が見られた。

考 察

約20時間の成熟培養を行うことにより、卵丘細胞の expansion の状態は、添加群と無添加群の間で明瞭に異なり、添加群において著しい expansion がみられた。Olsonら⁸⁾は、成熟培地へのFSHの添加がウシ卵丘細胞の expansion に有効であったと述べている。また、Zhangら⁹⁾は、成熟培地への insulin の添加により、福島ら¹⁰⁾は、FSH、LH、E₂の添加によりウシ卵丘細胞の明らかな expansion がみられたと述べている。

媒精後約48時間後の卵割率は、2細胞期以上において添加群で61.5%、無添加群で65.8%と差はなく、4細胞期、8細胞期以上の卵割率においても差はみられなかったことから、FSH添加により卵丘細胞が expansion を起こしても卵割率に対する影響はなかったものと考えられる。一方、胚盤胞の発生率は添加群で25.1%、無添加群22.5%であり、両群の間に差を認めなかった。また、FSHの濃度の違いによる胚盤胞への発生率(18.3%~26.9%)においても差を認めなかった。今回、実験に使用したFSHは commercial に市販されているブタの下垂体より抽出したFSH注射用製剤でLHを含んでいるとされ、主にウシの過剰排卵処理に使用されているものである。Saekiら¹¹⁾

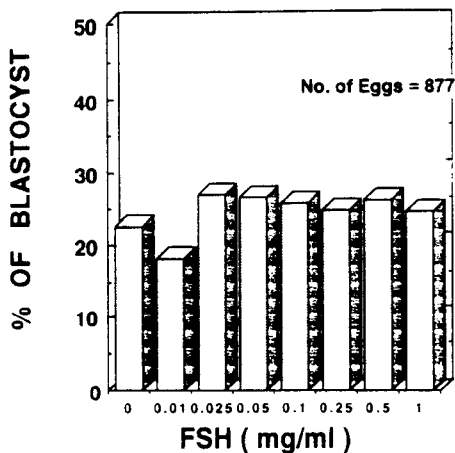


図4 胚盤胞発生率とFSHの濃度効果

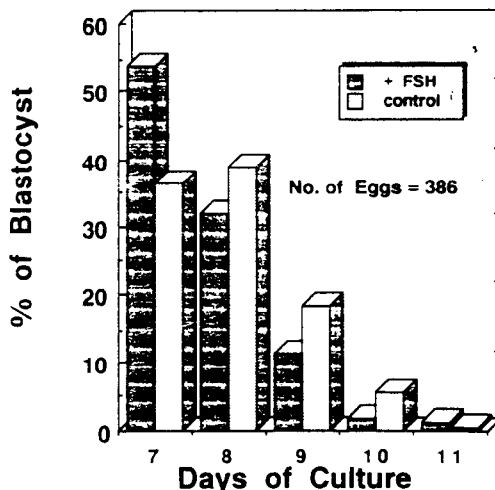


図5 FSH添加の胚盤胞発生日に対する影響

は、成熟培地へ数種類の commercial なFSH製剤を添加しても、pureなFSHと比較して受精率、卵割率、胚盤胞発生率において差がなかったと述べている。また、堀内ら¹²⁾は、著者らが使用した同じFSHの1.2mg/mlを成熟培地と発生培地へ添加し、成熟培地のみへの添加では添加しないものに比べ胚盤胞への発生率は、今回の著者らの成績と同じように差を認めなかった(10% vs 13%)。しかし、成熟培地と発生培地または、発生培地のみへのFSH添加によって各々23%、22%へと胚盤

胞の発生率が高くなったと述べており興味を持たれるところである。

添加群と無添加群の胚盤胞の発生日をみると、添加群は胚盤胞の発生の peak は7日目で54.0%を占め、7日目と8日目を合わせると85.7%であった。一方、無添加群は8日目が peak で39.1%であり、7日目と8日目を合わせても75.6%にすぎず、添加群において胚盤胞への発生日が早まる傾向が見られたことから、成熟培地へのFSH添加は胚の発育を促進する可能性が示唆された。排卵後受精したウシの受精卵は、7～8日後に胚盤胞に発育する¹³⁾ことから、FSHの添加は培養条件を生体のそれに近づけることも考えられた。

しかし、この作用の直接的な原因については不明であるが、卵丘細胞の expansion はFSH添加によって明らかに出現した。体内での卵丘細胞からは、フィブロネクチンなどの多くの生理活性物質を分泌していると言われており、卵子の成熟、特に細胞質の成熟に何か重要な働きを行っている可能性も考えられ、さらに詳細な検討が必要と考えられた。

引用文献

- 1) Iritani, A. and Niwa, K. : J. Reprod. Fertil., 50 : 119, 1977
- 2) 花田章ら：第78回日本畜産学会（1986, 茨城県谷田部町）：I - 36
- 3) Brackett, B.G. et al : Biol. Reprod., 27 : 147, 1982
- 4) 梶原豊ら：家畜繁殖誌, 33 : 173, 1987
- 5) 福田芳詔ら：第79回日本家畜学会（1987, 岐阜市）I - 35
- 6) Lu, K.H. et al. : Vet. Record., 122 : 539, 1988
- 7) Brackett, B.G. and Oliphant, G. : Biol. Reprod., 12 : 260, 1975
- 8) Olson, S.E. et al. : Theriogenology, 33 : 293, 1990
- 9) Zhang, L. et al. : Theriogenology, 35 : 301, 1991
- 10) 福島護之ら：家畜繁殖誌, 37 : 127, 1991
- 11) Saeki, K. et al. : Theriogenology, 34 : 1035, 1990
- 12) 堀内俊孝ら：第84回日本畜産学会（1991, 相模原市）：繁殖48
- 13) 家畜人工受精講習会テキスト（家畜受精卵移植編）, p.144, 日本家畜人工受精師協会, 1989