

# ウシ未成熟卵胞内卵子の体外成熟・体外受精由来の初期胚と Vero細胞との共培養について

前田淳一・福井幸昌\*・小林修一・近藤守人\*・平井洋士

Effects of co-culture of Vero cells on development  
of in vitro matured, fertilized bovine oocytes

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

\* 現福井県嶺南牧場

## 要 約

ヒトやマウスの初期胚が生殖器以外の、異種動物の細胞である Vero 細胞との共培養において胚の発育を促進することが報告されている。そこで本研究では、ウシ未成熟卵胞内卵子の体外成熟・体外受精由来の受精卵を用いて Vero 細胞との共培養を行い胚の発育について検討した。5細胞期以上の胚は、Vero細胞との共培養で胚盤胞率は16.2% (17/105)を示した。また、その中で Hatching 以上までに発育したものは17.6% (3/17)を示した。2~4細胞期の胚は、Vero細胞との共培養で胚盤胞にまで発育するものはなかった。細胞非存在下では全ての胚は発育を停止した。

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of co-culture of Vero cells on development of in vitro matured, fertilized bovine oocytes. Oocytes were cultured in the presence of FSH in TCM-199 +5% calf serum at 39C in 5% CO<sub>2</sub> in air for 20h. The cleaved embryos after 48h insemination were further co-cultured in the presence of Vero cells or granulosa cells. The cleaved embryos over 5 cells developed into blastocyst (16.2%) and hatching rate these blastocysts was reached to 17.6%. These data indicated that Vero cells obviated the 8-cells block. Key words: Vero cells, in vitro matured, bovine oocyte, blastocyst, hatching.

## 緒 言

ウシの体外受精に関する研究では、Iritani and Niwa<sup>1)</sup>が初めて体外受精卵子への精子侵入を報告した。花田ら<sup>2)</sup>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、胚盤胞期前後に発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発育させると、8細胞期前後で発育は停止すると言われている<sup>3)</sup>。

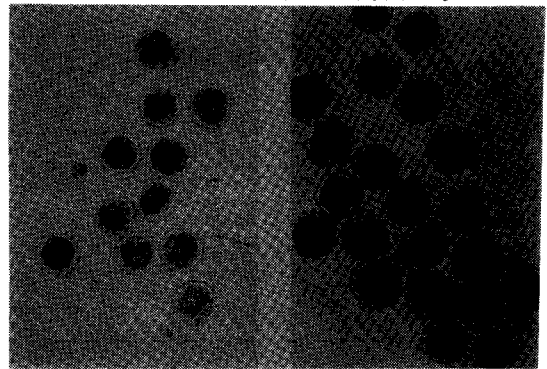
一方、体外成熟、体外受精したウシ受精卵を卵丘細胞<sup>4,5)</sup>やウシ卵管上皮細胞<sup>6)</sup>との共培養により、桑実胚から胚盤胞期胚まで発育させ得るようになった。

一方、ヒトやマウスの初期胚が生殖器以外の、また異種動物の細胞である Vero 細胞との共培養において胚の発育を促進することが報告されている。そこで本研究では、ウシ未成熟卵胞内卵子の体外成熟・体外受精由来の受精卵を用いて Vero 細胞との共培養を行い胚の発育について検討した。

## 試 験 方 法

食肉処理場でと殺された雌牛の卵巣の2～5mm 大の小卵胞から、卵表面をメスで切って卵子を採取する細切法によって、未成熟卵子を採取した。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。卵巣1個から細切法により平均13個の供試卵が得られた。成熟培養液は25mM Hepes TCM199 (GIBCO) に非働化牛血清 (GIBCO) を5%、ストレプトマイシン100  $\mu$ g/ml、ペニシリン100IU/mlを加え、FSH (アントリン、デンカ製薬、0.1mg/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100mlの小滴にし、20個ずつの卵子を入れ39°C、5% CO<sub>2</sub>、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液で2回遠心 (500xg、5分)

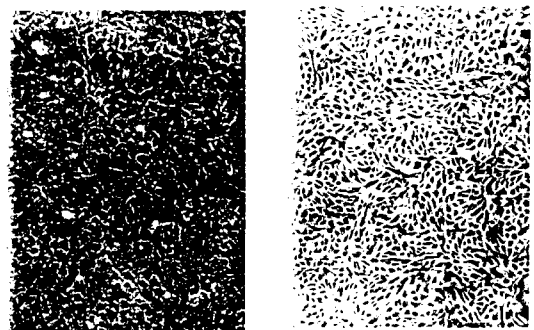
後、精子濃度を2.5x10<sup>7</sup>/mlに調整した。20mg/mlのウシ血清アルブミン (Sigma) を含むBO液で等量希釈後、100  $\mu$ lの小滴にし媒精に供した。媒精は成熟培養約20時間後に、卵子を20個ずつ精子の入った培地に入れ、媒精時間は5時間とした。媒精終了後、卵子を発生培地でよく洗浄し卵子の成熟培養に使った同一のシャーレを発生培地で液換えし、再利用した。発生培地はTCM 199に子牛血清を5%加えた。媒精約48時間後に受精卵を卵丘細胞より遊離させ卵割状況を観察した。供試した卵子のうち約63%が2細胞以上に発育していたため、これらを2～4細胞期と5細胞期以上の2群に分け以下の実験を行った (写真1)。



2-4 cells      5 cells  $\leq$

(受精後48時間) (x100)  
写真1 使用した胚

次いで、100  $\mu$ lの発生培地の dish 底面に Vero 細胞または卵丘細胞を発育させ、その上で受精卵を培養した (写真2)。



Cumulus cell

Vero cell (x40)

写真2 使用した細胞

conditioned medium は、Vero 細胞または卵丘細胞が confluent になった状態から48時間後の上清を0.20 $\mu$ mのフィルターで濾過したものを使用した。対照は通常のもので行った。その後1日2回観察を行い、受精(0日)後7~11日の間に発育する胚盤胞数を調べた。

結 果

5細胞期以上の胚は、Vero 細胞との共培養で105個の内17個、16.2%が胚盤胞に発育し、卵丘細胞との共培養の110個中28個、25.5%に比較して低値を示した(表1、写真3)。

表1 発生日別にみた胚盤胞発生

	Cumulus Cell		Vero Cell	
	5 cells $\leq$	2-4 Cells	5 cells $\leq$	2-4 cells
No. of Eggs	110	75	105	70
Blastocyst	D 7	16 (13)* 4 (3)	4 (2)	0
	D 8	6 (5) 3 (1)	5 (1)	0
	D 9	5 (2) 2 (1)	0	0
	D 10	1 (0) 0	0	0
	D 11	0	0	0
Total		28 (20) 9 (5)	17 (3)	0
%		25.5 (71.4) 12.0(55.6)	16.2( 17.6)	0

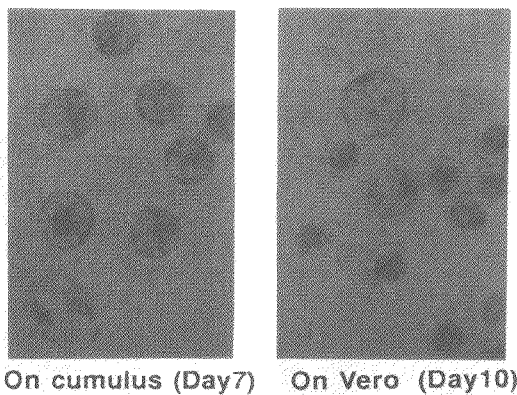


写真3 細胞上での胚の発育 (x100)

conditioned medium 存在下ではVero 細胞由来のものでは45個中8個(17.8%)が胚盤胞に達し、卵丘細胞内の conditioned medium 中では45個の中から11個(24.4%)が胚盤胞に発育した(写真4)。

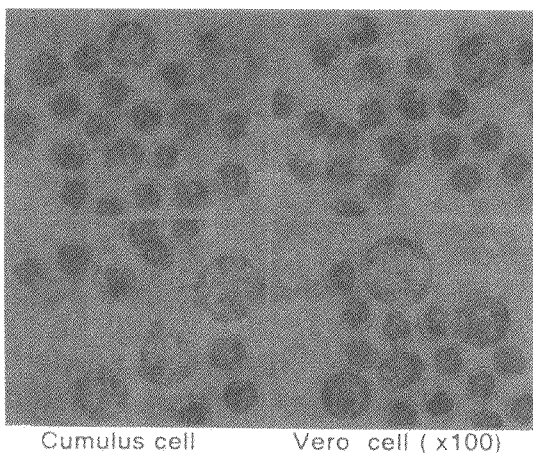


写真4 培養上清の胚発育への効果

また、Hatching 以上までに発育したものはVero 細胞存在下で17.6% (3 / 17)、卵丘細胞存在下では28個の胚盤胞中20個(71.4%)がHatching した。conditioned medium 存在下での成績を図1に示した。

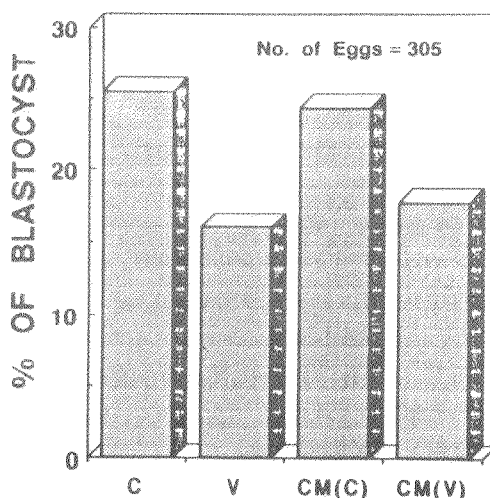


図1 細胞および培養上清の効果

一方、2～4細胞期の胚は、Vero細胞との共培養で胚盤胞にまで発育するものはなかった。また、細胞非存在下では全ての胚は発育を停止した。

## 考 察

未成熟卵の体外成熟培養、体外受精、体外発育培養の成功率は胚の種を問わず極めて低いのが現状である。ヒトの受精卵を体外で培養する場合、倫理的側面の束縛から時間的制限や受精卵と共培養する細胞にもおのずから制限される。

ウシの体外受精卵を体外培養のみで発育させると、8細胞期前後で発育は停止すると言われており<sup>3)</sup>、これを解決するために、花田ら<sup>2)</sup>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、胚盤胞期前後に発育したところでウシに移植し産子を得た。また、体外成熟、体外受精したウシ受精卵を卵丘細胞<sup>4), 5)</sup>やウシ卵管上皮細胞<sup>6)</sup>と共培養することにより、桑実胚から胚盤胞まで発育させ得るようになった。

これらの共培養システムは体外培養での胚発育を向上させたものの、いくつかの欠点を有していると言わざるを得ない。すなわち、

- 1) 偽妊娠ウサギの卵管の採取は困難、
- 2) 卵管上皮の培養維持が困難、
- 3) 細胞数や細胞の活性把握が困難

等の欠点が上げられる。そこで我々はヒトの受精卵との共培養にも利用されている Vero 細胞を利用し実験を行ってみた。本培養株は Green monkey の腎由来の細胞株であり、生殖器と同様の発生由来を有し、毒性もないことが知られている<sup>7)</sup>。

今回の成績から、Vero細胞やその培養上清が卵丘細胞との共培養には劣るものの、ウシの受精卵胚発育上、8 cell block を解除したことはこの細胞由来の液性因子が初期胚に働き胚発育を促進したものと思われる。

培養細胞株を共培養に使用することは、いつも一定量の細胞を実験に使用することが可能になり、実験の精度や定量性につながるものと思われる。

現在、培養上清中の胚発育促進因子を検討中である。

## 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、茨城県谷田郡町）：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) Menezes, Y.J.R. et al.: Biol. Reprod., 42: 301, 1990