

# 牛の胚移植技術に関する研究 (第4報) 牛体外受精の発生培養における添加物と培養液の検討

榊原秀夫・西 康裕・余谷行義

畜産部

## 要 旨

牛体外受精における胚盤胞発生率を上げる目的で、発生培養液への添加物（タウリン、ハイポタウリン）、培養液中のグルコース濃度（1.5mM、0.5mM、0.1mM、0 mM）、培養液の種類（TCM199、m-SOF、CR1aa）についての検討を行ったところ、タウリンおよびハイポタウリンの添加試験では、タウリンよりもハイポタウリンの添加で効果がみられ、タウリンとハイポタウリンの同時添加では効果がみられなかった。m-SOFを使った培養液中のグルコース濃度別の試験では、含まれるグルコース濃度が低いほど、2細胞以上への分割率、胚盤胞発生率が高くなった。TCM199、m-SOF、CR1aaの3種の培養液別の試験では、m-SOFの胚盤胞発生率が一番高く、次にCR1aaが高かった。m-SOFとCR1aa由来の胚盤胞および拡張胚盤胞の耐凍性は、m-SOFで6日目、7日目、CR1aaで7日目に発生した胚盤胞・拡張胚盤胞で高かった。

キーワード：タウリン；ハイポタウリン；グルコース；m-SOF；CR1aa

## 緒 言

牛体外受精により、屠殺した牛の卵子から、子牛が得られるようになった。また、現在、核移植に用いるドナー胚やレシビエント卵を得る方法としても、牛体外受精技術は不可欠なものとなっている。

当部においても、屠畜場で採取した黒毛和種雌牛の卵巣から、牛個別に卵子を採取して体外受精を行い、胚を作成している。個別に体外受精を行うことは、種雄牛に加え母牛の血統・能力の明らかな胚が得られる利点がある。しかし、1頭の卵巣から発生する胚盤胞の数は2個程度と少なく、より一層の胚盤胞発生率の向上が求められている。

また、体外受精胚の品質は、体内受精胚と比べ通常は良くなく、品質面についても改善が求められている。

そこでまず、牛体外受精胚の発生促進のため、含硫アミノ酸の一種であるタウリン<sup>1,11,21,25-26)</sup>とハイポタウリン<sup>19,20,23,26)</sup>を、体外受精後の発生培養液に添加し検討を行った。次に、グルコースに胚の初期発生阻害作用があるとの報告<sup>18,24,33,34,37)</sup>があるため、培養液中のグルコース濃度についても検討した。

また、今までの既製TCM199に替わり、組成の単純な培養液、すなわち、羊の卵管液の組成を分析し、そ

の組成を人工的にまねた合成卵管液(SOF)<sup>26)</sup>や、無血清培養に使用されるCR1aa<sup>17-18,29)</sup>などの新しい培養液が登場しており、それらについても検討を行ったので報告する。

## 材料及び方法

牛体外受精は、屠畜場において個別に採取した黒毛和種雌牛卵巣表面の直径7mm以下の卵胞から得た未成熟卵子と、家畜改良事業団が作成した黒毛和種雌牛凍結精液を融解した精子浮遊液で行った。

未成熟卵子の成熟培養は、10%牛胎児血清加TCM199にミネラルオイルを重層し、4ウェルデッシュで個別に20時間行った。

媒精は、0.02mg/mlヘパリン加BO液<sup>3)</sup>50μlのドロップへ個別に成熟卵子を入れ、これに10mMカフェイン加BO液で洗浄、精子数を1~5×10<sup>6</sup>/mlに調整した精子浮遊液を50μl加え、5時間行った。

発生培養は、試験1、2、3別に、以下のとおり設定した。

試験1では、タウリン(C<sub>2</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>3</sub>S)とハイポタウリン(C<sub>2</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>S)が受精後の胚発生におよぼす影響を調べるため、5%子牛血清とインシュリン0.01mg/ml

を加えたTCM199<sup>30</sup>に、①タウリン10mMを加えた区（T区）、②ハイポタウリン10mMを加えた区（H区）、③タウリン10mM・ハイポタウリン10mMを加えた区（T+H区）の3区を設定し試験を行った。

試験2では、必須および非必須アミノ酸を加えた修正合成卵管液（m-SOF：表1）<sup>4,6,14,16,22,24,27,30,33,34,37</sup>をもとに、①グルコース1.5mMの区、②グルコース0.5mMの区、③グルコース0.1mMの区、④グルコース0mMの区の4区を設け、最適のグルコース濃度を検討した。

試験3では、培養液の種類別に発生培養を行い、TCM199、m-SOF（グルコース0mM）、CR1aa（表2）の3つについて、最も適する培養液を調べた。

表1 m-SOFの組成

NaCl	107.7	(mM)
KCl	7.16	(mM)
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.71	(mM)
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.49	(mM)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.19	(mM)
NaHCO <sub>3</sub>	25.07	(mM)
Lactic acid (Sodium salt, Syrup, 60%)	3.3	(mM)
Pyruvate-Na	0.33	(mM)
Glucose	0.00	(mM)
*MEM amino-acids(×100) (Non-essential)	1	(ml/dl)
*BME amino-acids(×50) (Essential)	2	(ml/dl)
Phenol red	0.1	(mg/dl)
Streptomycin	10.0	(mg/dl)
Penicillin	1万	(IU/dl)
*Insulin	1.0	(mg/dl)
*Hypotaurine	10.0	(mM)

\*印は新たに加えたもの

表2 CR1aaの組成

NaCl	114.7	(mM)
KCl	3.1	(mM)
NaHCO <sub>3</sub>	26.2	(mM)
Lactic acid (Hemicalcium salt)	5.0	(mM)
Pyruvate-Na	0.4	(mM)
L-glutamine	14.6	(mg/dl)
MEM amino-acids(×100) (Non-essential)	1	(ml/dl)
BME amino-acids(×50) (Essential)	2	(ml/dl)
Phenol red	0.1	(mg/dl)
Streptomycin	10.0	(mg/dl)
Penicillin	1万	(IU/dl)
*Insulin	1.0	(mg/dl)
*Hypotaurine	10.0	(mM)

\*印は新たに加えたもの

また、これらの培養液で作成した7日目の胚盤胞および拡張胚盤胞について、酢酸で伸展固定後ギムザ染色を行いその細胞数を数えた。m-SOF、CR1aaについては、発生した胚盤胞の品質を検討するため、1.5Mエチレングリコールまたは、1.4Mグリセリンで凍結（図1）後融解し卵丘細胞と共培養して、その生存率および透明帯からの脱出胚率を調べた。また、一部の新鮮胚を移植し、受胎性を調査した。

以上の試験においては、媒精後48時間目に、2細胞以上へ分割している卵の数を数えその分割率を判定した。発生培養は、媒精日を0日として9日目まで継続して行い、その間に発生した胚盤胞の数を記録し、発生率とした。

成熟培養、媒精、発生培養の培養条件は、すべて38.5℃、4%CO<sub>2</sub>空気、湿度99%の条件で卵丘細胞と共培養して行った。

## 結 果

試験1の各区における胚盤胞発生率は、H区で一番高く、21.2%（356/1676）であり、T区の発生率は、17.9%（148/826）、T+H区の発生率も、17.9%（114/638）であった。また、胚盤胞の発生速度では、H区のみ6日目に胚盤胞の発生が認められ、7日目の発生数も多かった（表3）。

試験2では、m-SOFに含まれるグルコース濃度が少ないほど、2細胞以上への分割率、胚盤胞発生率が高くなった。分割率は、グルコース1.5mMで73.6%（95/129）、0.5mMで75.2%（82/109）、0.1mMで84.5%（180/213）、0mMで87.5%（342/391）であり、胚盤胞発生率は、グルコース1.5mMで31.8%（41/129）、0.5mMで39.4%（43/109）、0.1mMで51.2%（109/213）、0mMで59.3%（232/391）であった（表4）。

凍結保護剤 : 1.4 M Glycerol または  
1.5 M Ethylene-glycol  
凍結液 : 20%子牛血清加修正TCM 199  
Program Freezer : メタノールバス横置き式

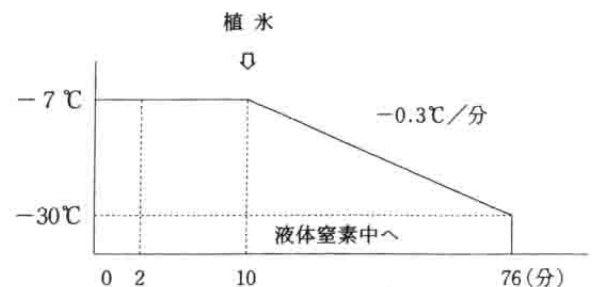


図1 凍結方法

試験3における、TCM199、m-SOF、CR1aaの2細胞以上への分割率は、それぞれ71.1%(865/1216)、80.8%(829/1026)、84.6%(378/447)であった。胚盤胞発生率は、それぞれ19.6%(238/1216)、48.6%(499/1026)、43.4%(194/447)であり、m-SOFが一番高く、次にCR1aaが高かった。TCM199とm-SOFの間には1%水準で、またTCM199とCR1aaとの間に5%水準で有意差がみられた。m-SOFとCR1aaの間には有意差がなかった(表5)。胚盤胞の発生速度は、m-SOFが一番速く、次にCR1aaが速かった(図2)。TCM199、m-SOF、CR1aaそれぞれの培養7日目に発生した胚盤胞と拡張胚盤胞の細胞

数は、3種の培養液間で差はなかった(表6)。

また、m-SOFから得られた胚盤胞と拡張胚盤胞の凍結・融解後の出現日別の生存率は、1.5Mエチレングリコール、1.4Mグリセリンともに、6日目、7日目に出現した胚盤胞および拡張胚盤胞で高く、8日目に出現した胚盤胞および拡張胚盤胞では、低下した。CR1aa培養胚の出現日別の生存率は、1.5Mエチレングリコール、1.4Mグリセリンともに、7日目に出現した胚盤胞および拡張胚盤胞で高かった(表7、表8)。農家における新鮮胚移植の受胎率は、TCM199が62.5%(5/8)と非常に高く、m-SOFは40.0%(6/15)であった。CR1aaでは、20.0%(1/5)と低かった(表9)。

表3 タウリン(T)、ハイポタウリン(H)添加時の発生成績

区分	培養卵数	発生胚盤胞数					胚盤胞発生率(%)
		6日	7日	8日	9日	計	
① T区	826		19	52	77	148	17.9
② H区	1676	4	97	134	121	356	21.2
③ T+H区	638		13	45	56	114	17.9

表4 グルコース濃度別発生成績

グルコース濃度(mM)	培養卵数	2細胞以上への		胚盤胞	
		分割数	分割率	発生数	発生率
1.5	122	95	73.6	41	31.8
0.5	109	82	75.2	43	39.4
0.1	213	180	84.5	109	51.2
0.0	391	342	87.5	232	59.3

表5 培養成績

区分	培養卵数	分割卵数	3細胞以上の分割率(%)	胚盤胞発生数	胚盤胞発生率
m-SOF	1026	829	80.8	499	48.6 <sup>a</sup>
CR1aa	447	378	84.6	194	43.4 <sup>b</sup>
TCM199	1216	865	71.1	238	19.6 <sup>c</sup>

異符号間に有意差あり ac\*\*  
bc\*

表6 細胞数(7日目胚)

培養液	胚盤胞		拡張胚盤胞	
	胚数	細胞数	胚数	細胞数
TCM199	4	104.0	4	143.5
m-SOF	4	98.3	5	140.8
CR1aa	4	91.5	2	141.0

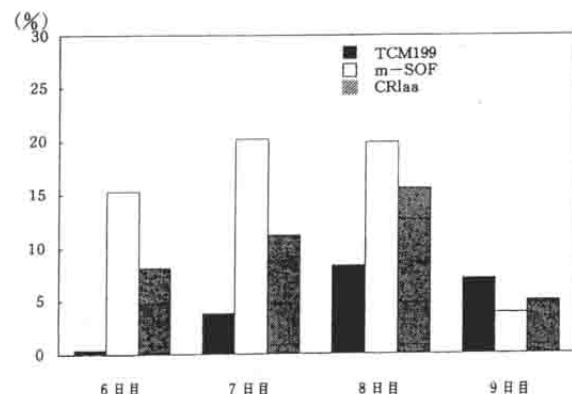


図2 培養液別胚盤胞発生率

表7 凍結・融解成績  
(1.5Mエチレングリコール)

培養液	胚の日齢	生存率	脱出胚率
m-SOF	6日目	85.7(18/21)	28.6(6/21)
	7日目	92.3(12/13)	53.8(7/13)
	8日目	35.9(14/39)	25.6(10/39)
CR1aa	6日目	66.7(2/3)	33.3(1/3)
	7日目	91.6(11/12)	41.7(5/12)
	8日目	59.3(16/27)	18.5(5/27)

表8 凍結・融解成績  
(1.4Mグリセリン)

培養液	胚の日齢	生存率	脱出胚率
m-SOF	6日目	81.8(18/22)	45.5(10/22)
	7日目	87.5(14/16)	62.5(10/16)
	8日目	46.7(7/15)	13.3(2/15)
CR1aa	6日目	75.0(3/4)	25.0(1/4)
	7日目	100.0(6/6)	66.7(4/6)
	8日目	63.6(7/11)	27.3(3/11)

表9 新鮮胚の移植成績 (H7~8)

培養液	移植胚数	受胎胚数	受胎率
TCM199	8	5	62.5
m-SOF	15	6	40.0
CR1aa	5	1	20.0

## 考 察

インシュリンを、培養液に添加すると胚の発生に効果があると報告<sup>2,5,7-9,28,31-32)</sup>されている。また、タウリン、ハイポタウリン等の含硫アミノ酸については、卵管中に多量に存在することが言われており<sup>29)</sup>、今回、インシュリンとハイポタウリンを添加することにより、胚盤胞発生率が高まり発生速度が速まること、そして胚の品質も向上することが確認された。しかし、タウリンについては、効果が確認できなかった。またReedら<sup>26)</sup>は豚胚の体外培養において、タウリンとハイポタウリンを同時に添加することにより、胚盤胞発生率が高まったと報告しているが、今回の試験では同時添加による効果はみられなかった。

m-SOFを用いた、グルコースの濃度別試験の結果、グルコース無添加のときに、2細胞以上の分割率が高まり、胚盤胞発生率が向上することが判明した。この結果は高橋ら<sup>33-34)</sup>、山本ら<sup>37)</sup>の成績と一致した。星ら<sup>10)</sup>はグルコース濃度0.4mM、小西ら<sup>18)</sup>は0.1mMが最適であると報告している。グルコースについては、桑実胚以降の発育に必要なとの報告<sup>12)</sup>があるが、m-SOFにつ

いては、グルコースが無くても胚盤胞が発生し、胚の透明帯からの脱出も行われることが観察できた。

今回の試験において、m-SOFとCR1aaはTCM199にくらべ、胚盤胞の発生率が高く、発生速度も速かった。この理由のひとつとして、グルコースが初期胚に及ぼす発生阻害作用が考えられる。TCM199中には、5.56mMという比較的高い濃度のグルコースが含まれているため、グルコースを含まないm-SOFおよびCR1aaで、高い発生率と速い発生速度を示したと考えられる。

また、m-SOFとCR1aaの比較では、m-SOFの方が高い発生率と、速い発生速度を示した。このことは、培養液の組成の違いによると推測される。SOFは羊卵管の組成をまねて作られているため、胚の発生にCR1aaよりも適していたのではないかと考えられる。

m-SOFおよびCR1aaによって得られた胚の耐凍性は、m-SOFで6日目、7日目、CR1aaで7日目に発生した胚盤胞・拡張胚盤胞で高く、この時期に凍結すれば良いことが判明した。また、少ない例数ではあるが、m-SOFの新鮮胚は、今回、全国水準(40~50%)に比べかなり高くなったTCM199の新鮮胚の受胎率には及ばないものの、移植しても受胎性に問題が無く、実際に使えることがわかった。CR1aa由来の胚は、やや受胎性に劣る可能性がある。

これまで、個体別体外受精については、低い胚盤胞の発生率が課題であった。しかし、m-SOFを個体別の培養に用いることにより、牛1頭あたりで得られる移植可能胚も、以前の約2個から4個へと増加した。このことは、貴重な牛遺伝資源の有効利用につながると思われる。

## 引用文献

- 1) 明田川寛道・中川邦明・佐藤義政(1995): 牛の体外受精技術の確立 III 牛体外胚の発生に及ぼすTaurineの添加効果, 新潟畜試研報, 11, 33-37.
- 2) Baumrucker C.R., Stemberger B.H. (1989), Insulin and insulin-like growth factor-1 stimulate DNA synthesis in bovine mammary tissue in vitro, J. Anim. Sci. 67, 3503-3514.
- 3) Brackett B.G., Oliphant G. (1975), Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro, Biol. Reprod. 12, 260-274.
- 4) Carolan C., Lonergan P., Langendonck V.A., Mermilod P. (1995), Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization in

- vitro, *Therio.* 43, 1115-1128.
- 5) Gardner H.G., Kaye P.L. (1991), Insulin increase cell numbers and morphological development in mouse preimplantation embryos in vitro, *Reprod. Fertil. Dev.* 3, 79-91.
  - 6) Gardner D.K., Lane M., Spitzer A., Batt.P. A., (1994), Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development, *Biol. Reprod.* 50, 390-400.
  - 7) Harvey M.B., Kate P.L. (1992), Insulin stimulates protein synthesis in compacted mouse embryos, *Endocrinol.* 122(3), 1182-1185.
  - 8) Harvey M.B., Kate P.L. (1992), Mediation of the actions of insulin and insulin-like growth factor-1 on preimplantation mouse embryos in vitro, *Mol. Reprod. devel.* 33, 270-275.
  - 9) Heyner S., Rao L.V., Jarett L., Smith R.M. (1989), Preimplantation mouse embryos internalize maternal insulin via receptor-mediated endocytosis: Pattern of uptake and functional correlations, *Dev. Biol.* 134, 48-58.
  - 10) 星宏良 (1995): 無血清培地による牛体外受精卵の生産と移植, 畜産の研究, 49(9), 981-986.
  - 11) 岩田尚孝・岩藤勝彦・内海恭三 (1995): 共培養を用いた体外成熟・体外受精由来牛受精卵の発生に及ぼすタウリンの影響, 日本胚移植学雑誌, 17(2), 102-107.
  - 12) Javed M.H., Wright R.W., Jr. (1991), Determination of pentose phosphate and embden-meyerhof pathway activities in bovine embryos, *Therio.* 35(5), 1029-1037.
  - 13) 梶原豊・後藤和文 (1987): 牛卵胞卵子の体外受精および体外培養によるふ化, 家畜繁殖学雑誌, 33(4), 173-179.
  - 14) 小西英邦・山本喜彦・西本尚武 (1995): S O F・H a m F 10混合培地による牛胚の培養, 和歌山畜試研報, 6, 16-21.
  - 15) 小西英邦・山本喜彦・西本尚武 (1995): 牛初期胚の発生に及ぼすエネルギー源とアミノ酸の影響, 和歌山畜試研報, 6, 22-29.
  - 16) 小西英邦・五島啓普・西本尚武 (1993): S O F Mによる牛胚の完全体外培養系の検討, 和歌山畜試研報, 5, 25-29.
  - 17) 小西正人・青柳敬人 (1994): ウシ体外受精由来胚の胚盤胞への発生に関する合成培地の検討, *J. Reprod. Develop.* 40(5), 1-11.
  - 18) 小西正人・坂倉はつえ・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. Develop.* 40(6), 59-63.
  - 19) 小財千明・高野博・小山圭介 (1993): ウシ卵母細胞の体外成熟・発生培養におけるHypotaurineの添加効果, 奈良畜試研報, 20, 35-39.
  - 20) 小財千明・高野博・小山圭介 (1994): ウシ卵母細胞の体外成熟・体外発生におけるHypotaurineの添加効果, 日本胚移植研究会誌, 1(1), 10-17.
  - 21) 松山浩二・福井豊 (1993): 非共培養によるウシ体外成熟・体外受精卵子の体外発生, 家畜繁殖技術会誌, 15(3), 176-179.
  - 22) McLaughlin K.J., McLean D.M., Stevens G., Ashman R.A., Lewis P.A., Bartsch B.D., Seaman R.F. (1990), Viability of one-cell bovine embryos cultured in synthetic oviduct fluid medium, *Therio.* 33(6), 1191-1199.
  - 23) Miler G.F., Gliedt D.W., Rakes J.M., Rorie R.W. (1994), Addition of penicillamine, hypotaurine and epinephrine (PHE) or bovine oviductal cells (BOEC) alone or in combination to bovine in vitro fertilization medium increases the subsequent embryo cleavage rate, *Therio.* 41, 689-696.
  - 24) 長尾慶和・佐伯和弘・星雅樹・永井政信 (1995): 初期胚の体外培養, *J. Reprod. Develop.* 41(5), 29-36.
  - 25) Petters R.M., Reed M.L. (1991), Addition of taurine or hypotaurine to culture medium improves development of one- and two-cell pig embryos in vitro, *Therio.* 35(1), 253.
  - 26) Reed M.L., Illera M.J., Petters R.M. (1992), In vitro culture of pig embryos, *Therio.* 37(1), 95-109.
  - 27) Rorie R.W., Lester T.D., Gliedt G.F., McNew R.W. (1994), Effects of protein source and co-culture on bovine embryo development in synthetic oviduct fluid medium, *Therio.* 42, 385-395.
  - 28) Rosenblum I.Y., Mattson B.A., Heyner S. (1986), Stage-specific insulin binding in mouse preimplantation embryos, *Dev. Biol.* 116, 261-263.
  - 29) Rosenkrans C. F., Jr, First N. L. (1991), Culture of bovine zygotes to the blastocyst stage:

- effects of amino acids and vitamins, *Therio.*35 (Abstract),266.
- 30) Rosenkrans C. F., Jr, First N. L. (1994), Effect of free amino acids and vitamins on cleavage rate of bovine zygotes in vitro, *J. Anim. sci.*72, 434-437.
- 31) Shi C.Z., Collins H.W., Buettger C.W., Matschinsky F.M. (1994), Insulin family growth factors have specific effects on protein synthesis in preimplantation mouse embryos, *Mol. Reprod. dev.*37,398-406.
- 32) Spider L.J., Alpizar E., Echterkamp S.E. (1993), Effects of insulin, insulin-like growth factor 1, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and (or) insulin-like growth factor 1 production in vitro, *J. Anim. Sci.*71, 1232-1241.
- 33) Takahashi Y., First N.L. (1992), In vitro development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acid and vitamins, *Therio.*37:963-978.
- 34) 高橋芳幸(1995): 限定培地による牛体外受精卵の培養, *日本胚移植学雑誌*,17(1),38-43.
- 35) 高木優二(1993): 牛初期胚の共培養と無血清培養, *家畜繁殖技術会誌*,15(1),37-43.
- 36) Tervit H.R., Whittingham D.G., Rowson L.E. A. (1972), Successful culture in vitro of sheep and cattle ova, *J. Reprod. Fert.*30,493-497.
- 37) 山本信義・油井武・吉羽宣明, 牛初期胚の体外培養技術の確立, 一卵丘細胞との共培養における培地へのグルコースの添加が胚盤胞の発生率に及ぼす影響一, *埼玉畜試研報*,33,1-5.

Studies on Embryo Transfer Techniques in Cattle  
(4) Examination of additives and mediums applying  
to the culture medium following in vitro fertilization.

Hideo SAKAKIBARA, Yasuhiro NISHI, Yukiyoishi YOTANI

**Abstract**

To get higher developing rate to blastocyst at in vitro fertilization of bovine, the effects of additions (taurine and hypotaurine), concentration of glucose (1.5mM, 0.5mM, 0.1 mM, 0 mM), and the sort of mediums (TCM199, m-SOF, CR1aa) were examined. About taurine and hypotaurine, hypotaurine was more effective than taurine. About glucose concentration of m-SOF, the lower concentration was good at higher cleaving rate over 2 cells and higher developing rate to blastocysts. In the evaluation of 3 mediums, m-SOF showed the highest developing rate to blastocysts, the next was CR1aa. About freezing and melting tolerance, 6 to 7 days blastocysts (or expand blastocysts) at m-SOF showed high survival rate. And at CR1aa, 7 days they showed high survival rate.

**Key words** : taurin, hypotaurin, glucose, m-SOF, CR1aa