

1. 発生培地への成長因子添加による体外受精胚発生率向上効果の検討

研究開発第二課 西野 治・安川幸子*

※現 奈良県家畜保健衛生所

要 約

体外受精発生率および発生胚品質の向上のために2種類の成長因子、上皮成長因子(EGF)とインシュリン様成長因子I(IGF-I)を単独または同時に発生培地に添加し、その効果を検討した。試験1として、EGFを0~200ng/ml添加したところ、100ng/mlまで添加量に比例してday8発生率が向上した。試験2として、IGF-Iを0~100ng/ml添加したところ、2ng/ml以上の添加で発生率の向上が確認でき、50ng/ml添加時に最も高い効果が得られた。これらの結果をもとに試験3として、EGF 100ng/mlおよびIGF-I 50ng/mlの同時添加試験を実施した。day 8発生率を比較したところ、成長因子無添加<IGF-I添加 \leq EGF添加<EGF・IGF-I同時添加となったが、5%血清添加に比べると有意に低い成績であった。(17.6~22.8%vs. 39.0%)さらに、試験3では発生胚の品質評価のために胚の二重染色も行って細胞数を計数したところ、有意差はなかったがEGF・IGF-I同時添加で最も多くなった。以上のことから、EGFとIGF-Iはウシ胚の発生率向上効果が、IGF-Iにはウシ胚の細胞数増加による品質向上効果があることが示された。しかし、血清添加と比較して成長因子の添加は、胚品質に関しては同等以上の効果があったものの発生率については及ばなかったことから、今後成長因子以外の添加についても検討する必要がある。

目 的

ウシ体外受精は血清を添加した培地で行うのが一般的であるが、製造ロットによる活性の違いにより発生成績に差が出ることやウイルスや細菌などの汚染の可能性があることなどの理由から、血清を用いない化学的組成の明らかな培地を使用することが望ましい。しかし、血清を使用しない発生培地では発生率が著しく低下することが報告されている¹⁾。これは、詳細は明らかになってはいないが、血清に胚の発育を促進する成長因子やエネルギー基質、微量元素などの物質が含まれているためであると考えられている。

この中で、いくつかの成長因子について、胚発育促進効果を確認するための試験が数多く行われており、上皮成長因子(EGF)を発生培地に添加すると分割率、発生率等が向上すること^{2) 3)}、インシュリン様成長因子I(IGF-I)を発生培地へ添加すると桑実胚率・発生率が向上すること^{4) 5)}が報告されている。また、EGF受容体の一種であるErbB3のmRNAが発生培養の初期(2細胞期まで)と胚盤胞期以降の胚で発現していること⁶⁾や、IGF-Iレセプター(IGF-IR)のmRNAが発生培養の全期間で胚に発現していること^{6) 7)}が報告されている。さらに、IGF-Iではアポトーシス抑制による細胞数の増加効果も報告されている^{8) 9) 10)}ことから、化学的組成の明らかな発生培地での胚生産効率および品質の向上や安定にこれら成長因子が有効であると考えられる。

そこで今回、修正合成卵管液(mSOF)を基礎培地とした化学的組成の明らかな発生培地を用いて、EGFおよびIGF-Iの添加効果を検討した。加えて、EGFとIGF-Iのそれぞれの最適な添加濃度における同時添加効果についても検討した。

なお本研究は、神奈川県・奈良県・山口県・高知県・大分県・宮崎県で実施した共同試験であり、この報告は奈良県実施分データのみを元にして作成した。

材料および方法

①卵子の採取

卵巣は、食肉処理場へと畜処理された黒毛和種肥育牛から採取し、20℃の乳酸加リンゲルに保存して畜産技術センターに持ち帰った後、注射器を用いて直径 2~6mm の卵胞から卵丘細胞-卵子複合体 (COCs) を卵胞液とともに吸引した。吸引液は、0.5%ウシ血清アルブミン (BSA : SIGMA A-4503) 添加修正ダルベッコ PBS (mPBS) の入ったシャーレに移し、COCs を回収した。回収した COCs は、以下のように卵子および卵丘細胞の付着の状態により 6 段階に分類¹⁾ した。

G1 : 透明帯の周囲を卵丘細胞が 4 層以上取り囲んでいる

G2 : 透明帯の周囲に卵丘細胞が 1 ~ 3 層 (放線冠細胞も含む) 付着している

G3 : 卵丘細胞が透明帯の周りに部分的 (1/3 以下) に付着している

G4 : 完全に裸化されている

G5 : 卵丘細胞が膨化している

G6 : 卵丘細胞の付着状態にかかわらず卵細胞質が変性している

このうち、G1 および G2 の COCs を供試した。なお、持ち帰った卵巣は食品衛生検査所で実施された BSE 検査陰性の牛から採取した。

②成熟培養

回収した COCs は、0.5%BSA 添加 mPBS で 3 回洗浄し、0.02AU/ml 卵胞刺激ホルモン (FSH : 共立製薬 アントリン R10)、1µg/ml Estradiol17-β (E₂ : SIGMAE-1132)、0.2mM ピルビン酸 (SIGMAP-2256) および 5% 非働化ウシ胎児血清 (FCS : GIBCO16170-078) 添加 TCM-199 (GIBCO12340-030) (成熟培養用 m199) でさらに 3 回洗浄した後、流動パラフィン (ナカライテスク 26114) でカバーした成熟培養用 m199 のドロップ 100µl に 15~20 個移し、CO₂ インキュベータ (38.5℃、5%CO₂ in air、湿潤) で 20~22 時間培養した。

③媒精

37℃温湯で融解した黒毛和種凍結精液 (大分県有種雄牛精液、試験用として提供頂いた) を、媒精液 (IVF100 : 機能性ペプチド研究所 IFP9630) で 2 回洗浄した後、精子濃度 5×10⁶ に調製して流動パラフィンでカバーした 100µl の精子懸濁液ドロップを作成した。

成熟培養終了後の COCs は IVF100 で 3 回洗浄した後、精子懸濁培養液ドロップに移して CO₂ インキュベータ (38.5℃、5%CO₂ in air、湿潤) で 6 時間培養した。

④発生培養

媒精終了後、COCs を 1mg/ml ポリビニルアルコール (PVA : SIGMAP-8136) 添加 mSOF^{1 2)} に移し、ピペッティングにより卵丘細胞を完全に剥離した。卵子は剥離後直ちに、後述する試験区別の発生培養液で 3 回洗浄後、1 卵子あたり 5µl になるように作成した発生培養液ドロップに移し、マルチ

インキュベータ（38.5℃、5%CO₂・5%O₂・90%N₂、湿潤）で途中の培地交換を行わずに8日間培養した。

⑤試験区および調査項目

【試験1および2】

EGF（SIGMA E-4127）およびIGF-I（SIGMA I-3769）の添加による胚発生率の比較を行った。試験1ではEGFを0、1、10、100、200ng/ml、試験2ではIGF-Iを0、2、10、50、100ng/ml添加したPVA添加m-SOF（PVA-SOF）でそれぞれ発生培養を行い、媒精日をday 0として分割卵子数をday 2に、桑実胚数をday 5に、胚盤胞発生数をday 7およびday 8に計数した。

【試験3】

試験1および2で発生率が最も良かった添加量のEGFとIGF-Iそれぞれの単独添加および両方同時添加、ポジティブコントロールとして5%FCS添加mSOF（FCS-SOF）、ネガティブコントロールとして成長因子無添加のPVA-SOFでそれぞれ発生培養を行った。媒精日をday 0として分割卵子数をday 2に、桑実胚数をday 5に、胚盤胞発生数をday 7およびday 8に計数した。

また、一部のday 8胚盤胞はThomasらの方法¹³⁾に従い、内細胞塊（ICM）と栄養膜細胞（TE）を核膜透過性の違いを利用して2色に染色した。すなわち、発生した胚を0.2% Triton X-100（SIGMA X-100）、0.1mg/mlヨウ化プロピジウム（SIGMA P-4170またはP-4864）添加PBS(-)に室温で60秒間浸漬後、ただちに25μg/ml Hoechst33342（SIGMA B-2261）添加エタノール（和光純薬工業（株）057-00456）に移して4℃で3時間、染色および固定を行った。固定した胚はグリセリン（SIGMA G-2025）で洗浄し、少量のグリセリンとともにスライドグラスに移してカバーガラスで封入後、落射蛍光装置（ニコン TMD-EF2、330~380nmの励起フィルタ、400nmの吸収フィルタ）を装着した倒立顕微鏡（ニコン DIAPHOT-TMD）で観察し、ICMとTEそれぞれの細胞数を計数した。

⑥統計処理

統計処理は、分散分析の後TukeyのHSD法による多重検定を行った。（有意水準5%）ただし、発生率等の割合は%の数値をアークサイン変換した後に統計処理した。

結果

【試験1】

試験1の培養成績は表1の通りであった。PVA-SOFへのEGFの添加は、分割率に影響を及ぼさな

表1 EGFの添加効果

EGF濃度 (ng/ml)	試験 回数	供試 卵子数	分割率 ¹⁾ (%)	桑実胚率 ¹⁾ (%)	発生率 ¹⁾ (%)			
					day 7		day 8	
0	6	150	78.09 ± 4.11	30.34 ± 2.90	8.38 ± 2.33	11.14 ± 3.24		
1	6	147	79.62 ± 4.27	35.56 ± 5.48	8.59 ± 1.30	13.21 ± 2.60		
10	6	150	78.44 ± 3.67	37.23 ± 4.88	12.85 ± 1.53	15.13 ± 2.02		
100	6	143	79.47 ± 3.30	41.11 ± 6.25	15.40 ± 3.43	17.68 ± 3.35		
200	6	151	78.37 ± 2.83	36.90 ± 4.33	16.23 ± 1.85	18.38 ± 2.28		

1) mean±SEM

かった。発生率は添加量の増加に伴って高くなり、day 7 発生率では 10ng/ml、day 8 発生率では 1ng/ml の添加量以上で向上する傾向がみられたが有意差はなかった。

【試験 2】

試験 2 の培養成績は表 2 の通りであった。PVA-SOF への IGF-I の添加により、day 2 分割率が向上 (50ng/ml 以上・有意差はなし) し、桑実胚率が有意に向上 (100ng/ml) した。また、day 8 発生率は IGF 50ng/ml 以上添加で無添加に比べて有意に向上した。

表 2 IGF-I の添加効果

IGF-I 濃度 (ng/ml)	試験回数	供試卵子数	分割率 ¹⁾ (%)	桑実胚率 ¹⁾ (%)	発生率 ¹⁾ (%)			
					day 7		day 8	
0	4	103	79.05 ± 3.78	36.49 ^a ± 2.55	4.55 ± 1.76	12.12 ^a ± 3.56		
2	4	104	79.61 ± 2.72	42.03 ^{ab} ± 4.97	10.80 ± 3.85	20.16 ^{ab} ± 1.69		
10	4	103	79.19 ± 1.90	40.22 ^{ab} ± 3.71	10.38 ± 4.98	18.76 ^{ab} ± 3.65		
50	4	106	85.38 ± 5.98	42.50 ^{ab} ± 3.70	11.29 ± 3.87	25.63 ^b ± 5.67		
100	4	106	89.38 ± 4.13	49.60 ^b ± 3.65	5.65 ± 1.94	24.44 ^b ± 4.28		

1) mean ± SEM

2) 同列異符号間に有意差あり

【試験 3】

試験 3 の培養成績は表 3 の通りであった。桑実胚率・day 7 および day 8 発生率は 5%FCS 区が有意に高かった。5%FCS 区を除く 4 試験区には有意差はなかったが、桑実胚率および day 8 発生率は EGF と IGF-I を同時に添加した区が高く、次いで EGF・IGF-I それぞれの片方添加区、無添加区の順に低くなる傾向を示した。

表 3 EGF と IGF-I の同時添加効果

EGF 濃度 (ng/ml)	IGF-I 濃度 (ng/ml)	試験回数	供試卵子数	分割率 ¹⁾ (%)	桑実胚率 ¹⁾ (%)	発生率 ¹⁾ (%)			
						day 7		day 8	
0	0	6	157	71.13 ^{ab} ± 3.09	30.39 ^a ± 1.85	13.42 ^a ± 2.98	17.58 ^a ± 3.42		
100	0	6	153	65.66 ^a ± 2.67	31.42 ^a ± 5.11	13.47 ^a ± 3.10	19.62 ^a ± 2.46		
0	50	6	154	73.61 ^{ab} ± 3.20	39.85 ^{ab} ± 2.84	10.69 ^a ± 2.02	18.61 ^a ± 2.33		
100	50	6	154	75.58 ^b ± 3.82	37.81 ^{ab} ± 3.72	16.64 ^a ± 2.90	22.83 ^a ± 3.15		
	5% FCS ³⁾	6	142	64.52 ^{ab} ± 3.31	44.06 ^b ± 3.61	34.71 ^b ± 2.94	39.04 ^b ± 2.77		

1) mean ± SEM

2) 同列異符号間に有意差あり

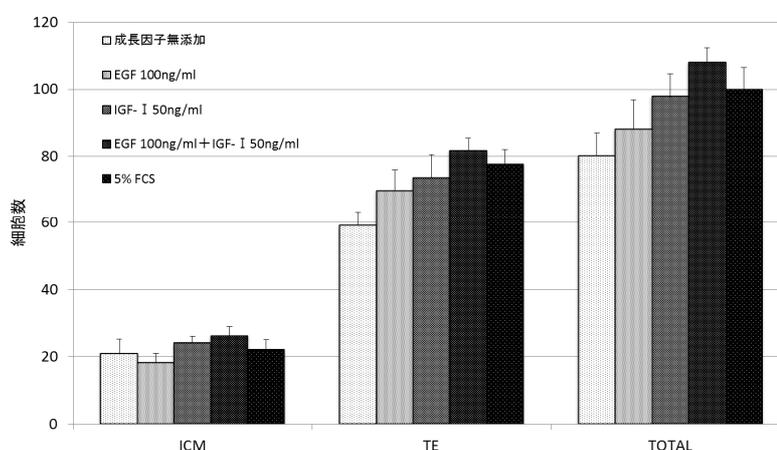
3) 5%FCS区は、成長因子の代わりに5%血清を添加

細胞数計数結果は、ICM・TE とともに両方添加区が最も多くなった。(図 1) 次いで IGF-I 添加区と 5%FCS 区が同程度で、EGF 添加区、無添加区と少なくなったが、有意差はなかった。

考 察

EGF や IGF-I などの成長因子は“成長が許可されている”ことを他の細胞に伝達するシグナルとして働く小さなタンパク質で、通常成長

図 1 試験 3 細胞数結果



領域の細胞から放出され、放出した細胞自身やその近隣の細胞の受容体に結合し、細胞分裂などの成長に必要とされる変化を引き起こす。発生培養の期間は、細胞分裂により卵子から胚へと成長していく期間であり、また、添加することで発生成績が向上する血清にも成長因子が微量含まれていることが知られていることから、発生培地への成長因子添加試験が多くの研究者によって実施されている。それらの報告で発生率向上を表すデータが示されている^{2)~5)}が、本試験では我々が発生培地の基礎培地として普段使用している mSOF^{1,2)} と EGF、IGF-I を用いて同様の試験を行い、さらにその試験で得られた、それぞれの最も効果の高い添加濃度における同時添加の効果を検証した。

EGF については、Lonergan ら²⁾ や Mtango ら³⁾ の報告と同じ 10ng/ml で、有意差はないものの発生率の向上が認められ、さらに、かなり高濃度の 200ng/ml まで添加量の増加にともなって発生率が向上した(試験 1)。一方、分割率については発生率とは異なり EGF の添加の影響はなかった。Yoshida らの報告⁶⁾ によると、媒精終了から媒精後 24 時間までの間は EGF および EGF レセプターの一種 “ErbB3” の mRNA がともに発現していることから、発生培養初期は EGF を添加しなくても体外受精により受精した卵子自ら EGF を分泌して細胞分裂がある程度促進されるのではないかと推察される。これに対し、媒精後の時間が経過し、発育が停止して死んでしまう卵子が増えてくると、添加した成長因子が EGF の分泌量の減少を補う形で作用し、発生培養の中～後期に EGF 添加効果が現れてきて、day7 発生率が向上する傾向となった今回の結果につながった可能性が考えられる。

IGF-I については、分割率は 50ng/ml 以上、発生率は 2ng/ml 以上と若干の違いはあるが、ともに一定の向上効果が認められた(有意差はなし：試験 2)。Yaseen ら⁷⁾ は、発生培養期の胚では IGF-I の mRNA が発現しておらず、通常は子宮や卵管からの分泌に頼っていることや、IGF-I R mRNA は発生培養の全期間の胚で発現しているが桑実胚期までは少しずつ減少し、胚盤胞期で急増することを報告している。すなわち、IGF-I は EGF とは異なり胚からの自己分泌はないが、IGF-I のシグナルを受け取る受容体を胚は持っており、したがって IGF-I の添加が分割率・発生率の向上に影響を与えたと考えられる。

試験 1 と 2 の結果から、EGF は 100~200ng/ml、IGF-I は 50~100ng/ml と既報に比べて高い濃度において発生成績が最も良く、かつほぼ横ばいになったと考えられた。このことは、ErbB3 や IGF-I R が飽和状態になった可能性を示していること、また成長因子の相互効果も考慮して、試験 3 での両成長因子の添加濃度は EGF 100ng/ml、IGF-I 50ng/ml とし、同時に血清添加での成績との比較も行った。試験 3 では、血清添加を行った試験区の発生率が有意に高くなり、このことは今回使用した 2 種類の成長因子の添加だけでは十分な生産性が得られないことを示唆している。逆に、血清添加は分割率を低下させる結果も示し、血清中には胚の成長を阻害させる物質が含まれている可能性も考えられた。今回は分割率低下・発生率向上であったことから、発生培養の後半にはエネルギー基質として胚の成長を促すが前半に有害な作用をもたらすグルコース^{1,4)} が原因の一つとして考えられるが、その他の因子・物質の関与によるものかもしれない。一方、血清添加を除く 4 つの試験区の比較では同時添加区が最も良好な成績で、両成長因子の発生培地への添加に相加効果がある可能性が示されたが、統計学的な差がなかったため、供試回数を増やして検証する必要がある。

さらに、試験 3 では発生成績の調査のほか、胚品質の評価として細胞数計測も実施したが、EGF、IGF-I ともに無添加区よりも増加するという結果になった。また、同時添加区の細胞数と無添加および単独添加区の細胞数の比較から、EGF と IGF-I には相加効果があることが示された。これは EGF が主

に細胞分裂促進効果、IGF-I がアポトーシス抑制効果と、いずれも細胞数の増加につながる異なる効果を持っているためと考えられる。さらに同時添加区が血清添加区よりも細胞数が増加していたことから、品質面において成長因子添加の有用性が大きいと考えられる。

以上のことから、EGF と IGF-I に一定の胚生産向上効果が認められたものの、さらにこれらに加えて他の成長因子やエネルギー基質、微量元素などの使用も検討すべきと考えられる。

謝 辞

本研究の実施にあたりご助言・ご指導・ご協力頂きました(独)家畜改良センターの諸先生方、および各県の共同研究者の皆様に深謝いたします。また、卵巣採取にご協力頂きました奈良県食肉公社ならびに食肉流通センターの関係者の皆様に御礼申し上げます。

参考文献

- 1) **Pinyopummintr T. , Bavister B.D.** : In vitro-matured/in vitro-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined,protein-free culture media.Biol. Reprod. 45 736-742(1991)
- 2) **Lonergan P. , Carolan C. , Langendoncht A. , Donnay I. , Khatir H. , Mermillod P.** : Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro.Biol. Reprod. 54 1420-1429(1996)
- 3) **Mtango N.R. , Varisanga M.D. , Dong Y.J. , Rajamahendran R. , Suzuki T.** : Growth factors and growth hormone enhance in vitro embryo production and post-thaw survival of vitrified bovine blastocysts.Theriogenology 59 1393-1402(2003)
- 4) **Matsui M. , Takahashi Y. , Hishinuma M. , Kanagawa H.** : Insulin and Insulin-like Growth Factor-I stimulate the development of bovine embryos fertilized in vitro.J. Vet. Med. Sci. 57 1109-1111(1995)
- 5) **Moreira F. , Paula-Lopes F.F. , Hansen P.J. , Badinga L. , Thatcher W.W.** : Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of in vitro derived bovine embryos.Theriogenology 57 895-907(2002)
- 6) **Yoshida Y. , Miyamura M. , Hamano S. , Yoshida M.** : Expression of growth factor ligand and their receptor mRNAs in bovine ova during in vitro maturation and after fertilization in vitro.J. Vet. Med. Sci. 60 549-554(1998)
- 7) **Yaseen M.A. , Wrenzycki C. , Herrmann D. , Carnwath J.W. , Niemann H.** : Changes in the relative abundance of mRNA transcripts for insulin-like growth factor (IGF-I and IGF-II) ligands and their receptors (IGF-IR / IGF-IIR) in preimplantation bovine embryos derived from different in vitro systems.Reproduction 122 601-610(2001)

- 8) **Spanos S. , Becker D.L. , Winston R.M.L. , Hardy K.** : Anti-apoptotic action of Insulin-like growth factor-I during human preimplantation embryo development. *Biol. Reprod.* 63 1413-1420(2000)
- 9) **Herrler A. , Krusche C.A. , Beier H.M.** : Insulin and Insulin-like growth factor-I promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. *Biol. Reprod.* 59 1302-1310(1998)
- 10) **Makarevich A.V. , Markkula M.** : Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with Insulin-like growth factor I during in vitro maturation and culture. *Biol. Reprod.* 66 386-392(2002)
- 11) **阪口慎一、井口光国、小林直彦、藤谷泰裕、三溝成樹、内海恭三** : 超音波診断装置を利用した繁殖不適和牛からの連続経膈採卵 *日本胚移植学雑誌* 17(2) 94-101 (1995)
- 12) **Takahashi Y, First N. L.** : In vitro development of bovine one-cell embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 37 963-978 (1992)
- 13) **Thouas G.A. , Korfiatis N.A. , French A.J. , Jones G.M. , Trounson A.O.** : Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. *Reprod. BioMed. Online* 3 25-29(2001)
- 14) **Kim J.H. , Funahashi H. , Niwa K. , Okuda K.** : Glucose requirement at different developmental stages of in vitro fertilized bovine embryos cultured in semi-defined medium. *Theriogenology* 39 875-886 (1993)