

無血清合成卵管液への上皮成長因子及びインスリン様成長因子-Iの添加がウシ体外発育胚の胚盤胞発生率に及ぼす効果

坂上信忠・西田浩司・秋山 清

Effect of Epidermal Growth Factor and Insulin-like Growth Factor-I on Development of Bovine Embryos *in-vitro*

Nobutada SAKAGAMI, Koji NISHIDA and Kiyoshi AKIYAMA

と畜場由来卵巣から採取したウシ卵子を体外受精し、血清やウシ血清アルブミンを添加しない化学的合成培地 (SOFaa-PVA) を用いて発生培養を行い、上皮成長因子(EGF) およびインスリン様成長因子-I (IGF-I) が胚の発育に及ぼす効果を検討した。試験 1 では、SOFaa-PVA に EGF を 0～200 ng/ml 添加し、試験 2 では、SOFaa-PVA に IGF-I を 0～100 ng/ml 添加した。その結果、媒精後 8 日目の胚盤胞発生率は、試験 1 では EGF100 ng/ml 添加区で 39.4%、試験 2 では IGF-I 50 ng/ml 添加区で 40.9%であり、それぞれの試験の無添加区(23.3%、26.3%)と比較して高まり、IGF-I 50 ng/ml 添加区では胚盤胞の細胞数が有意に増加した。また、胚盤胞の細胞数と呼吸量は有意な正の相関を示した。試験 3 では、EGF 100 ng/ml、IGF-I 50 ng/ml を同時添加(SOF-EGF+IGF)し、単独添加、無添加と比較したところ、無添加区(12.0%)と比較して有意に高い胚盤胞発生率(33.8%)であった。試験 4 では黒毛和種牛から経膈採卵によって得た卵子を用いたところ、媒精後 8 日目の胚盤胞発生率は、SOF-EGF+IGF 区において無添加区より高い数値であり、発生した胚盤胞を受胎牛へ移植したところ、正常な産子を得ることができた。

キーワード：ウシ・胚・化学的合成培地・呼吸量・成長因子

一般的にウシ体外発育胚を生産する際は、培養液にウシ胎子血清を添加するが、血清のロットにより胚盤胞発生率に違いがあることが知られている。そのため、より安定した胚生産を行うためには、血清を添加しない化学的組成の明らかな培地での培養が望ましい。

しかし、血清や牛血清アルブミン (BSA) を添加しない化学的組成の明らかな培地は、それらを添加した培地に比べて胚盤胞発生率が低いことが報告されている (Pinyopummintr と Bavister 1991; Krisher ら 1999)。これは、胚盤胞へ発生するための促進物質が血清に含まれているからではないかと考えられる (Matsui ら 1995)。この促進物質としては、成長因子、エネルギー基質、微量元素、糖タンパク、ホルモンなど様々な物質が挙げられており、無血清培地での発生率の改善を図る試みとして、それらを添加した報告が数多くある (Matsui ら 1995;

Lonergan ら 1996; Sirisathien と Brackett 2003)。

成長因子の一つである上皮成長因子 (epidermal growth factor : EGF) は、ウシではそのレセプターである ErbB1 は確認されていないが、EGF レセプターの subfamily である ErbB3 は 2 細胞期までと胚盤胞期に確認されており (Yoshida ら 1998)、成熟培地や発生培地への添加で胚盤胞発生率が向上したことが報告されている (Lonergan ら 1996; Sirisathien と Brackett 2003)。一方、インスリン様成長因子 I (insulin-like growth factor-I:IGF-I) は、ウシ卵子から胚盤胞の各発育段階においてそのレセプターが確認されており (Yoshida ら 1998)、人 (Spanos ら 2000) やウサギ (Herrler ら 1998)、ウシ (Sirisathien ら 2003; Moreira ら 2002) において胚発生率を向上させることや、アポトーシスを抑える働きがある (Sirisathien と Brackett 2003) ことが報告されている。

そこで、本試験では安定した胚生産技術を確認するため、と畜場由来卵巣から採取したウシ卵子の体外受精後の発生培養において、血清を添加しない合成卵管液 (SOFaa) を基礎培地として、EGF、IGF-I の添加効果を検討した。そして EGF、IGF-I を添加した培地を用い、経膈採卵によって生体から回収した卵子を培養し、発生率等を調査し、発生した胚を受胎牛に移植して正常な産子が得られるかを検討した。

材料及び方法

1. と畜場卵巣の採取と卵丘細胞卵子複合体の形態的評価

と畜場で採取した卵巣は、BSE 検査終了後に実験室に輸送し、18G の針をつけた 10ml 注射筒で直径 3 ~ 5 mm の卵胞から卵丘細胞卵子複合体 (COCs) を採取し、卵丘細胞の付着状態等によって Sakaguchi ら (1995) の報告に従い、6 段階のグレード (G1 ~ G6) に分類した。試験 1 ~ 3 では、G1、G2 の COCs を、試験 4 では G1 ~ G4 の COCs を使用した。

2. 体外成熟、体外受精および体外培養

成熟培養 (IVM) は 0.02 mg/ml FSH (アントリン R・10、共立製薬 (株)) と 1 µg/ml Estradiol-17β および 0.2 mM ピルビン酸を加えた 5% 非働化ウシ胎子血清添加 TCM-199 を用いた。採取した COCs は同培養液で 3 回洗浄し、ミネラルオイルでカバーした同培養液 (100 µl ドロップに 15 ~ 20 個ずつ) に入れ、CO₂ インキュベーター (38.5°C、5% CO₂、in air、湿潤) 内で 20 ~ 22 時間 IVM した。体外受精 (IVF) は市販培地の IVF100 ((株) 機能性ペプチド研究所) と、同一日に採精した凍結黒毛和種精液を使用した。37°C 温湯で融解した精液を IVF100 で 2 回遠心洗浄後 (2,000 G、5 ~ 6 分、38°C)、精子濃度 1×10^7 /ml に調整し、精子浮遊液ドロップとした。IVM 後の COCs を IVF100 で洗浄後、精子浮遊液ドロップに入れ最終精子濃度 5.0×10^6 /ml とし、CO₂ インキュベーター内で 6 時間 IVF を行った (100 µl ドロップに 20 個ずつ)。COCs は IVF 後にピペッティングにより卵丘細胞を剥離し、2% (v/v) 必須アミノ酸、1% (v/v) 非必須アミノ酸を加え、BSA の代わりに 1 mg/ml PVA を添加したグルコース無添加の修正合成卵管液 (以下 SOFaa-PVA) (Takahashi と First 1992) に移し、5% CO₂、5% O₂、90% N₂、38.5°C の条件下で体外培養 (IVC) を行った (100 µl ドロップに 20 個ずつ)。IVF 後 48 時間目に 2 細胞期以上に分割した胚を計

数し、分割率を算出した後、IVF 後 8 日目 (Day8) まで培地交換を行わずに培養し、胚盤胞発生率を調査した。

3. 胚盤胞の二重染色

一部の胚盤胞は Thouas ら (2001) の方法により内細胞塊 (ICM) と栄養外胚葉 (TE) の膜透過性の違いを利用して細胞を染め分けた。胚盤胞は 0.2% (v/v) Triton X-100 と 0.1 mg/ml の propidium iodide を含む PBS に 60 秒間静置し、次に、25 µg/ml bisBenzimide を添加した 100% エタノールに移し、遮光して 4°C に 3 時間以上保存して固定と染色を行った。染色後、胚をグリセリンで数回洗浄し、グリセリンとともにスライドガラスへ載せ、カバーガラスで封入した。染色した胚の観察は蛍光装置を接続した倒立顕微鏡 (TE-300, ニコン) により実施した。U 励起波長のフィルター (365 nm の励起波長、400 nm のバリアフィルター) で観察し、青色で染まった ICM の核と、ピンク色に染まった TE の核をそれぞれ計数した。

4. 呼吸量の測定

胚盤胞の呼吸量 (酸素消費量) は受精卵呼吸測定装置 (HV-405, 機能性ペプチド研究所) により Abe ら (2004) の方法に準じて測定した。測定液 (ERAM-2) で満たした測定プレート (RAP-1) 内の円錐形ウェルの底部に胚を静置した後、白金微小電極を胚近傍に移動した。白金微小電極を、酸素が還元可能な -0.6 V vs Ag/AgCl に電位を保持した後、移動速度 30 µm/sec、走査距離 160 µm の条件に設定し、コンピューター制御により透明帯直近を Z 軸 (上下) 方向に自動的に走査した。胚近傍の異なる 2 箇所を白金微小電極で走査し呼吸量を測定した。胚盤胞の呼吸量は球面拡散理論式 (Shiku ら 2004) に基づき、専用の解析ソフトを用いて算出した。

5. 経膈採卵および移植

経膈採卵は、Tagawa ら (2008) の手法により超音波画像診断装置 (ECHOPAL II、(株) 日立メディコ) と 6.5 MHz の探触子および採卵用針 (COVA Needle、ミサワ医科工業 (株)) を用いて行った。黒毛和種経産牛を柵場に保定し尾椎硬膜外麻酔を施し、超音波画像診断装置の探触子を膈内に挿入し、卵巣内の卵胞数を確認した後、採卵用針を卵巣に穿刺し、卵胞卵採取用吸

引器（NFM412、富士平工業（株））を使用して卵胞液を1%子牛血清及び10 IU/mlへパリン添加乳酸加リンゲル液を入れた遠心管に吸引採取した。採取した卵胞液はエムコンフィルターで濾過した後に、実体顕微鏡下でCOCsを検索した。

採取したCOCsにIVM、IVF、IVCを行い発育した胚盤胞を、発情確認後翌日に排卵を確認し7日後に排卵側卵巣に黄体を有する受胎牛に移植した。受胎確認は移植後35～40日と60日に2回、超音波画像診断装置を用いて行った。

6. 試験計画

本試験では、EGF、IGF-IのSOFaa-PVA培地への添加効果の検討（試験1～3）を行い、最適の組み合わせのEGF、IGF-I濃度を設定し、最終的に完成した培地を用いて、経膈採卵由来卵子から作出した胚の移植を行った（試験4）。

（1）SOFaa-PVAへのEGF添加による効果の検討（試験1）

SOFaa-PVAにEGFを0、1、10、100、200 ng/ml添加し、Day8に発生した胚盤胞の発生率を調査した。一部の胚で細胞数を計数した。EGFは、最終濃度10 ng/μlのストック液を作成し、成長因子低吸着性の凍結保存チューブ（MS-4265M、住友ベークライト（株））にいれ、-20℃で凍結保存し、試験に使用した。

（2）SOFaa-PVAへのIGF-I添加による効果の検討（試験2）

SOFaa-PVAにIGF-Iを、0、2、10、50、100 ng/ml添加し、Day8に発生した胚盤胞の発生率を調査し、一部の胚で細胞数を計数した。IGF-Iは、ストック液濃度を1 ng/μlとし、-20℃で凍結したものを、試験に使用した。

（3）SOFaa-PVAへのEGFとIGF-I同時添加による効果の検討（試験3）

SOFaa-PVAに試験1、2の結果から相乗効果を考慮して、EGF100 ng/mlまたはIGF-I 50 ng/ml

を単独または混合添加した区（SOF-EGF+IGF-I区）と無添加、5%ウシ胎子血清添加（5%FBS）区を比較した。試験1、2と同様に、一部の胚で細胞数を計数した。

（4）経膈採卵由来卵子を用いた培養におけるEGF、IGF-Iの同時添加の検討（試験4）

黒毛和種牛から経膈経路で卵子を採取し、IVM、IVF後にSOFaa-PVA区、SOF-EGF+IGF-I区および5%FBS区の比較培養を行った。作出された胚盤胞の一部を受胎牛（ホルスタイン種および黒毛和種）に移植し、正常な産子が得られるかを調査した。

7. 統計処理

データの統計処理は、コンピューター統計処理ソフトSPSSを用いた。分割率、胚盤胞発生率はあらかじめ角変換を行い、一元配置の分散分析を用いて検定後にFisherのPLSD法により多重比較を行った。細胞数と呼吸量の相関については、ピアソンの相関係数を利用した。受胎率の比較は、フィッシャーの直接確率法で行った。有意差水準は5%とした。

結果

（1）試験1では、EGFの添加濃度が高まるにつれてDay8の胚盤胞発生率は高まった（表1）が、胚直径、呼吸量及び細胞数に有意差は認められなかった（表2）。

（2）試験2では、Day7およびDay8の胚盤胞発生率でIGF-I 50 ng/ml添加区が、他の区と比較して有意に高い値を示した（表3）。また、胚直径、呼吸量及び細胞数はIGF-I濃度が高まるにつれて増加し、呼吸量及び総細胞数においては、IGF-I 50、100 ng/ml添加区が、無添加区と比較して有意に高い値を示した（表4）。

表1 上皮成長因子（EGF）が発生成績に及ぼす影響

| | 供試卵数 | 分割率 (%) | 桑実胚率 (%) | 胚盤胞発生率 (%) | | |
|------------------|------|---------|----------|------------|-------|--------------------|
| | | | | Day 6 | Day 7 | Day 8 |
| EGF 無添加区 | 60 | 88.3 | 43.3 | 11.7 | 13.3 | 23.3 ^a |
| EGF 1 ng/ml添加区 | 105 | 83.1 | 38.2 | 15.3 | 16.3 | 22.8 ^a |
| EGF 10 ng/ml添加区 | 103 | 87.8 | 33.3 | 8.7 | 19.2 | 13.2 ^a |
| EGF 100 ng/ml添加区 | 101 | 84.3 | 30.2 | 19.4 | 28.4 | 39.4 ^{ab} |
| EGF 200 ng/ml添加区 | 103 | 84.5 | 40.5 | 21.6 | 35.0 | 49.6 ^b |

^{a-b} : 異符号間に有意差有り (P<0.05)

表2 上皮成長因子 (EGF) が胚直径、呼吸量及び細胞数に及ぼす影響

| | 胚直径 (μm) | 呼吸量 ($\times 10^{-14}\text{mol/s}^{-1}$) | 細胞数 | | |
|------------------|--------------------------|---|-------|------|-------|
| | | | 総細胞数 | 内細胞塊 | 栄養外胚葉 |
| EGF 無添加区 | 180.0 | 0.75 | 108.0 | 26.0 | 82.0 |
| EGF 1 ng/ml添加区 | 170.0 | 0.85 | 103.3 | 29.7 | 73.7 |
| EGF 10 ng/ml添加区 | 164.0 | 0.62 | 95.0 | 24.5 | 70.5 |
| EGF 100 ng/ml添加区 | 191.3 | 0.74 | 116.4 | 27.2 | 89.2 |
| EGF 200 ng/ml添加区 | 190.0 | 0.73 | 114.0 | 28.2 | 85.8 |

表3 インスリン様成長因子-I (IGF-I) が発生成績に及ぼす影響

| | 供試 卵数 | 分割率 (%) | 桑実胚率 (%) | 胚盤胞発生率(%) | | |
|--------------------|----------|------------|-------------|-----------|-------------------|-------------------|
| | | | | Day 6 | Day 7 | Day 8 |
| IGF-I 無添加区 | 60 | 81.8 | 32.4 | 4.0 | 13.4 ^a | 26.3 ^a |
| IGF-I 2 ng/ml添加区 | 105 | 82.2 | 30.4 | 5.5 | 15.8 ^a | 20.3 ^a |
| IGF-I 10 ng/ml添加区 | 103 | 83.7 | 30.1 | 6.7 | 19.8 ^a | 24.8 ^a |
| IGF-I 50 ng/ml添加区 | 101 | 85.9 | 40.9 | 13.8 | 33.3 ^b | 40.9 ^b |
| IGF-I 100 ng/ml添加区 | 103 | 84.7 | 40.4 | 8.6 | 20.1 ^a | 27.0 ^a |

^{a-b}: 異符号間に有意差有り (P<0.05)

表4 インスリン様成長因子-I (IGF-I) が胚直径、呼吸量及び細胞数に及ぼす影響

| | 胚直径 (μm) | 呼吸量 ($\times 10^{-14}\text{mol/s}^{-1}$) | 細胞数 | | |
|--------------------|--------------------------|---|--------------------|-------------------|--------------------|
| | | | 総細胞数 | 内細胞塊 | 栄養外胚葉 |
| IGF-I 無添加区 | 157.0 ^a | 0.49 ^a | 83.9 ^a | 26.1 ^a | 57.8 ^a |
| IGF-I 2 ng/ml添加区 | 171.6 ^{ab} | 0.79 ^{ab} | 94.5 ^a | 24.8 ^a | 69.7 ^{ab} |
| IGF-I 10 ng/ml添加区 | 182.0 ^b | 0.95 ^b | 99.7 ^{ab} | 27.1 ^a | 78.7 ^b |
| IGF-I 50 ng/ml添加区 | 178.2 ^{ab} | 0.86 ^b | 118.4 ^b | 36.1 ^b | 82.3 ^b |
| IGF-I 100 ng/ml添加区 | 187.3 ^b | 1.00 ^b | 119.1 ^b | 36.2 ^b | 82.9 ^b |

^{a-b}: 異符号間に有意差有り (P<0.05)

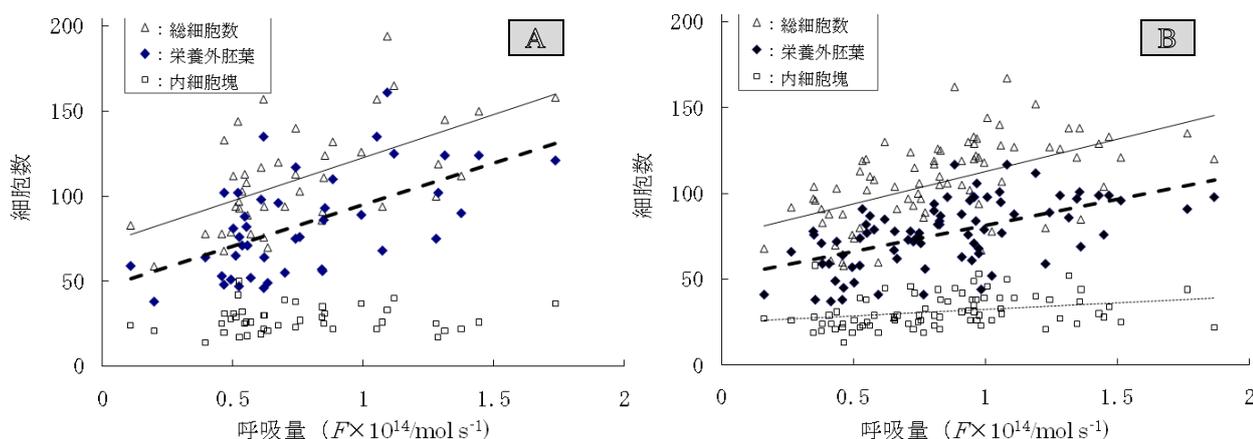


図1 媒精後8日目の胚盤胞の呼吸量と細胞数との関係

Aは試験1、Bは試験2を示す。

A: 総細胞数、栄養外胚葉細胞数において呼吸量と有意な相関が認められた。

(総細胞数: $p < 0.01, r = 0.581$, 栄養外胚葉細胞数: $P < 0.01, r = 0.575$)

B: 総細胞数、栄養外胚葉、内細胞塊細胞数において呼吸量と有意な相関が認められた。

(総細胞数：p<0.01, r=0.540、栄養外胚葉細胞数：P<0.01, r=0.555、内細胞塊細胞数：P<0.05, r=0.284)

Day8の胚盤胞の呼吸量と内細胞塊細胞数、栄養外胚葉細胞数、総細胞数との関係を図1に示した。試験1、試験2共に呼吸量が高い胚ほど細胞数が多くなり、胚の呼吸量と細胞数との間に正の相関が認められた。試験1では、呼吸量と総細胞数および栄養外胚葉細胞数との間において相関が認められ(総細胞数：p<0.01, r=0.581、栄養外胚葉細胞数：P<0.01, r=0.575)、試験2では、呼吸量と総細胞数、栄養外胚葉細胞数および内細胞塊細胞数との間において相関が認められた(総細胞数：p<0.01, r=0.540、栄養外胚葉細胞数：P<0.01, r=0.555、内細胞塊細胞数：P<0.05, r=0.284)。

(3) 試験3では、SOF-EGF+IGF区において、無添加区と比較して有意に高い胚盤胞発生率を示した(表5)が、細胞数(表6)では有意な差は認められなかった。

(4) 試験4では、経膈採卵由来卵子を用いて、SOF-EGF+IGFで培養したところ、Day7の胚盤胞発生率において、SOF-EGF+IGF区では、無添加より高い数値であったが有意差は認められなかった(表7)。また、5%FBS区はDay7において無添加区及びSOF-EGF+IGF区と比較して有意に高い胚盤胞発生率であった。

5%FBS区では、Day7にほとんどの胚が胚盤胞から拡張胚盤胞に発育したことから、Day7の胚を供胚牛に移植した。無血清培地では、Day8で胚盤胞から拡張胚盤胞に発育したので、Day8の胚を移植した。その結果、SOF-EGF+IGF区から、正常な産子を得ることができ、生時体重(36.0kg)、妊娠期間(286.5日)も5%FBS区(35.3kg、289.0日)と差は認められなかった(表8)。

表5 EGF、IGF-Iの添加が発生成績に及ぼす影響

| | 供試卵数 | 分割率(%) | 桑実胚率(%) | 胚盤胞発生率(%) | | |
|-------------------|------|--------|---------|-------------------|--------------------|--------------------|
| | | | | Day 6 | Day 7 | Day 8 |
| 成長因子無添加区 | 80 | 61.5 | 23.2 | 0.0 ^a | 4.8 ^a | 12.1 ^a |
| EGF 100 ng/ml添加区 | 80 | 81.3 | 25.0 | 0.0 ^a | 15.0 ^a | 25.0 ^{ab} |
| IGF-I 50 ng/ml添加区 | 80 | 71.8 | 19.4 | 0.0 ^a | 18.4 ^{ab} | 28.8 ^{ab} |
| SOF-EGF+IGF*区 | 80 | 75.0 | 26.3 | 0.0 ^a | 20.0 ^{ab} | 33.8 ^b |
| 5%FBS区 | 100 | 81.7 | 24.2 | 17.3 ^b | 31.2 ^b | 41.1 ^b |

^{a-b}：異符号間に有意差有り(P<0.05)

*：EGFを100 ng/ml、IGF-Iを50 ng/ml添加

表6 EGF、IGF-Iの添加が胚直径、呼吸量及び細胞数に及ぼす影響

| | 胚直径(μm) | 呼吸量(×10 ⁻¹⁴ mol/s ⁻¹) | 細胞数 | | |
|-------------------|---------|--|-------|------|-------|
| | | | 総細胞数 | 内細胞塊 | 栄養外胚葉 |
| 成長因子無添加区 | 186.7 | 1.42 | 86.3 | 21.5 | 65.3 |
| EGF 100 ng/ml添加区 | 169.2 | 1.42 | 112.2 | 34.6 | 77.6 |
| IGF-I 50 ng/ml添加区 | 192.5 | 1.44 | 100.5 | 31.5 | 69.0 |
| SOF-EGF+IGF*区 | 184.0 | 1.47 | 97.5 | 41.3 | 56.2 |
| 5%FBS区 | 167.5 | 1.23 | 111.6 | 39.2 | 72.4 |

*：EGFを100 ng/ml、IGF-Iを50 ng/ml添加

表7 EGF、IGF-Iの添加が経膈由来卵子の発生成績に及ぼす影響

| | 供試卵数 | 分割率(%) | 桑実胚率(%) | 胚盤胞発生率(%) | | |
|---------------|------|--------|---------|-----------|-------------------|-------|
| | | | | Day 6 | Day 7 | Day 8 |
| 成長因子無添加区 | 61 | 49.7 | 23.7 | 0.0 | 0.0 ^a | 6.5 |
| SOF-EGF+IGF*区 | 57 | 41.7 | 5.3 | 0.0 | 0.7 ^a | 9.9 |
| 5%FBS区 | 85 | 39.1 | 19.3 | 0.0 | 15.8 ^b | — |

^{a-b}：異符号間に有意差有り(P<0.05)

* : EGFを100 ng/ml、IGF-Iを50 ng/ml添加

表8 EGF、IGF-I添加培地で経腔由来卵子を培養して発生した胚盤胞の移植成績

| | 移植 頭数 | 受胎 頭数 | 受胎率 (%) | 妊娠期間 (日) | 平均生時 体重(kg) |
|---------------|----------|----------|------------|-------------|----------------|
| 成長因子無添加区 | 3 | 0 | - | - | - |
| SOF-EGF+IGF*区 | 5 | 2 | 40.0 | 286.5 | 36.0 |
| 5%FBS区 | 18 | 2 | 11.1 | 289.0 | 35.3 |

* : EGFを100 ng/ml、IGF-Iを50 ng/ml添加

考察

EGF、IGF-Iは、卵胞液や雌生殖器官に存在することが知られており (Ohtani ら 1996; Katagiri ら 2004)、培地に添加することで胚盤胞発生率の向上や細胞数増加効果があると報告されている (Lonergan ら 1996; Sirisathien と Brackett 2003; Sirisathien ら 2003)。

EGFは細胞表面の受容体に結合し、受容体に備わるタンパク質チロシンキナーゼ活性を刺激する。受容体のチロシンキナーゼ活性は、シグナル伝達カスケードを開始して、最終的にDNA合成、細胞増殖などに関与する (Graham と Stanley 1990)。過去の報告でも、培養液への添加により卵子から胚盤胞への発生率が有意に高まる (Lonergan ら 1996; Sirisathien と Brackett 2003) と報告されているが、効果がないという報告 (Yang ら 1993) もある。しかし主な報告では1~25 ng/mlの濃度が検討されており、100 ng/mlでの報告は、Yangら (1993) と Lonergan ら (1996) の2報のみである。本試験では無血清培地であるSOFaa-PVAにEGFをIVF直後から100~200 ng/mlと高い濃度で添加したところ、無添加区と比較して有意に胚盤胞発生率が向上した。これらのことから、本試験の培養系では、EGFは100 ng/ml以上の添加で胚盤胞発生率の向上に効果があると考えられた。

IGF-Iは、IGF結合タンパクにより調節され、IGF-Iの受容体に結合して、細胞増殖を促進することや、マウス胚ではインシュリンレセプターとクロスリアクションすることでタンパク合成促進やアミノ酸の輸送を促進すると報告されている (Harvey と Kaye 1991)。また、IGF-Iは、アポトーシスを抑制し (Sirisathien と Brackett 2003)、細胞数を増加させる (Moreira ら 2002; Sirisathien ら 2003) ことも知られている。Pintoら (2002) はマウス胚において、IGF-Iが細胞膜のレセプターに結合してグルコーストランスポーター8の移動を促し、アポトーシス

を抑えるのではないかと推察している。本試験でも無添加区と比較して、50 ng/ml以上の添加で有意に内細胞塊、栄養外胚葉および総細胞数が増加していることから、IGF-Iの細胞増殖効果が認められた。胚盤胞発生率については、既報でも20 ng/ml (Matsui ら 1995) や50 ng/ml (Sirisathien と Brackett 2003; Sirisathien ら 2003)、100 ng/ml (Moreira ら 2002) の添加で有意に向上したという報告があり、本試験でも、50 ng/mlまでは胚盤胞発生率は増加傾向であったが、100 ng/mlでは50 ng/mlより有意に低い値を示し、50 ng/mlの添加が最も高い発生率を示した。Chi (2000) は、マウス胚において、高濃度のIGF-I添加は、IGF-Iレセプターのダウンレギュレーションによりアポトーシスの引き金になると報告している。Prelleら (2001) もウシ胚において、IGF-Iを100 ng/ml添加すると胚盤胞発生率は、無添加と比較して有意に高くなるが、IGF-Iレセプターの転写が有意に下がると報告している。また、ウシ胚では不明だが、卵管液でのIGF-I濃度は人で15~61 ng/ml (Homburg ら 2006; Lighten ら 1999)、ブタで24.7~35.3 ng/ml (Wiseman ら 1992) だと報告されている。これらのことから、SOFaa-PVAに対しては、IGF-Iの添加は50 ng/mlが最も適した濃度ではないかと考えられた。

また、試験1、2でDay8の胚盤胞の呼吸量と総細胞数、栄養外胚葉細胞数との間に正の相関が認められたことから、胚の呼吸量を測定することによって細胞数、特に栄養外胚葉細胞数が推定できる可能性が示唆された。Ushijimaら (2008、2009) は、ウシ胚の細胞数や細胞数から算出される分裂回数を、胚の品質を客観的に判定する方法として報告している。しかし、胚の生存や発育に悪影響を与えることなく、簡便に細胞数を計数する手段はこれまでに報告されていない。本試験の結果から、胚の呼吸量は無侵襲で胚の品質を評価する新たな指標とし

て活用できる可能性が示唆された。

試験3では、試験1、2の結果をふまえ、それぞれの相乗効果を考慮して、EGF濃度を100 ng/ml、IGF-I濃度を50 ng/mlとしてSOFaa-PVAに添加したところ、有意差はないもののSirisathienら(2003)と同様にEGFまたはIGF-I単独の添加と比較して、胚盤胞発生率が高まった。マウスではEGFレセプターがIGF-Iレセプターを介して転写促進し細胞分裂促進作用をもたらしたという報告がある(BuegaudとBaserga 1996)。ウシにおける作用機序は明らかではないが、本試験では双方を加えることで胚盤胞発生率が高まる可能性が示唆された。

試験1から3の結果をふまえ、試験4では、経膈採卵由来卵子を用いて効果を検討したところ、Day7では5%FBS区は成長因子無添加区と比較して有意に胚盤胞発生率が高くなった。Day8においては、SOF-EGF+IGF区は無添加区より高い胚盤胞発生率を示したが、有意な差は認められなかった。これは経膈採卵由来卵子を用いたために、培養卵子数が統一できなかったことから、結果にばらつきが生じたためと考えられ、今後は例数を増やして検証する必要があると考えられた。また、得られた胚盤胞の移植により、Hernandez-Fonsecaら(2002)と同様に無血清培地から正常な産子を得ることができた。Blockら(2003)はBSAを添加しているがIGF-Iを100 ng/ml添加したKSOM培地で作出した胚盤胞を受胎牛に移植して受胎率が向上し、生時体重も通常の産子と有意差のないことを報告している。これらのことから、EGF、IGF-Iを添加した無血清培地が現場でも応用できる可能性が示唆された。

今回我々は、血清を用いない化学的合成培地としてSOFaaを用い、EGFおよびIGF-Iを添加して血清培地と有意差のない胚盤胞発生率を得た。血清を用いない培地では凍結融解後の胚の生存率が高いと報告されている(Kimら1993)ことや成長因子が凍結融解後のマウス胚の生存性を高めるという報告もある(Desaiら2000)。ウシ凍結胚移植において最終的に血清を用いた培地と同等の産子数を得ることができれば、より安定した子牛生産が可能になると思われる。今後は凍結融解後の移植試験への取り組みが必要と考えられた。

謝辞

本試験の実施に当たりご指導を頂いた(独)家畜

改良センターの小林修司先生に深く感謝の意を表します。

引用文献

- Abe H, Shiku H, Aoyagi S, Hoshi H. 2004. In vitro culture and evaluation of embryos for production of high quality bovine embryos. *J Mamm Ova Res* 21, 22-30.
- Block J, Drost M, Monson RL, Rutledge JJ, Rivera RM, Paula-Lopes FF, Ocon OM, Krininger CE 3rd, Liu J, Hansen PJ. 2003. Use of insulin-like growth factor-I during embryo culture and treatment of recipients with gonadotropin-releasing hormone to increase pregnancy rates following the transfer of in vitro-produced embryos to heat-stressed, lactating cows. *J Anim Sci* 81, 1590-1602.
- Burgaud JL, Baserga R. 1996. Intracellular transactivation of the insulin-like growth factor-I receptor by an epidermal growth factor receptor. *Exp Cell Res* 47, 412-419.
- Chi MMY, Schlein AL, Moley KH. 2000. High insulin-like growth factor I (IGF-I) and insulin concentrations trigger apoptosis in the mouse blastocyst via down-regulation of the IGF-I receptor. *Endocrinology* 141, 4784-4792.
- Desai N, Lawson J, Goldfarb J. 2000. Assessment of growth factor effects on post-thaw development of cryopreserved mouse morulae to the blastocyst stage. *Hum Reprod* 15, 410-418.
- Graham C, Stanley C. 1990. Epidermal growth factor. *J Biol Chem* 14, 7709-7712.
- Harvey MB, Kaye PL. 1991. Mouse blastocysts respond metabolically to short-term stimulation by insulin and IGF-1 through the insulin receptor. *Mol Reprod Dev* 29, 253-8.
- Hernandez-Fonseca HJ, Sirisathien S, Bosch P, Cho HS, Lott JD, Hawkins LL, Hollett RB, Coley SL, Bracxkett BG. 2002. Offspring resulting from direct transfer of cryopreserved bovine embryos produced in vitro in chemically defined media. *Anim Reprod Sci* 69, 151-158.
- Herrler A, Krusche CA, Beier HM. 1998. Insulin and insulin-like growth factor-1 promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. *Biol Reprod* 59, 1302-1310.
- Homburg R, Orvieto R, Ben-Rafaeli Z. 1996. Serum levels of insulin-like growth factor-I, IGF binding protein-I and insulin and the response to human menopausal gonadotrophins in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 11, 716-719.

- Katagiri S, Takahashi Y. 2004. Changes in EGF concentrations during estrous cycle in bovine endometrium and their alterations in repeat breeder cows. *Theriogenology* 62, 103-112.
- Kim JH, Funahashi H, Niwa K, Okuda K. 1993. Glucose requirement at different developmental stage of in vitro fertilized bovine embryos cultured in semi-defined medium. *Theriogenology* 39, 875-886.
- Krisher RL, Lane M, Bavister BD. 1999. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. *Biol Reprod* 60,1345-1352.
- Lighten AD, Moore GE, Winston RM, Hardy K. 1999. Routine addition of human insulin-like growth factor-I ligand could benefit clinical in-vitro fertilization culture. *Hum Reprod* 13, 3144-3150.
- Loneragan P, Carolam C, Langendonck AV, Donnay I, Khatir H, Mermillod P. 1996. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. *Biol Reprod* 54, 1420-1429.
- Matsui M, Takahashi Y, Hishinuma M, Kanagawa H. 1995. Insulin and insulin-like growth factor-(IGF-I) stimulate the development of bovine embryos fertilized in vitro. *J Vet Med Sci* 60, 1109-1111.
- Moreira F, Paula-Lopes FF, Hansen PJ, Badinga L, Thatcher WW. 2002. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of in vitro derived bovine embryos. *Theriogenology* 57, 895-907.
- Ohtani S, Okuda K, Ohtani M, Yamada J. 1996. Immunohistochemically-determined changes in the distribution of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and epidermal growth factor (EGF) in the bovine endometrium during the estrous cycle. *J Vet Med Sci* 58, 1211-1217.
- Pinto AB, Carayannopoulos MO, Hoehn A, Dowd L, Moley KH. 2002. Glucose transporter 8 expression and translocation are critical for murine blastocyst survival. *Biol Reprod* 66, 1729-1733.
- Pinyopummintr T, Bavister BD. 1991. In vitro-matured/ in vitro-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. *Biol Reprod* 45, 731-742.
- Prelle K, Stojkovic M, Boxhammer K, Motlik J, Ewald D, Arnold GJ, Wolf E. 2001. Insulin-like growth factor I (IGF-I) and long R(3)IGF-I differently affect development and messenger ribonucleic acid abundance for IGF-binding proteins and type I IGF receptors in vitro produced bovine embryos. *Endocrinology* 137, 1301-1309.
- Sakaguchi S, Iguchi M, Kobayashi N, Fujitani Y, Mitsumizo N, Utsumi K. 1995. Repeated transvaginal ultrasound-guided oocyte collection using Japanese black cows suboptimal for breeding. *Japanese J embryo Transfer* 17, 94-101.
- Shiku H, Shiraiishi T, Ohya H, Matsue T, Abe H, Hoshi H, Kobayashi M. 2001. Oxygen consumption of single bovine embryos probed by scanning electrochemical microscopy. *Anal Chem* 73, 3751-3758.
- Sirisathien S, Brackett BG. 2003. TUNEL analyses of bovine blastocysts after culture with EGF and IGF-I. *Mol Reprod Dev* 65, 51-56.
- Sirisathien S, Hernandez-Fonseca HJ, Brackett BG. 2003. Influences of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on bovine blastocyst development in vitro. *Anim Reprod Sci* 77, 21-32.
- Spanos S, Becker DL, Winston RML, Hardy K. 2000. Anti-apoptotic action of insulin-like growth factor-1 during human preimplantation embryo development. *Biol Reprod* 63, 1413-1420.
- Tagawa M, Matoba S, Narita M, Saito N, Nagai T, Imai K. 2008. Production of monozygotic twin calves using the blastomere separation technique and Well of the Well culture system. *Theriogenology* 69, 574- 582.
- Takahashi Y, First NL. 1992. In vitro development of bovine one-cell embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 37, 963-978.
- Thouas GA, Korfiatis NA, French AJ, Jones GM, Trounson AO. 2001. Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. *Reproductive BioMedicine Online* 3, 25-29.
- Ushijima H, Akiyama K, Tajima T. (2008) Transition of cell numbers in bovine preimplantation embryos: In vivo collected and in vitro produced embryos. *J Reprod Dev* 54: 239-243.
- Ushijima H, Akiyama K, Tajima T. (2009) Classification of morphological changes based on the number of cleavage divisions in bovine embryos. *J Reprod Dev* 55: 83-87.
- Wiseman DL, Henricks DM, Eberhardt DM, Bridges WC. 1992. Identification and content of insu-

lin-like growth factors in porcine oviductal fluid.
Biol Reprod 47, 126-132.

Yang BK, Yang X, Foote RH. 1993. Effect of growth factors on morula and blastocyst development of in vitro matured and in vitro fertilized bovine oocytes. *Theriogenology* 40, 521-530.

Yoshida Y, Miyamura M, Hamano S, Yoshida M. 1998. 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.