

絹タンパク質セリシンを用いたウシ胚の個別培養
培地と無血清凍結保存液の開発

山口大学大学院連合獣医学研究科

磯部 知弘

2015年3月

目次

要旨	2
第1章	5
緒言	6
第2章	11
研究1	12
緒言	13
材料および方法	15
結果	20
考察	22
研究2	25
緒言	26
材料および方法	28
結果	34
考察	35
研究3	37
緒言	38
材料および方法	40
結果	45
考察	46
第3章	48
総括	49
謝辞	56
参考文献	57
図表	66

要旨

近年、ウシの家畜改良分野においては、優良な遺伝形質を持った雌畜からの増殖には限度があるものの、超音波診断装置を用いた生体の卵巣内卵胞からの卵子を吸引する経膣採卵 (Ovum Pick Up ; OPU) 技術と体外受精 (In Vitro Fertilization ; IVF) 技術を組み合わせた「OPU-IVF」によって雌畜を中心とした遺伝的改良が可能となった。しかし、雄精子とは異なり、回収される卵子は常に多数とは限らず、個別および少数グループによる培養技術が必要な受精卵 (胚) の発生率は低い。このため、希少価値のある雌畜卵子が少数でも効率的な胚発生培地や培養技術が切望されている。さらに、胚の輸送には凍結保存が必要であるが、以前から凍結保存液に添加されている血清類中には未知の物質混入が否定出来ず、安全性において無血清凍結液の開発は希求されていた。そこで本研究は、これらの問題に対処するために 18 種類のアミノ酸から組成される水溶性タンパク質で、シルク (絹) のフィブロイン (絹糸) を覆っているセリシンに着目した。

研究 1 では、セリシンが個別培養されたウシ胚の着床前における発生と品質に与える影響について検討した。無添加 (コントロール)、0.1、0.5 および 1% (w/v) セリシンを添加した CR1aa 培地で「と畜卵巣卵子-IVF」由来 2 細胞期胚を 7 日間個別培養したところ、0.5% セリシン添加区の胚から発生した総胚盤胞と拡張胚盤胞の発生率は、セリシン無添加もしくは 1% セリシン添加区と比較して有意に高かった。また、セリシン無添加もしくは 0.5% 添加区において、酸化ストレス状態下 (50 μ M と 100 μ M 過酸化水素) として 7 日間個別培養したところ、100 μ M 過酸化水素を暴露

した胚の総胚盤胞発生率はセリシン添加により著しく改善された。しかしながら、50 μ M 過酸化水素を暴露した培養液での胚発生ではセリシンにおける保護効果が認められなかった。一方で、培養液中に 100 μ M 過酸化水素を暴露された胚では、0.5%セリシン添加区における総胚盤胞の DNA 損傷率は、コントロール区と比較して、有意に低値を示した。このことから、0.5%セリシン添加は酸化ストレスを低減することにより、個別培養における胚の発生と品質を改善すると推察された。

研究 2 では、OPU によるウシ体外受精胚の生産において、胚の個別培養方法の確立が特に重要である。OPU 由来胚の体外発生能について、培養液へのセリシン添加の有無、並びに個別培養法とグループ培養法を比較し、さらに、その凍結融解胚を受胎牛に直接移植することにより、OPU 由来胚の生存性を検討した。OPU 由来 2 細胞期胚を 0.5%セリシン添加もしくは無添加の CR1aa 培地で、個別およびグループ培養により 7 日間培養した結果、セリシン無添加の個別培養の胚盤胞および凍結可能胚盤胞への発生率は、セリシン添加の有無に関係なくグループ培養と比較して有意に低下した。一方、個別培養において、凍結可能胚盤胞への発生率は、セリシン添加区が無添加区に比べ有意に高かった。その凍結融解胚の直接移植後の妊娠率、流産率、死産率および正常分娩率は、培養法やセリシン添加の有無に関係なく各区間で有意な差は認められなかった。この結果から、OPU 由来胚培養過程でのセリシン添加は、凍結融解胚の移植後の生存性は向上しないものの、個別培養した胚の品質を改善することが示された。

研究 3 は、セリシンの凍結液における血清代替効果について、ウシ胚の凍結融解後の生存性や胚発育を検討するとともに、受胎牛に直接胚移植して、その妊娠

率、流産率、死産率および正常分娩率を調査した。ウシ体外受精胚を 0.1~1%濃度のセリシンを添加した凍結液で凍結保存し、融解後の胚の生存性を調べた。その結果、透明帯破損率、生存率および発育率は 0.4%牛血清アルブミンおよび 20%牛胎児血清(コントロール)を添加した凍結液で凍結した胚と比較して同等であった。また、コントロール凍結液、0.5%セリシン+20%血清(0.5S/20F)凍結液、0.5%セリシン凍結液(0.5S)の 3 種類で体内胚を凍結させ、それらを受胎牛に直接移植したところ、0.5S/20F 区において妊娠率および正常分娩率がコントロール区より有意に増加した(0.5S/20F 区 vs コントロール区: 妊娠率、47.3%vs40.1%および正常分娩率、94.6% vs 87.3%)。さらに、0.5S 区は妊娠、正常分娩率(それぞれ 42.2%、92.4%)において他の 2 区と比較して有意な差はなかった。今回の結果から、ウシ胚の凍結保存法において、牛胎児血清や牛血清アルブミンからのバイオハザードを排除するために、血清代替物としてセリシンは有効であることが示唆された。

以上の結果からセリシンは、OPU 技術を用いたウシ体外受精胚における個別培養での生産性向上による牛群の育種改良と体内および体外胚の広域流通における新たな無血清凍結保存法に寄与できると考えられた。

第1章

緒言

家畜とは、育種改良を進めてきた動物であり、利用目的にかなった能力の高い雌雄を交配し、その子孫を選抜・淘汰することで改良を図ってきた。近年、バイオテクノロジー技術は大きく進歩し、優れた能力を持つ個体から、できる限り多くの子孫を生産することが可能となった。その代表的な例が、人工授精 (Artificial Insemination; AI) 技術である。その技術発達に伴って、優れた遺伝的能力を持つ種雄畜の生産した精子を、凍結技術や輸送の進歩により広範囲の雌畜に授精が可能となった。この優れた遺伝形質を持つ多くの後代産子を得ることは、雄側からの育種改良と言える。

一方、自然条件下での雌畜は、分娩して生産する子畜の数には限りがあるため、優秀な雌畜からの改良速度は、AI を利用した雄側からの改良と比較してかなり遅かったが、それを飛躍的に改善したのが胚移植 (Embryo Transfer; ET) 技術である。ET の歴史はかなり古く、1890 年にイギリスでウサギを用いて成功したことを皮切りに、現在に至っては、他の哺乳類家畜にも波及している。特にウシ受精卵 (胚) においては広域な流通により国内外から優秀な遺伝資源を導入することが可能で、遺伝的多様性の確保においても重要視されている。さらに、国内の乳用種雌牛に黒毛和種胚を移植することによって、輸入穀物飼料費の高止まり等により酪農経営が厳しい中においては副産物収入としても期待できる。

ところで、国内においては、ET に用いられる胚生産は大きく 2 つの手法がある。一つ目は、過剰排卵処置を実施した雌牛体内から多数の胚を非外科的に回収する

体内胚生産技術であり、すでに一般的で商業化されている。また、この技術による体内胚は「Multiple Ovulation and Embryo Transfer (MOET) 育種」と称した家畜改良にも寄与していることが知られる。

二つ目には、卵巣内に多数存在する小卵胞から卵母細胞(卵子)を回収し、体外受精(In Vitro Fertilization; IVF)させることによって胚を生産する体外胚生産技術である。この技術は、「と畜卵巣」より得られる卵子回収技術と超音波診断装置を用いて生体卵巣から卵子回収を行う経膈採卵(Ovum Pick Up; OPU)技術の2つの手技があり、特に後者の方は「OPU-IVF」と称され、学術的にも卵胞や黄体の動態を研究するのに極めて利用価値が高く^{25,50}、研究機関のみならず、一般技術として普及し始めている。この OPU 技術は、ヤギやヒツジ⁵¹にも応用されているが、特にウシで用いられ、一般的に繁殖性を低下させることなく同一個体から複数回に渡って卵子を回収することが出来る。このため、短期間に多くの後代を生産することが理論的には可能であるが、実際には各々の供卵牛から回収される卵子数は、個体差(年齢、血統等)や連続 OPU における卵胞刺激ホルモン等の処理⁵²やそのインターバル²³が影響し、「と畜卵巣」から回収される卵子数よりも劣ることが少なくない。従って、育種改良にとって少数でも効率よく胚の発生する方法が希求されている。

現在、胚の個別培養法の確立は、卵巣から回収される数が少ない卵子であるウマ等においては特に重要である。個別や少数グループで成熟培養後、体外受精し発育培養する OPU と IVF の組合せで生産される体外胚は、ますます育種改良の分野で必要とされ、商業化として増大している^{1,2}。一般的に体外胚生産のために適した良質の卵子を最大限回収できる OPU は週 2 回とされる²³。得られたウシ卵子

の発育能は、吸引圧や培養条件など非常に多くの要因に影響されるが⁹、妊娠初期における雌牛においても OPU を実施することが可能で、複数回の処理においても胎児発育に悪影響を与えないとされている⁴⁶。

しかし、各々の(卵子)ドナーから生産された胚は、血統情報を保守する(特に黒毛和種においては、取引価格に大きく影響する)ために別々に培養しなくてはならない。各々のウシから別々に胚を培養するためには、それらを個別もしくは少数グループで処理・培養する必要があるものの、牛の体外胚生産における個別培養や少数胚培養の有効であるスタンダードなプロトコルは、それらの卵子や胚が慣例的に多数グループで培養されることから、ほとんど情報がない。事実、高い胚盤胞の発生率や高品質な胚は、多数グループ培養におけるパラクリンやオートクリンとされる現象で発生の刺激を促すとされる胚同士や体細胞との共培養で実施されることが多い³⁻⁵。一方で、個別培養とグループ培養を比較して、胚盤胞率に差がなく、ほぼ等しいか比較的高いと報告する論文等もあるものの^{6,7}、個別培養を用いた研究は、一般的に発生率が低く、胚の品質も減少することが指摘されている^{5,8,9,24}。このことから、OPU を最大限実用可能な技術として用いるために、品質や発生能における個別培養システムの効果を評価すべきである。

近年、ET 技術が多くの分野で用いられ、ウシ育種産業分野でも商業化されているが、ET の世界的広がりにとって、ウシ胚は緩慢凍結法やガラス化保存法を使用し、保存しなければならない。凍結保護剤であるエチレングリコールやポリピレングリコールを用いた直接移植法は以前から緩慢凍結で用いて凍結されるウシ胚の移植において広範囲に適用されている²⁹⁻³¹。ウシ胚の緩慢凍結法における牛胎児血

清(FBS)や牛血清アルブミン(BSA)などの血清類は、胚を取扱い易くするためや、凍結保存中での細胞膜を保護するため凍結保存液に添加される。しかし、凍結液に血清類を添加することは、ウシ海綿状脳症(BSE)のような病原プリオンを混入させる可能性があり、伝染病伝播リスクを増大させる³²。そのことから、ウシ胚の安全で効果的な凍結保存として無血清凍結保存液は切望されてきた。

ところで、セリシンとは蚕(カイコ)が蛹(サナギ)になる際に作る繭(マユ)の成分であり、その繭は、フィブロイン(繊維状タンパク質:75%)とセリシン(水溶性タンパク質:25%)から構成され、ともに18種類のアミノ酸からなるタンパク質である¹⁴。また、セリシンは絹糸としてのフィブロインを互いに接着させる糊状タンパク質であり、通常は、精練過程で廃棄されていたが、抗菌や抗紫外線などの特性を持つことから生物製剤に広く使用され¹⁰、脂質酸化の抑制¹¹や抗ガン作用の特性もあるとされる¹²。さらに、Dashら¹³は、セリシンにおいて過酸化水素に暴露させた皮膚線維芽細胞での抗酸化作用を見出し、紫外線B波照射にて取り扱われたケラチサイト内の活性酸素の発生を抑制したと報告した¹⁴。さらに、セリシンは哺乳類細胞^{33,34}やヒト肝細胞³⁵の凍結保存に使用する血清の代替が可能と指摘される一方で、哺乳類胚の凍結保存における絹タンパク質セリシンの有益な応用手段としての無血清凍結保存液の報告はない。

本研究は、これまでに絹タンパク質セリシンを用いた哺乳類体外胚培養発生に関する効果的な研究は未発表となっていることから、「と畜卵巣」由来の卵子を用いて、ウシ胚発生効果として培養液にセリシンを添加し個別培養における有効性を検討した。さらに、OPU でドナーから回収された卵子の個別培養技術におけるセリシン添

加効果を検討するために、OPU 由来胚を用いた胚の品質や生存性を評価するとともに、作出胚を凍結保存し、受胎牛へ移植した後、妊娠率や正常分娩率等を調査することとした。また、ウシ体内および体外胚の凍結保存として、新しい無血清凍結保存液を開発するために、体外生産胚の凍結融解後の生存性において、セリシンの至適濃度を調査するとともに、そのセリシンを添加した凍結保存液で凍結・融解した体内胚の直接移植後の妊娠率、流産率、死産率及び正常分娩率の評価を行い、血清代替物としてのセリシンの有効性を検討した。

第2章

研究1

個別培養したウシ胚の体外発生におけるセリシン添加効果

緒言

胚の個別培養法の確立は、卵巢から回収される卵母細胞(卵子)数が少ない馬、犬および猫においては特に重要である。近年、個別培養や少数グループで成熟培養後、体外受精の組合せでウシ胚を作製する経腔採卵(OPU)は、育種改良の分野で必要とされている^{1,2}。しかし、ウシの体外胚生産において、卵子や胚の培養は通常30-40個のグループで行われるため、個別培養や少数胚培養に用いる標準的な作製方法は確立されていない。実際には、胚もしくは共培養した細胞による代謝物により(パラクリン作用)、高い胚盤胞発生率や高品質な胚が得られる³⁻⁵。

一方、個別培養とグループ培養を比較した場合、胚盤胞発生率はほぼ同等であるとの報告はあるものの^{6,7}、一般的に個別培養を用いた研究は発生率が低く、胚の品質も低下することが示唆されている^{5,8,9,24}。それ故に、OPUを最大限実用可能な技術として用いるために、品質や発生能を向上させる個別培養法を開発する必要性がある。

蚕由来のセリシンは、繭内のフィブロイン(絹糸)を覆い、絹糸を互いに接着させる可溶性の絹タンパク質である。セリシンは、抗菌作用や抗紫外線作用を有することから、生物製剤として広く使用され¹⁰、脂質の酸化抑制¹¹や抗ガン作用の特性もあるとされる¹²。さらに、Dashら¹³は、セリシンにおいて過酸化水素に暴露させた皮膚由来繊維芽細胞での抗酸化作用を見出し、紫外線B照射処理された角化細胞内の活性酸素の発生を抑制すると報告している¹⁴。これら様々な細胞に関する報告は多くされているが、絹タンパク質であるセリシンを用いた体外胚培養発生に関する

る報告はない。

そこで研究 1 では、効果的でスタンダードとなり得るウシ体外胚の個別培養システムを構築するために、通常培養と酸化ストレス条件下の両方で、「と畜卵巣」由来卵子を用いて、個別に培養されたウシ胚の着床前での発生や品質におけるセリシン効果を調査した。

材料および方法

1) セリシン

ピュアセリシンは、和光純薬工業株式会社(大阪)から製品を購入し、分子量においては約 33kDa である(加水分解される)。今回の研究で用いられたセリシンのアミノ酸組成(mol%)は、セリン;34.2、アスパラギン酸;16.4、グリシン;14.8、トレオニン;8.2、アルギニン;6.1、アラニン;4.6、グルタミン酸;3.8、バリン;3.6、チロシン;3.1、リシン;1.9、ヒスチジン;1.8、ロイシン;1.0、イソロイシン;0.5、プロリンおよび Ph-アラニン;<0.05 であった。

2) 卵母細胞(卵子)回収、成熟培養、体外受精

卵巣は「と畜場」で黒毛和種から採取され、38°Cの滅菌生理食塩水に保管されて実験室まで輸送された。卵丘細胞卵子複合体(COCs)は、18G 針を装着した 5ml 注射シリンジを用いて、直径 2-5mm の卵胞から吸引された。体外成熟培養には、少なくとも 4 層の卵丘細胞を有した均質な卵細胞質である COCs のみを用いた。COCs は 25mM HEPES バッファーを含む TCM-199 培地(TCM-199; インビトロジェン, Carlsbad, CA, USA)で2回洗浄された。その後、60-70 個の COCs は、4 ウェルプレート(テルモ, Fisher Scientific)内に 0.02AU/mL 卵胞刺激ホルモン(FSH; 共立製薬株式会社, 東京)、1 μ g/mL エストラジオール 17 β (E₂; シグマ, St. Louis, MO, USA)、抗生物質(100 μ g/mL ストレプトマイシン+100IU/mL ペニシリン; Meiji Seika ファルマ株式会社, 東京)と 10%(v/v) 牛胎児血清(FBS; テルモ,

Fisher Scientific, Worcester, MA, USA)を含んだ 300 μ L TCM-199 培地にミネラルオイル(ナカライテスク株式会社, 京都)で覆った液にて、38.5 $^{\circ}$ C飽和湿度の 5%CO₂気相条件下で 21-23 時間培養された。成熟培養後、全ての COCs は、体外受精用(IVF)-100 溶液(機能性ペプチド研究所, 山形)にて 1 種雄牛(黒毛和種)の凍結融解精液(5 \times 10⁶ 精子数/mL)を用いて、おおよそ 20-30 個の COCs が 1%(v/v)FBS と 0.1%(w/v)ヒアルロニダーゼ(シグマ)を添加した TCM-199 培地にて 1 回浸され、100 μ L の上記精子入 IVF-100 液内に移されるとミネラルオイルで覆われた後、38.5 $^{\circ}$ C飽和湿度の 5%CO₂気相条件下で 6 時間体外受精された。

3) 体外培養と胚発生の評価

体外受精後、受精された卵子の周囲に存在している卵丘細胞や余剰付着精子は、繰り返しのピペッティング操作により、完全に除去された。約25個の裸化卵子は、28 μ M フェノールレッド(ナカライテスク)、1mM L-グルタミン(ナカライテスク)、2%(v/v)Eagle's basal medium essential amino acids(BME;シグマ)、1%(v/v)MEM-nonessential amino acids(シグマ)、5%FBSおよび抗生物質を添加した CR1液⁴²を成分とする200 μ L CR1aa培養液^{40,41}内にて38.5 $^{\circ}$ C飽和湿度の5%CO₂、5%O₂および90%N₂気相条件下で24時間培養された。その24時間後、均等に2分割した細胞期まで発育した胚のみを選抜し、今回の実験に用いた。2細胞期胚は、50 μ L CR1aa液(セリシン添加または無添加)で38.5 $^{\circ}$ Cの5%CO₂、5%O₂および90%N₂気相条件下で7日間個別培養された。その体外培養後、胚盤胞の形態は倒立顕微鏡にて評価された。

胚の評価としては、正常な胚盤胞(胞胚腔が可視化され、内細胞塊が明瞭で、透明帯は変化がなく、胚自体の全直径も拡張までは至っていない)と正常な拡張胚盤胞(胚自体の直径は増大し、透明帯については本来の幅より半分程に減じた薄さ)とに分類された。

各々の胚の細胞数は、ヘキスト33342染色により評価された⁴³。胚は3.7% (w/v) パラホルムアルデヒド(和光純薬工業株式会社)と1%(v/v)トリトン-X(ナカライテスク)を含んだ ダルベッコのリン酸緩衝液(D-PBS; インビトロジェン)に15分間浸透・固定され、再度15分間室温にて0.3%(w/v)ポリビニルピロリドン(シグマ)を含んだD-PBSに移された後、胚はスライドガラス上の 90%(v/v)グリセロール(ナカライテスク)と1.9 μ M ヘキスト 33342(シグマ)を含んだD-PBSの10 μ L滴内に移された。胚を含んだ滴は、カバーガラスにより覆われ、ワセリン・パラフィン混合液により不動化して、4°C で一昼夜インキュベートされ後、染色された胚の細胞核は、蛍光顕微鏡にてカウントされた。

4) DNA 変性解析

酸化ストレス条件下で培養された胚盤胞の細胞内DNA損傷について、Otoiら⁴⁴による既報を一部改変した terminal deoxynucleotidyl transferase nick-end labeling (TUNEL) 染色と核染色を同時に実施して解析した。胚盤胞は、PBSで希釈した3.7%(w/v)パラホルムアルデヒド液にて4 °C 一昼夜かけて固定され後、40分間0.1%(v/v)トリトン-X100 を含むPBSで浸透された。その後、胚盤胞は10mg/mL 牛血清アルブミン(ブロッキング液)を含んだPBSにて4°C一昼夜かけてインキュベ

ートされ、fluorescein-conjugated 2'-deoxyuridine-5'-triphosphate and terminal deoxynucleotidyl transferase (TUNEL試薬; Roche Diagnostics, 東京)で38.5 °C 1 時間インキュベートされた。

胚は全ての核にラベルするため RNase treatment (50µg/mL RNase 室温にて 60分) 処理後、50µg/mL propidium iodide を用いて2次染色された。それから、抗退色剤 (Slow-Fade; Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA)にて処理し、スライドガラス上に置き、カバーガラスで覆い、マニキュアにて封をした。ラベルされた胚盤胞は蛍光顕微鏡(オリンパス; オリンパス光学工業株式会社, 東京)を用いて検査した。DNA損傷指標としては、総細胞数からのDNA損傷を含む細胞数の割合として計算された。

5) 実験計画

実験 1: 胚の発生や品質に及ぼすセリシン添加効果を評価した。体外受精 24 時間後に 2 細胞期胚のみを供試し、0.1%、0.5%、1%(w/v)セリシンを添加した 50µL CR1aa 液で 7 日間個別培養を実施した。コントロールとして、セリシン無添加の 50µL CR1aa 液を用いた。

実験2: 胚の発生や品質に及ぼすセリシン添加効果を酸化ストレス条件下で評価した。実験1にて胚発生の最適セリシン濃度が0.5%と判明したので、本実験では、0.5%セリシンを使用した。活性酸素種(ROS)による酸化ストレスを誘起するために、過酸化水素(キシダ化学株式会社, 大阪) 50µMと

100 μ M 濃度をCR1aa液に添加し⁴⁵、体外受精24時間後の2細胞期胚を0.5%セリシン添加と無添加区の50 μ L CR1aa液で7日間個別培養した。

実験3: 過酸化水素にて誘発された胚盤胞細胞内核のDNA損傷における0.5%セリシン保護効果を評価した。2細胞期胚は、0.5%セリシン添加区と無添加区の50 μ L CR1aa液+100 μ M過酸化水素にて7日間個別培養された。培養後、発生した胚盤胞は固定され、TUNEL法を用いてDNA損傷の評価がされた。

6) 統計処理

統計処理は、SASプログラムパッケージ(SAS for Windows, version 9.1; SAS Institute, Japan株式会社, 東京)を用いて実施された。胚盤胞形成の割合は解析前にアークサインにより変換してから計算した。実験1では、胚での胚盤胞形成と細胞数の変換データは一元配置分散分析法で処理されフィッシャーのPLSD法を用いて比較した。実験2では、胚での胚盤胞形成率と細胞数の変換データをSASにおける一般線形モデルを用いて分析した。統計モデルには、各データに及ぼす相互作用であるセリシンと過酸化水素の2要因が含まれているが、2者間に有意な差がない場合は、モデルから除外し、フィッシャーのPLSD法を用いて比較された。実験3では、胚盤胞内の総細胞数におけるDNA損傷細胞の割合は、Student's t 検定を用いて分析された。実験データは、平均 \pm 標準誤差(Means \pm SEM)で表現し、確率値(P)は、0.05未満を有意差ありと判定した。

結果

実験 1: 個別培養された胚発生におけるセリシン濃度の効果

個別培養における2細胞期胚からの総胚盤胞発生率については、0.5%セリシン添加区が、無添加区と1%セリシン区と比較して有意に高かった($P < 0.01$)。さらに、0.5%セリシン添加区の拡張胚盤胞率については、無添加区と1%セリシン添加区と比較して有意に増加した($P < 0.05$)。胚盤胞と拡張胚盤胞の平均細胞数については、セリシン濃度に関係なく各区間で有意な差はなかった。(表1)

実験 2: 酸化ストレス下の個別培養胚での発生と品質におけるセリシン効果

個別培養胚に100 μ Mの過酸化水素を暴露したところ、0.5%セリシン添加区の総胚盤胞率と拡張胚盤胞率が、無添加区に比べて有意に高かった($P < 0.05$)。50 μ M過酸化水素に暴露された2細胞期胚からの胚盤胞発育率は、0.5%セリシン添加の有無に関係なく、有意な差がなかったものの、セリシン添加区の胚盤胞への発生率は、増加する傾向にあった($P < 0.1$)。また、セリシンは胚盤胞および拡張胚盤胞の平均細胞数についても明瞭な効果を認めなかった。(表2)

実験 3: 酸化ストレス条件下で個別培養後発生した胚盤胞における DNA 損傷におけるセリシンの保護効果

100 μ M過酸化水素を含む培養液で培養後、発生した総胚盤胞において、0.5%セリシン添加区のDNA損傷率は、セリシン無添加区と比較して有意に低かった($P<0.01$: 4.4%vs.6.8%)。さらに、0.5%セリシン添加は、拡張胚盤胞のDNA損傷率は無添加区に比べて減少したが($P<0.01$: 3.1%vs.6.1%)、胚盤胞には効果がなかった。(図1)

考察

本研究において、0.5%セリシンを培養液に添加することにより通常・酸化条件下で個別培養し発生したウシ胚の発育能や品質が改善されることが判明した。これまでに、セリシンが繊維芽細胞の増殖や接着を増強し¹⁵、亜急性障害を誘発させる紫外線B照射¹²や繊維芽細胞での酸化ストレスに対して保護効果を示した報告がある¹³。一方、セリシンがウシ胚においても酸化ストレスに保護的効果があり、胚発生も改善することを見出したのは我々の報告が初めてである。

体細胞と共培養しない場合、一般的に低酸素培養により胚盤胞の品質改善と発生率の増加が認められる¹⁶。至適個別培養の培養液量については、胚:液量の比が小さいことが示唆されているが、10 μ L以下の少量であると、アンモニアなどの毒性のある代謝物の蓄積による胚発育への障害もある^{6,7}。本研究では、培養液量が1胚につき50 μ Lと胚:液量の比は大きく、低酸素気相条件下の培養であったが、2細胞期胚から胚盤胞までの発生率はセリシン添加により増加した。Teradaら¹⁷は、セリシンが牛血清アルブミンの代用として、様々な哺乳類細胞の培養に使用できるほか、細胞増殖を促進することを報告している。さらに、セリシン濃度が0.01~0.1%の間で細胞増殖を効率よく促進し、1%では細胞に有害であったと報告している。本研究では、0.5%セリシンを培養液に添加したところ、他の濃度条件より胚の発生率が最も効果的で1%濃度でも胚の発生においては無害であった。さらに、興味深いことには、7日目での拡張胚盤胞の発生割合はセリシンを培養液に0.5%添加した時に増加した。通常、胚細胞数が胚生存性や品質の指標とされる^{18,19}が、今回、セリシンは濃

度に関係なく、胚盤胞や拡張胚盤胞の平均細胞数に明らかな効果を認めなかった。このことから、セリシンは各々のステージにおける胚細胞数に影響するのではなく、個別培養胚の発育スピードを促進すると考えられた。

一方、活性酸素種(ROS)は、その細胞の活動や化学反応により酸化ストレスを誘発させる。胚培養中の過酸化水素による傷害のメカニズムは、ROS 産生を意味し、この ROS は拡散し、細胞膜を通過したのち、脂質、タンパク質および核酸のような細胞分子を傷害し、最終的にミトコンドリア変性、細胞障害、ATP 枯渇やアポトーシスを誘起する²⁰。高濃度の過酸化水素は、顕著な胚発生を阻害する毒性効果を示し、胚盤胞への発生実験には使用困難となる²¹。従って、本研究では胚培養液に低濃度の過酸化水素を暴露した。しかし、セリシンは 50 μ M 過酸化水素を暴露した培養液中の胚発生には保護的効果が認められなかった。1 つの仮説としては、胚培養中の低酸素気相により、過酸化水素による酸化ストレスの効果を減じたと考えられた。既報によれば、20%酸素濃度気相から 5~10%酸素もしくはそれ以下に減少した場合、ウシ胚の体外発生が改善されることが報告されている²²。

しかしながら、100 μ M 過酸化水素を暴露した培養液中の胚発生は、セリシンを添加したことで著しく改善された。さらに、セリシンは拡張胚盤胞の DNA 損傷率において明らかな効果を認めた。Dashら¹³はセリシンが過酸化水素で処理した細胞において、乳酸脱水素酵素、カタラーゼ、チオバルビツール酸反応物質(いずれも酸化ストレスのパラメーター)を減少したと報告している。また、彼らはセリシンが培養中に ROS のレベルを減少させた(過酸化水素で誘発した酸化ストレスから保護した)理由として、セリシン組成の著しく多い水酸基アミノ酸による断片(ROS)のキレート化が、

抗酸化作用のメカニズムとしている¹¹⁾。このことから、セリシンは特異な抗酸化能力によって酸化ストレスを防御することにより胚の発生と品質を改善したと考えられた。

結論として、0.5%セリシンは個別培養におけるウシ体外受精胚の発生と品質を改善した。さらに、0.5%濃度であるセリシンは、個別培養における過酸化水素から誘発される酸化ストレスを減少させた。セリシンを用いたこの個別培養法は、OPUにより高育種価であるウシから回収された少数卵子由来の移植可能胚の発生能を増加させることによって、牛群の育種改良に寄与することが示唆された。

研究2

絹タンパク質セリシンを用いた個別培養もしくはグループ培養した経膈
採卵由来ウシ胚の体外発生能と凍結融解胚の移植後における生存性

緒言

近年、経腔採卵(OPU)や卵子吸引を用いた体外胚生産は、ウシ育種産業として、ますます商業化している^{1,2}。一般的に体外胚生産のために適した良質の卵子を効率的に回収できるOPU間隔は週2回とされ²³、得られたウシ卵子の発育能は、吸引圧や培養条件など非常に多くの要因にも影響される⁹。さらに、この技術は、繁殖性を低下させることなく同一雌牛から卵子を繰り返し回収できる利点があり、妊娠初期における雌牛においてもOPUを実施することが可能で、複数回のOPUを実施しても、胎児発育に有害な影響を及ぼすことはない⁴⁶とされている。

しかし、それぞれの卵子ドナーから生産された胚は、血統情報を保守するために別々に培養しなくてはならない。各々のウシから別々に胚を培養するためには、それらを個別もしくは少数グループで処理する必要がある。ところが、ウシ体外胚個別培養は、一般的に低発生率であると報告されている^{5,8,9,24}。多くの研究者は、高い胚盤胞発生率や高品質な胚の作出には多数グループ培養や体細胞との共培養で実施される³⁻⁵ため、牛の体外胚生産における個別培養のための有効なプロトコルはほとんどない。

セリシンは、蚕の繭(マユ)を構成しているフィブロインを互いに接着させる可溶性で糊状の絹タンパク質であり(フィブロイン:セリシン=4:1)、フィブロインは繊維状のタンパク質で絹糸となり、セリシンは精練後、廃棄されていた¹⁴。現在においては、抗菌作用や抗紫外線作用などの理由で生物製剤に広く使用され¹⁰、細胞増殖促進作用¹⁷も報告され、関連産業で注目を集めている。研究1にて、「と畜卵巣」由来卵

子で、個別に培養されたウシ胚の発生や品質におけるセリシン効果の有効性が実証された。しかし、Ding ら⁵³によれば、OPU 由来卵子は、「と畜卵巣」由来卵子に比べて成熟培養における第一極体の脱出が遅れると報告し、「と畜卵巣」と「生体卵巣」によって相違があるため OPU を用いてドナーから回収された卵子培養に適用できるか否かの発生培養システムは未だ明らかになっていないのが現状である。さらに、体外生産胚の品質や生存性評価の最良な方法としては、その作出胚を凍結保存し、受胎牛に移植した後、妊娠率等を調査して、正常胎児を分娩させることである。

そこで研究 2 では、セリシンを添加した培養液にて個別培養した OPU 由来胚の発生率試験を実施するとともに、凍結保存した作出胚を受胎牛に直接移植し、その生存性を調査することとした。

材料および方法

1) 採卵牛

卵胞吸引に用いられた採卵牛は、肉用牛改良研究所もしくは周辺農家(鹿児島)で飼養されている黒毛和種雌牛(2~15 歳)とし、十分な飼養スペースを有するスタンション方式牛舎で、肉用牛の日本飼料標準に従い給餌されていた。全ての採卵牛は、非妊娠時に試験に用い、試験期間中は平均ボディーコンディションスコア(BCS; 和牛登録協会判定要領に従い、1(瘦)~5(肥)段階のスケール:旧区分)は、およそ 3.5 を維持した(和牛登録協会 2009)。

2) 卵胞吸引と卵子評価

OPU 処理による卵胞吸引は、Takuma ら⁴⁷の方法に準じて実施し、17G ニードルガイドを装着した 5MHz のエレクトロニックコンベックス型トランスデューサー(UST-994P-5; 日立アロカメディカル株式会社)を備えたリアルタイム B モード超音波診断装置(プロサウンド 2; アロカ, 東京)で実施した。簡潔に説明すると、採卵牛を鎮静させるため塩酸キシラジン(20mg/head, セラクタール[®], バイエル薬品株式会社, Leverkusen, Germany)を筋肉内投与し、臭化プリフィニウム(75mg/head, パドリン[®], 大洋薬品工業株式会社, 名古屋)を蠕動運動抑制のための鎮痙薬として静脈内に注射投与した。次いで、採卵牛の直腸内除糞を実施した後、陰部および肛門周囲を洗浄し、トランスデューサーを外陰部から腔の深部に挿入した。採卵牛の卵巣は直腸を介して用手にて操作し、採卵針が通る一直線上に卵巣内の卵胞が

位置するようにした。50-cm 長の 17G 採卵針 (COVA-Needle, ミサワ医科工業株式会社, 東京) は、ニードルガイドを経由して腔壁を貫通させ、卵巣内卵胞 (長径 3mm 以上) に刺された。卵丘細胞卵子複合体 (COCs) は、20-mL 注射シリンジに採卵針と繋ぐチューブに装着し、用手圧にてゆっくりと卵胞から吸引された。COCs は、抗生物質 (100IU/mL ペニシリン; Meiji Seika ファルマ株式会社, 東京) とヘパリン (10IU/mL; 味の素製薬株式会社, 東京) を添加したダルベッコの改変型イーグル培地 (D-MEM; 日水製薬株式会社, 東京) に回収された。

それぞれの卵巣から回収された COCs は、Takuma ら⁴⁷ の既報に準じて吸引後、すぐに品質を評価した。全ての COCs は、包囲している卵丘細胞の形態に従い次のようにランク付けされた。グレード 1 は数層の卵丘細胞を有して均質な卵細胞質を認めるものとし、次いで卵丘細胞が 1~3 層のもの、卵丘細胞がなく完全に裸化したもの、卵丘細胞が膨化したもの、変性したものをそれぞれグレード 2、3、4、5 とした。品質評価後、グレード 3~5 の COCs は廃棄し、残存する COCs は体外成熟培養、体外受精および体外発生培養に供した。

3) 体外成熟培養、体外受精および体外発生培養の手順

採卵牛から回収された COCs は 25mM HEPES バッファーを含む TCM-199 培地 (TCM-199; インビトロジェン, Carlsbad, CA, USA) で 2 回洗浄された。COCs の成熟培養はグループ培養として実施され、5-20 個の COCs は、4 ウェルプレート (テルモ, Fisher Scientific) 内に 0.02AU/mL 卵胞刺激ホルモン (FSH; 共立製薬株式会社, 東京)、1 μ g/mL エストラジオール 17 β (E₂; シグマ, St. Louis, MO,

USA)、抗生物質(100 IU/mL ペニシリン+100 μ g/mL ストレプトマイシン;Meiji Seika ファルマ株式会社)と10%(v/v)牛胎児血清(FBS;テルモ, Fisher Scientific, Worcester, MA, USA)を含んだ300 μ L TCM-199 培地にミネラルオイル(ナカライテスク株式会社, 京都)で覆われた液で、38.5 $^{\circ}$ C飽和湿度の5%CO₂気相条件下で21-23時間培養された。成熟培養後、全てのCOCsは、体外受精用(IVF)-100溶液(機能性ペプチド研究所, 山形)にて4頭の黒毛和種種雄牛(データには示していないが、4頭の種雄牛間の受精率には差がなかった)の凍結融解精液(5 \times 10⁶精子数/mL)を用い、COCsは1%(v/v)FBSと0.1%(w/v)ヒアルロニダーゼ(シグマ)を添加したTCM-199培地にて1回浸され、100 μ Lの上記精子入IVF-100液内に移されるとミネラルオイルで覆われた後、38.5 $^{\circ}$ C飽和湿度の5%CO₂気相条件下で6時間体外受精された。

体外受精後、受精された卵子の周囲に付着している卵丘細胞や余剰精子は、繰り返しのピペッティング操作により、完全に除去された。裸化卵子は、28 μ Mフェノールレッド(ナカライテスク)、1mM L-グルタミン(ナカライテスク)、2%(v/v)Eagle's basal medium essential amino acids(BME;シグマ)、1%(v/v)MEM non-essential amino acids(シグマ)、100ng/mLインスリン様成長因子-I(IGF-I;シグマ)、5ng/mL血管内皮細胞増殖因子(VEGF;シグマ)、5%FBSおよび抗生物質を添加したCR1液を成分とする150 μ L CR1aa培養液^{40,41}内にて38.5 $^{\circ}$ C飽和湿度の5%CO₂、5%O₂および90%N₂気相条件下で培養された。受精の偏りを排除するために、体外受精終了の24時間後、均等に2分割した細胞期まで発育した胚のみを選抜し、その2細胞期胚は、CR1aa液で7日間個別もしくはグループ培養

された。

4細胞期胚と胚盤胞形成までの発生は、それぞれ培養の24時間後と7日目に評価した。胚盤胞まで発生した胚は、胚盤胞の形態を顕微鏡での観察から、good, fair, poor の3グループのうちの1つに分類した⁴⁸。つまり、胚は、各々の発育ステージに相応した発育形態を示し、変性細胞がほとんどない胚を“good”と格付した。Fair 品質胚とは、わずかに不完全で、変性した細胞が20%以内であり、Poor 品質胚は、生存性のある細胞塊が存在するが、変性細胞が30%以上の胚とした。本研究では、goodとfair 品質胚を凍結可能として定義する。

4) 胚の凍結と胚移植

凍結液は 1mg/mL D-グルコース、36µg/mL ピルビン酸ナトリウム(インビトロジエン)、0.1M シュークロース(ナカライテスク)、0.5%セリシン(和光純薬工業株式会社, 大阪)と 20%FBS を添加したダルベッコのリン酸緩衝液に 5%(v/v)エチレングリコール(EG;和光純薬工業株式会社, 大阪)、6%(v/v)プロピレングリコール(PG;ナカライテスク)から構成されている。凍結可能胚(goodとfair 品質)は凍結液に直接移され、それぞれの胚は 0.25ml のプラスチックストロー(富士平工業株式会社, 東京)に挿入された後、15 分間平衡された。平衡後、ストローはプログラムフリーザー(ET-1;富士平工業株式会社)のアルコールバスに予備冷却として-6.5°Cで5分間置かれ、液体窒素で冷やされたピンセットでストローに触れ植氷した。5分後、0.3°C/分の割合で-30°Cまで冷却し、ストローは胚移植実施まで、液体窒素内に投入保存された。

ストローは 34°C のウォーターバスにて融解され、凍結融解胚は、無作為で抽出された受胚牛(多くは経産牛)に、発情から 6~8 日目で黄体が存在する卵巣側の子宮腔に非外科的に直接移植された。今回の研究では、受胚牛の選定には終始一貫した同一手順で、5 人の熟練技術者により移植が実施された。妊娠鑑定は、発情から 50~60 日目に直腸法にて判断した。

5) 実験計画

実験 1: 個別もしくはグループ培養された OPU 由来胚の発生において培養液に添加されるセリシン効果を評価した。グレード 1、2 である 738 個の COCs は、発情周期が様々なステージである 27 頭のドナーから回収された(3 年以上)。体外受精後、24 時間経過して等分割した 2 細胞期胚は、2 つの区へ無作為に割り当てられ、CR1aa 液に 0.5%(w/v)セリシン添加の有無でそれぞれ個別(1 胚/50 μ L)とグループ(2-32 胚/150 μ L)培養された。

セリシンは和光純薬工業株式会社から購入した Pure SericinTM を使用した。Pure SericinTM の分子量は、精練過程でタンパク質が加水分解されるため約 33kDa である。研究 1 にて、培養液への 0.5%セリシンの添加が酸化ストレス下において個別培養されたウシ胚の着床前発生と品質を改善したことから、今回の実験にも 0.5%濃度を用いた。

実験 2: 培養液への 0.5%セリシン添加効果は、その OPU 由来胚を凍結・融解し、直接移植した後の妊娠率、流産率、死産率および正常分娩率にて評価した。実験 1 にて作出された凍結可能胚のみを用い、前述した方法で凍結融解した後、黒毛和種(53 頭)、ホルスタイン種(55 頭)およびその交雑種(52 頭)で構成される計 160 頭の受胎牛に直接移植され、妊娠、流産、死産の数および正常分娩の件数を記録した。

6) 統計処理

4細胞期胚、胚盤胞および凍結可能胚盤胞への発生の平均値は、SASプログラムパッケージ(SAS for Windows, version 9.1;SAS Institute, Japan 株式会社, 東京)における一般線形モデルを用い、分散分析法で解析された。統計モデルには、各データに及ぼす相互作用である培養条件とセリシン濃度の2要因が含まれているが、2者間に有意な差がない場合は、モデルから除外し、フィッシャーのPLSD法を用いて比較された。また、妊娠、流産、死産および正常分娩の割合は、Yates' correctionのカイ2乗検定にて解析された。確率値(P)0.05未満を有意差ありと判定した。

結果

実験 1

表 3 で示されているように、OPU 由来胚をセリシン無添加の培養液で個別培養を実施したところ、胚盤胞と凍結可能胚盤胞への発生率は、セリシン添加の有無に関係なくグループ培養と比較して有意に減少した。培養液へのセリシン添加は、個別培養胚の発生率を増加させ、グループ培養胚と比べても発生率に差がなかった。セリシン添加で個別培養胚の凍結可能胚盤胞への発生率に限っては、セリシン無添加の個別培養と比較して、有意に高かったが($P < 0.05$)、グループ培養における胚の発生については、セリシン添加の有効性は認められなかった。

実験 2

表 4 で示されているように、凍結融解胚を受胎牛に直接移植したところ、受胎牛における妊娠率、流産率、死産率および正常分娩率については、培養条件(個別・グループ)やセリシン添加に関係なく、各区の間で差が認められなかった。

考察

胚培養中において培養液にセリシンを添加することは、OPU 由来の個別培養発生率を増加させ、特に、胚の品質を改善することがわかった。セリシンは繊維芽細胞の成長と付着を増強させ¹⁵、繊維芽細胞を例とする細胞種において酸化ストレスに対し、保護的効果を示している¹³。前述した研究1では、酸化ストレス下で個別培養した、「と畜卵巣」由来胚の発生は、培養液にセリシンを添加させることで増強することを証明した。セリシンは培養中の活性酸素レベルを減少させ、酸化ストレスを防御したが、これらの抗酸化反応のメカニズムはセリシンを組成する水酸基アミノ酸によって、その断片のキレート化によるものとされている^{11,13}。その結果、胚培養中にセリシンを添加することは、酸化ストレスを防御することによって、胚の発育を改善する可能性があるとし唆された。

ウシ卵子や体外胚の個別培養は一般的に低胚盤胞率と胚の品質低下を生じるとされている^{5,8,9}。同様に、今回の研究にてOPU 由来胚において培養液にセリシン無添加の場合、個別培養ではグループ培養と比較して胚盤胞への発生率を減少させ、品質低下も確認した。これらの結果は、個別培養胚が胚盤胞へ効率よく発生するには何らかの物質が欠けていることを示唆している²⁶。このことは、グループ培養胚から有益なオートクリンやパラクリンとされる現象に関する因子産生が、個別培養胚を用いて実験された不十分な培養条件を補充することが示されている^{3,27}。対照的に、グループ培養胚の発生率には、培養液へのセリシン添加の有効性は認められなかった。1つの仮説としては、オートクリンやパラクリン現象に関する因子は

各々の胚から分泌され、培養液中にこれらの因子が蓄積し、セリシンの有効性を減少(セリシンには悪影響)させたことで、グループ培養におけるセリシンの発生率向上が認められなかったと思われる。

一方、作出胚を受胎牛に移植した後、妊娠成立とその後の正常分娩で胎児が出生することは、体外胚生産の品質や生存性評価における他の角度からの指標でもある。本研究では、胚培養中の個別やグループ培養条件とセリシン添加の有無での OPU 由来胚を凍結保存し、その融解胚を直接移植した後の妊娠率、流産率、死産率や正常分娩に影響を与えなかった。個別やグループ培養条件とセリシン添加が無効であった 1 つの仮説として、凍結保存する胚を凍結可能(良質)胚のみを選抜したからと言えるかもしれない。一方で、今回の研究で得た妊娠率(20~29%)は、OPU 由来の凍結融解胚を受胎牛に移植した Merton ら²⁸により報告された妊娠率(44%)よりも低かったが、このことについては、培養システムや凍結法の相違点を今後検討しなければならない。

結論として、胚培養中でのセリシンを培養液に添加することは、グループ培養での OPU 由来胚の発生や胚移植後のこれら胚の生存性においては有効であるとは認められなかった。しかし、培養液中のセリシン存在下では、研究 1 と同様に個別培養での OPU 由来胚の発生と品質を改善し、凍結可能(優良)胚の個数を増加できる効果的な培養法として提供できることが示唆された。

研究3

絹タンパク質セリシンを添加した無血清凍結液でのウシ胚凍結保存

緒言

胚移植(ET)技術は多くの分野で用いられ、特にウシにおける分野では商業的に増加している。ETの世界的普及にとって、ウシ胚は緩慢凍結法やガラス化保存法を使用し、凍結保存しなければならない。さらには、凍結保護剤であるエチレングリコールやポリピレングリコールを用いた直接移植は、通常緩慢凍結法を用いて広範囲に適用されている²⁹⁻³¹。ウシ胚の緩慢凍結法における牛胎児血清(FBS)や牛血清アルブミン(BSA)などの血清類は、胚を取扱い易くするためや凍結保存中での細胞膜を保護するため、慣例的に凍結保存液に添加される。しかし、凍結液に血清類を添加することは、牛海綿状脳症(BSE)のような病原プリオンを混入させる可能性があり、伝染病伝播リスクを増大させることが危惧される³²。それ故、ウシ胚の安全で効果的な凍結保存としての無血清凍結保存液が切望されている。

セリシンとは、蚕(カイコ)が蛹(サナギ)になる際に作る繭(マユ)成分で、繭はフィブロイン(繊維状タンパク質:75%)とセリシン(水溶性タンパク質:25%)の2種類から構成されており、ともに18種類のアミノ酸から成るタンパク質である¹⁴。通常、絹糸としてフィブロインだけが抽出され、セリシンは精練されていたが、最近、脂質酸化¹¹の抑制¹¹や抗ガン作用の特性があるとされ¹²、研究1、2の結果からも個別培養されたウシ胚の発生と品質が改善された。既報によれば、哺乳類細胞^{33,34}やヒト肝細胞³⁵の凍結保存に使用する血清の代替が可能とされる一方で、ウシ胚を含む哺乳類胚の凍結保存におけるセリシンに関連する無血清研究の報告は未だ発表されていない。そこで研究3では、ウシ胚の凍結保存液として新しい無血清凍結液を開発す

るために、体外生産胚の凍結融解後の生存性において、セリシンの至適濃度を調査するとともに、そのセリシンを添加した凍結保存液で凍結・融解した体内胚の直接移植後の妊娠率、流産率、死産率および正常分娩率の評価を実施した。

材料および方法

1) ウシ体外生産胚

ウシ胚盤胞の体外生産のために、研究 1 の方法に準じて実施した。卵丘細胞卵子複合体(COCs)は、「と畜」された黒毛和種由来卵巣の直径 2-5mm の卵胞から吸引された。COCs は 25mM HEPES バッファーを含む TCM-199 培地 (TCM-199; インビトロジェン, Carlsbad, CA, USA) で 2 回洗浄された。その後、60-70 個の COCs は、0.02AU/mL 卵胞刺激ホルモン(FSH; 共立製薬株式会社, 東京)、1 μ g/mL エストラジオール 17 β (E₂; シグマ, St. Louis, MO, USA)、抗生物質(100 μ g/mL ストレプトマイシン+100IU/mL ペニシリン; Meiji Seika ファルマ株式会社, 東京)と 10%(v/v)牛胎児血清(FBS; テルモ, Fisher Scientific, Worcester, MA, USA)を添加した TCM-199 培地で 38.5 $^{\circ}$ C飽和湿度の 5%CO₂ 気相条件下で 21-23 時間培養された。成熟培養後、COCs は、体外受精用(IVF)-100 溶液(機能性ペプチド研究所, 山形)にて 1 種雄牛(黒毛和種)の凍結融解精液(5 \times 10⁶精子数/mL)を用いて、おおよそ 20-30 個の COCs を 1%(v/v)FBS と 0.1%(w/v)ヒアルロニダーゼ(シグマ)を添加した TCM-199 培地にて 1 回浸し、100 μ L の上記精子入 IVF-100 液内に移されるとミネラルオイル(ナカライテスク株式会社, 京都)で覆われた後、38.5 $^{\circ}$ C飽和湿度の 5%CO₂ 気相条件下で 6 時間体外受精された。

体外受精後、受精された卵子周囲に付着した卵丘細胞や余剰精子は、繰り返しのピペッティング操作により、完全に除去された。約25個の裸化卵子は、28 μ Mフェ

ノールレッド(ナカライテスク)、1mM L-グルタミン(ナカライテスク)、2% (v/v)Eagle's basal medium essential amino acids(BME;シグマ)、1% (v/v) MEM-nonessential amino acids(シグマ)、5%FBSおよび抗生物質を添加した CR1液⁴²を成分とする200 μ L CR1aa培養液⁴⁰内にて38.5°C飽和湿度の5%CO₂、5%O₂および90%N₂ 気相条件下で24時間培養された。7日間培養された後、胚盤胞の形態は、正常な胚盤胞と拡張胚盤胞(胞胚腔が可視化され、内細胞塊が明瞭)を回収し、凍結実験として用いられた。サンプルの偏りを排除するため、形態的に同じサイズや似通った胚を選抜し、各実験区に無作為に割り当てた。

2) ウシ体内胚

全ての胚は、肉用牛改良研究所もしくは周辺農家(鹿児島)で飼養されている黒毛和種雌牛(2~15歳)から回収された。過剰排卵処置については、筋肉内注射(総18 AU FSH)を発情日から10~14日目に開始し、3日間連続で漸減投与して誘起した。それから、FSH処置後5、6日目の2回、750 μ g合成プロスタグランジン F_{2 α} 類縁体(クロプロステノール C:フジタ製薬株式会社, 東京)をドナーに注射投与した。その後、ドナーは発情発見後、12時間と24時間後の2回、黒毛和種の凍結融解精液を用いて人工授精が実施された。胚については、最初の人工授精(day=0)から7日目にバルーンカテーテルを用いて非外科的に回収され、その回収胚は国際胚移植学会⁴⁹の定義に従って、品質判定された。品質グレードは、Good(コード1)、Fair(コード1とコード2の間)、Poor(コード2)および変性胚と分類され、判定された胚の Good とは、変性細胞や細胞質外に突出する正常細胞が

ほぼ皆無に近い状態を示し、Fair 胚は、小さな不完全細胞が存在し、変性細胞が 20% 以内となる。Poor 胚は、生存した細胞塊はあるものの、変性細胞が 30%以上ある胚と定義した。今回は、桑実胚と胚盤胞の Good もしくは Fair 胚を凍結保存し、胚移植に用いた。

3) 胚の凍結保存

抗生物質を添加したダルベッコのリン酸緩衝液 (PBS; インビトロジェン) に牛血清アルブミン (BSA; シグマ) と FBS (テルモ, Fisher Scientific) 及びセリシン (和光純薬工業株式会社, 大阪) を基剤として用いた。体外生産および体内胚は、室温にて前述したそれぞれの基剤溶液に 5%(v/v) エチレングリコール (EG; 和光純薬工業株式会社, 大阪)、6%(v/v) プロピレングリコール (PG; ナカライテスク) と 0.1M シュークローズ (ナカライテスク) を加えた凍結液に直接浸された。それぞれの胚は 0.25ml のプラスチックストロー (富士平工業株式会社, 東京) に挿入された後、15 分間平衡された。それから、ストローはプログラムフリーザー (ET-1; 富士平工業株式会社) 内 0°C 保持のアルコールバスに水平に移され、1°C/分の割合で -6.5°C まで冷却され、植氷を促された後 10 分保持したら 0.3°C/分の割合で -30°C まで冷却して、液体窒素内に投入保存された。

4) 実験計画

実験 1: 凍結融解後、必要十分なセリシン至適濃度を確認するために、0.1、0.5 および 1%(w/v) セリシンを添加した凍結液にて 5~8 胚を 1 ストロー内に

挿入して凍結し(コントロールとしては、0.4% BSA と 20%FBS を添加した凍結液とする)、体外胚における生存性の評価を行った。液体窒素内にて、1 ヶ月かそれ以上保存された後、凍結保存ストローは 10 秒ほど空気中に保持され、34°C のウォーターバスにて 20 秒浸された後、胚はプラスチック皿に出された。それらの胚は 10%FBS と 0.1mM β-メルカプトエタノール(シグマ)を添加した TCM-199 培地で洗浄され、同培地(5~8 胚/50μL)にて 72 時間、38.5°C 飽和湿度の 5%CO₂、5%O₂ および 90%N₂ 気相条件下で培養された。融解時、胚の透明帯については、明瞭なヒビもしくは破損の存在をチェックした。凍結融解胚の生存・発育性は、それぞれ培養 24 時間と 72 時間後に顕微鏡にて判定し、融解・培養 24 時間後に再拡張していた胚は生存胚とし、72 時間後、完全に孵化した胚盤胞にまで発育した胚を発育胚と定義した。

実験 2: それぞれ 0.4BSA/20F(コントロール区)、0.5%セリシン+20%FBS(0.5S/20F 区)および 0.5%セリシン(0.5S 区)とした 3 区の凍結液にて体内胚を凍結し、その後融解(1 胚/ストロー)して直接受胎牛に移植し、体内胚の発育における凍結液に添加されたセリシン効果を評価した。前述の実験 1 にて、胚の凍結保存における血清もしくは BSA の代替となり得るセリシン有効性の実証試験は、セリシンの至適濃度の解明までは至らなかった。そこで、研究 1 にて、ウシ体外胚の着床前発生におけるセリシンの有効濃度は 0.5%(w/v)であったことから、ここでの実験におけるセリシン

濃度は 0.5%(w/v)を用いた。

34°C のウォーターバスにてストローを融解し、胚は、受胚牛に発情(発情日=0)から 6~8 日目で黄体が存在する卵巣側の子宮腔に非外科的に直接移植された。今回の実験に用いた受胚牛は、経産牛と育成牛の両方で、主に黒毛和種を用いたが、ホルスタインやその交雑種である他の品種も一部使用し、胚も無作為に 3 区へ割り当てた。

一般的に胚移植の妊娠率は、受胚牛のコンディションや技術者の熟練度によって影響されることが知られている。今回の研究では、受胚牛の選定には終始一貫した同一手順で、5 人の熟練技術者により移植が実施された。妊娠鑑定は、発情から 45~60 日目に直腸法にて判断され、流産、死産および正常分娩の数が記録された。

5) 統計処理

凍結融解した体外胚の透明帯破損率、生存率、発育率については、分散分析(ANOVA)前にアークサインにより変換してから計算された。変換されたデータは、ANOVAを用いて計算され、次いでStatViewプログラム(Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA, USA)を用いてフィッシャーのPLSD法で比較された。妊娠率、流産率、死産率および正常分娩率は、Yates' correctionのカイ2乗検定にて解析した。確率値(P)0.05未満を有意差ありと判定した。

結果

実験 1

表 5 で示されているように、セリシン濃度区間での凍結融解胚における透明帯破損率、生存率、発育率には有意な差は認められなかった。要するに、凍結融解後の体外胚生存性においては、セリシン濃度に関係なく、セリシン区とコントロール区に相違はなかった。

実験 2

表 6 で示されているように、0.5S/20F 区での凍結融解胚を受胚牛に直接移植したところ、妊娠率と正常分娩率は、0.4BSA/20F(コントロール区)と比較して、有意に増加した($P<0.05$)。また、受胚牛における妊娠率、流産率、死産率および正常分娩率については、0.5S 区とコントロール区に有意な差はなかった。

考察

既存の報告では、セリシンを添加した凍結液によって凍結保存された様々な哺乳類細胞や昆虫細胞種は、血清を含んだ一般的な凍結液で凍結されたものと生存性が同等であると実証されている³³。本研究で、我々は哺乳類胚の凍結保存においてセリシンが血清やアルブミンの代替物として使用可能であることを初めて示した。

ウシ胚の凍結保存に用いられる FBS や BSA を含んだ凍結液はあるものの、基本的には FBS や BSA の使用はプリオンや伝染性ウィルスの混入の危険性があるため避けなければならない。セリシンは薬、一般用医薬品、化粧品、食品および健康食品に添加されているように安全性の高いことがよく知られている³⁶。研究 1 の結果から、セリシンはウシ胚培養中では酸化ストレスを防御し、結果的に胚の品質を改善して胚発生を増加させた。また、セリシンは、ウシ胚の凍結保存に適しているばかりでなく、血清や BSA からバイオハザードの可能性をも除去できる利点があると考えられる。

今日まで、ポリビニルアルコール (PVA) やポリビニルピロリドン (PVP) のような高分子無機化合物が胚の凍結液内に血清やアルブミンの代替品として報告されている³⁷⁻³⁹。Sommerfeld ら³⁸は PVA を添加した凍結液にて凍結されたウシ体外胚の融解後の発育を血清添加凍結液の胚とで比較したところ、有意に低かったと報じ、さらに、PVA や PVP を添加した凍結液で凍結保存されたウシ体内胚の移植後の妊娠率は血清添加液で凍結された胚と比較して低下したとの報告がある³⁹。一方、セリシンを添加した胚凍結液に関する本研究では、セリシン濃度に関係なくセリシン添

加区と血清添加区との間に凍結融解された体外胚の生存率や発育率において有意な差は認められなかった。

また、20%FBS を含んだ凍結液に BSA の代用としてセリシンを添加し、凍結された体内胚を直接移植した後、受胚牛における妊娠率や正常分娩率の増加が認められた。さらに、0.5%セリシンのみを添加した液(0.5S 区)と 0.4%BSA および 20%FBS を含んだ液(コントロール区)で凍結された胚をそれぞれ受胚牛に移植した後の妊娠率、流産率、死産率および正常分娩率においては両者に差がなかった。セリシンは凍結保存中においてジメチルスルホキシド(DMSO)のような凍結保護剤の毒性から哺乳類細胞を防御するとの報告があり³³、さらに哺乳類細胞の無血清培養と無血清凍結保存液の両方に有益であるとしている³⁴。今回の報告は、セリシンが凍結液に添加する BSA や FBS の代用になり得ることを示したもので、ウシ胚の無血清凍結保存液として有効であることが示された。

以上、セリシンを添加した凍結液は、凍結融解後の体外胚の生存性について既存液と比較して相違のないことが示された。また、体内胚では凍結液にセリシン添加区と血清添加区の 2 つで凍結された胚をそれぞれ受胚牛に移植した後の妊娠率、流産率、死産率および正常分娩率においては両者に差がなかった。結論として、セリシンは FBS や BSA を用いた胚の一般的凍結液と比較して、体内・体外で生産されたウシ胚の無血清凍結液として有益であることを証明した。凍結液にセリシンを用いることは、BSE のような伝染性物質の混入が危惧される国際貿易の上において、実用的で効果があると考えられた。

第3章

総括

OPU 技術(超音波診断装置を用いた生体の卵巣内卵胞を吸引する方法)は産業動物分野(特にウシ)における高度な獣医療の中でも家畜改良並びに生産性向上の手法として急速に商業化されているが^{1,2}、常に回収される卵子が多数確保できるとは限らない。実際には各々の供卵牛から回収される卵子数は、個体差(年齢、血統等)や連続 OPU における FSH 等の処理⁵²および OPU 間隔(週 1 回の OPU 処理に比べ、週 2 回の方が COCs の回収数が効果的であると実証されている²³) が影響する一方、頻繁に OPU を繰り返し実施することは、OPU 処理期間中の生殖器官機能が変化するため、その後の雌牛の生殖行動に対して負の影響を及ぼすことも報告されている⁵⁴。一般的に、OPU 由来卵子数は、「と畜卵巣」から得られる卵子数よりも少ないことが多く、そのため個別や少数グループ培養でも効率よく発生する培地や培養方法とそれらの作出胚を含めた体内・体外胚を広域に輸送するには、凍結保存の必要があり、以前から凍結保存液に添加されている血清中には不確定物質の混入があるとされ、安全性において無血清凍結液の開発は切望されている。

今回の研究は、0.5%セリシンを培養液に添加し、個別培養における酸化ストレス条件下では、「と畜卵巣」由来卵子からのウシ胚の発生や品質は改善された。セリシンは、繊維芽細胞の成長や接着を増強し¹⁵、亜急性障害を誘発させる紫外線B照射¹²や繊維芽細胞を例とする細胞での酸化ストレスに対して保護的効果を示した¹³と報告されている。我々の知る限り、このセリシンがウシ胚において酸化ストレ

スに保護的効果があり、その発生も効果的に促進する初めての報告となった。

一般的に体細胞不在で胚の品質改善と発生率の増加は低酸素気相培養が受け入れられている¹⁶。通常、至適個別培養の培養液量については、胚発生として1個当たり10 μ L以下であると、アンモニアなどの毒性のある代謝物の蓄積による障害があるものの、胚と液量の比は小さくすることが提案されている^{6,7}。本研究では、培養液量が50 μ L/個と低酸素気相条件下であったが、セリシンは2細胞期胚から胚盤胞までの発生率を増加させた。Teradaら¹⁷は、牛血清アルブミンの代用としたセリシンにおいて、様々な哺乳類細胞の培養で、より細胞増殖を促進したことを報告している。さらに、セリシン濃度が0.01~0.1%の間で細胞増殖を効率よく刺激し、1%では、細胞に有害であったと報じている。本研究では、0.5%セリシンを培養液に添加したところ、他の濃度条件より胚の発生率が最も効果的で1%濃度でも胚の発生においては無害であった。さらに、興味深いことに、7日目での拡張胚盤胞の発生割合はセリシンを培養液に0.5%添加した時に増加した。通常、胚の細胞数が胚の生存性や品質の指標として用いられる^{18,19}が、今回、セリシンは濃度に関係なく、胚盤胞や拡張胚盤胞の平均細胞数に明らかな効果を認めなかった。それ故、セリシンはそれぞれのステージでの胚の細胞数に影響するのではなく、個別培養胚の発育速度をアップさせると考えられた。

前述した研究1と同様に、セリシン添加は、OPU由来胚の個別培養における発生率を増加させ、特に、胚の品質を改善することが認められた。ウシ卵子や胚の体外個別培養は一般的に低胚盤胞率と胚の品質低下を生じるとされている^{5,8,9}。同様に、今回の研究にてOPU由来胚を培養液にセリシン無添加の場合の個別培養で

は、グループ培養と比較して胚盤胞への発生率を減少させ、品質低下を確認した。これらの結果は、個別培養された胚が胚盤胞にまで効率よく発生するには何らかの物質が欠けていることを示唆している²⁶。このことは、グループ培養胚から有益なオートクリンやパラクリンとされる現象に関する因子産生いわゆる生理活性物質が、個別培養された胚を用いて実験された不十分な培養条件を補充することが示されている^{3,27}。対照的に、培養液へのセリシン添加の有効性は、グループ培養された胚の発生には認められなかった。1つの仮説としては、オートクリンやパラクリン現象に関する生理活性物質は各々の胚から分泌されるが、これら因子の培養液中の集積がセリシン添加の有効性を減少させることによってグループ培養での無効果となったと考えられる。

ところで、活性酸素(ROS)とは、それら細胞の活動や化学反応により酸化ストレスを誘発させる。胚培養中の過酸化水素による傷害のメカニズムは、ROS産生を意味する。これらROSは拡散して、細胞膜を通過し、脂質、タンパク質および核酸のような細胞分子を傷害して、結果的にミトコンドリア変性、細胞障害、ATP枯渇やアポトーシスを誘起する²⁰。さらに高濃度になると、過酸化水素はかなり顕著に胚の発生を制限するような毒性効果を示し、胚盤胞への発生実験は、実施し難くなる²¹。従って、今回の胚には低濃度の過酸化水素を暴露させた。しかし、セリシンは50 μ M過酸化水素を暴露した培養液中の胚発生に対しては、保護的効果が認められなかった。1つの仮説としては、胚培養中の低酸素気相条件により、過酸化水素による酸化ストレスの効果を減じた可能性があると考えられた。既報によると、20%酸素濃度気相から5-10%酸素もしくはそれ以下に減少した場合、ウシ胚の体外発

生率が改善されたと報告されている²²。

しかしながら、100 μ M 過酸化水素を暴露した培養液中の胚発生は、セリシンを添加したことで著しく改善された。さらに、セリシンは胚盤胞と拡張胚盤胞の DNA 損傷率において明らかな効果を認めた。Dash ら¹³ はセリシンが過酸化水素で処理した細胞において、乳酸脱水素酵素、カタラーゼ、チオバルビツール酸反応物質（いずれも酸化ストレスのパラメーター）を減少したと報告している。また、彼らはセリシンが培養中に ROS のレベルを減少させた（過酸化水素で誘発した酸化ストレスから保護した）理由として、セリシンを構成する水酸基アミノ酸による断片(ROS)のキレート化による抗酸化作用のメカニズムとしている¹¹。それ故、セリシンはユニークな抗酸化能力によって酸化ストレスを防御することにより胚の発生と品質を改善したと考えられた。

一方、作出胚を受胎牛に移植した後、妊娠成立とその後の正常分娩での胎児出生は、体外胚生産の品質や生存性における別角度からの指標となり得る。今回の研究では、胚培養中の個別・グループ培養条件やセリシン添加では、OPU 由来胚を凍結保存後、融解し直接移植した後の妊娠率、流産率、死産率や正常分娩に影響を示さなかった。その理由の 1 つの仮説として、凍結保存する前に凍結可能(良質)胚のみを選抜したからと考えられた。

また、今回の研究で得た妊娠率(20-29%)は、OPU 由来の凍結融解胚を受胎牛に移植した Merton ら²⁸により報告された妊娠率(44%)よりも低かった。このことについては、培養システムや凍結法の相違を今後明らかにしなければならないと考えられる。これらの結果から、セリシンを培養液に添加しても、グループ培養における

OPU 由来胚の発生や胚移植後の胚の生存性においての有効性は認められなかった。しかし、今回セリシン存在下では「と畜卵巣」由来胚と同様に、個別培養での OPU 由来胚の発生と品質を改善し、凍結可能(優良)胚の個数は増加できる効果的な培養方法としての可能性が示唆された。

次にセリシンを添加された凍結液によって凍結保存された様々な哺乳類細胞や昆虫細胞種は、血清を含んだ一般的な凍結液と同様、生存率に効果的であることが実証されている³³が、今回、我々は血清やアルブミンの代替物としてセリシンを用いてウシ胚を凍結保存することが可能であることを初めて報告した。ウシ胚の凍結保存には FBS や BSA を含んだ凍結液が一般的ではあるものの、BSE に関連するプリオンや伝染性ウィルスが混入する可能性があるために FBS や BSA の使用は基本的に避けなければならない。セリシンは薬、一般用医薬品、化粧品、食品および健康食品に添加されるように安全性が高く³⁶、血清や BSA からのバイオハザードも除去できる利点がある。これまで、ポリビニルアルコール(PVA)やポリビニルピロリドン(PVP)のような高分子無機化合物が胚の凍結液内に血清やアルブミンの代用品として評価されている³⁷⁻³⁹。Sommerfeldら³⁸は PVA を添加した凍結液で凍結されたウシ体外胚の融解後の発育を血清添加凍結液の胚と比較したところ、有意に低下したと報じ、さらに、PVA や PVP を添加した凍結液で凍結保存されたウシ体内胚の移植後の妊娠率は血清添加液で凍結された胚と比較して低下したとの一報もある³⁹。

一方、我々はセリシン濃度に関係なくセリシン添加区と血清添加区との間に凍結融解された体外胚の生存率や発育率において有意な差は認められないことを示し

た。また、20%FBS を含んだ凍結液に BSA の代用としてセリシンを添加して凍結された体内胚を直接移植した後、受胎牛における妊娠率や正常分娩率の増加が認められた。さらに、0.5%セリシン単独の添加液と0.4%BSA および 20%FBS を含んだ液で凍結された胚をそれぞれ受胎牛に移植した後の妊娠率、流産率、死産率と正常分娩率においては両者に有意な差がなかった。セリシンは凍結保存中においてジメチルスルホキシド(DMSO)のような凍結保護剤の毒性から哺乳類細胞を防御するとの報告がある³³。さらに、セリシンは哺乳類細胞の無血清培養と凍結保存液の両方に有益であるとしている³⁴。それ故、今回の報告は、セリシンが凍結保存液に添加される BSA や FBS の代用になり得ることを証明し、ウシ胚の無血清凍結保存液として有用であることが示された。セリシンを添加した凍結液は、BSE のような伝染性物質の誤混入する可能性がある状況下においては、国際貿易の上で、血清類に替わる重要な実用的応用品となり得ることが認められた。

最後に本研究から、0.5%セリシンを体外胚培養液に添加して個別培養したところ、「と畜卵巣」由来卵子からのウシ胚の発生や品質は改善された。さらに、このセリシンが個別培養のウシ胚において酸化ストレスに保護的効果があり、それぞれのステージでの胚の細胞数に影響するのではなく、胚発育の進行を促進すると考えられた。同様に、個別培養での OPU 由来胚の発生と品質も改善し、凍結可能(優良)胚の個数は増加できる効果的な培養方法の可能性が示され、作出胚は凍結保存後、受胎牛に直接移植し、産子を得ておりその安全性も認められた。また、体内胚では凍結液にセリシン添加区と血清添加区の両方で凍結された胚をそれぞれ受胎牛に移植した後の妊娠率、流産率、死産率と正常分娩率においては両者に差は認められ

なかった。

以上の結果から安全性の高いセリシンの使用は、OPU 技術を用いたウシ体外胚における個別培養での生産性向上が期待でき、新たな個別培養法として牛群の育種改良と体内および体外胚の広域流通における無血清凍結保存に寄与できると考えられた。

謝辞

本稿を終了するにあたり、各研究について終始暖かい激励とご指導、ご鞭撻を賜りました山口大学共同獣医学部 音井威重教授に心より感謝申し上げます。

学位論文審査においては、貴重なご指導とご助言を頂いた山口大学共同獣医学部 山本芳実教授、田浦保穂教授、佐藤宏教授並びに鹿児島大学共同獣医学部 高木光博准教授に深謝致します。

また、各研究において試験牛の維持管理、実験室内外の諸作業および研究成果の実用化に向けてご尽力頂いた肉用牛改良研究所 池畑義久主任研究員、倉富哲男技術補佐員、中津川誠技術補佐員、久徳輝幸技術補佐員、栢山弘志技術補佐員並びに始良家畜保健衛生所 鬼塚剛防疫課長に感謝致します。

最後に、本稿を作成するにあたり、多大なご協力を頂いた福重哲也肉用牛酪農係長および大田均畜産課長に心から感謝の意を表します。

参考文献

- 1 van Wagendonk-de Leeuw A.M., Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. *Theriogenology* 65 (5), 914 (2006).
- 2 Mapletoft R.J., Hasler J.F., Assisted reproductive technologies in cattle: a review. *Rev Sci Tech* 24 (1), 393 (2005).
- 3 Fujita T., Umeki H., Shimura H., Kugumiya K., Shiga K., Effect of group culture and embryo-culture conditioned medium on development of bovine embryos. *J Reprod Dev* 52 (1), 137 (2006).
- 4 Donnay I., Van Langendonck A., Auquier P., Grisart B., Vansteenbrugge A., Massip A., Dessy F., Effects of co-culture and embryo number on the in vitro development of bovine embryos. *Theriogenology* 47 (8), 1549 (1997).
- 5 O'Doherty E.M., Wade M.G., Hill J.L., Boland M.P., Effects of culturing bovine oocytes either singly or in groups on development to blastocysts. *Theriogenology* 48 (1), 161 (1997).
- 6 Vajta G., Peura T.T., Holm P., Paldi A., Greve T., Trounson A.O., Callesen H., New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the Well of the Well (WOW) system. *Mol Reprod Dev* 55 (3), 256 (2000).
- 7 Carolan C., Lonergan P., Khatir H., Mermillod P., In vitro production of bovine embryos using individual oocytes. *Mol Reprod Dev* 45 (2),

- 145 (1996).
- 8 Goovaerts I.G., Leroy J.L., Van Soom A., De Clercq J.B., Andries S., Bols P.E., Effect of cumulus cell coculture and oxygen tension on the in vitro developmental competence of bovine zygotes cultured singly. *Theriogenology* 71 (5), 729 (2009).
- 9 Ward F.A., Lonergan P., Enright B.P., Boland M.P., Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technology. *Theriogenology* 54 (3), 433 (2000).
- 10 Zhang Y.Q., Applications of natural silk protein sericin in biomaterials. *Biotechnol Adv* 20 (2), 91 (2002).
- 11 Kato N. Sato S., Yamanaka A., Yamada H., Fuwa N., Nomura M., Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity. *Biosci Biotechnol Biochem* 62 (1), 145 (1998).
- 12 Zhaorigetu S., Yanaka N., Sasaki M., Watanabe H., Kato N., Inhibitory effects of silk protein, sericin on UVB-induced acute damage and tumor promotion by reducing oxidative stress in the skin of hairless mouse. *J Photochem Photobiol B Biol* 71 (1-3), 11 (2003).
- 13 Dash R., Acharya C., Bindu P.C., Kundu S.C., Antioxidant potential of silk protein sericin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in skin fibroblasts. *BMB Rep* 41 (3), 236 (2008).
- 14 Dash R., Mandal M., Ghosh S.K., Kundu S.C., Silk sericin protein of tropical tasar silkworm inhibits UVB-induced apoptosis in human skin keratinocytes. *Mol Cell Biochem* 311 (1-2), 111 (2008).

- 15 Aramwit P., Kanokpanont S., De-Eknamkul W., Kamei K., Srichana T., The effect of sericin with variable amino-acid content from different silk strains on the production of collagen and nitric oxide. *J Biomater Sci Polym Ed* 20 (9), 1295 (2009).
- 16 Harvey A.J., The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. *Anim Reprod Sci* 98 (1-2), 113 (2007).
- 17 Terada S., Nishimura T., Sasaki M., Yamada H., Miki M., Sericin, a protein derived from silkworms, accelerates the proliferation of several mammalian cell lines including a hybridoma. *Cytotechnology* 40 (1-3), 3 (2002).
- 18 Papaioannou V.E., Ebert K.M., The preimplantation pig embryo: cell number and allocation to trophectoderm and inner cell mass of the blastocyst in vivo and in vitro. *Development* 102 (4), 793 (1988).
- 19 Jiang H.S., Wang W.L., Lu K.H., Gordon I., Polge C., Examination of cell numbers of blastocysts derived from IVM, IVF, and IVC of bovine follicular oocytes. *Theriogenology* 37(1), 229 abstr. (1992).
- 20 Guérin P., El Mouatassim S., Ménézo Y., Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update* 7 (2), 175 (2001).
- 21 Morales H., Tilquin P., Rees J.F., Massip A., Dessy F., Van Langendonck A., Pyruvate prevents peroxide-induced injury of in vitro preimplantation bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 52 (2), 149 (1999).

- 22 Nakao H., Nakatsuji N., Effects of co-culture, medium components and gas phase on in vitro culture of in vitro matured and in vitro fertilized bovine embryos. *Theriogenology* 33 (3), 591 (1990).
- 23 Galli C., Crotti G., Notari C., Turini P., Duchi R., Lazzari G., Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology* 55(6), 1341 (2001).
- 24 Feng W.G., Sui H.S., Han Z.B., Chang Z.L., Zhou P., Liu D.J., Bao S., Tan J.H., Effects of follicular atresia and size on the developmental competence of bovine oocytes: a study using the well-in-drop culture system. *Theriogenology* 67 (8), 1339 (2007).
- 25 Boni R., Roelofsen M.W.M., Pieterse M.C., Kogut J., Kruip ThAM., Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. *Theriogenology* 48 (2), 277 (1997).
- 26 Paria B.C., Dey S.K., Preimplantation embryo development in vitro: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(12), 4756 (1990).
- 27 Matoba S., Fair T., Lonergan P., Maturation, fertilisation and culture of bovine oocytes and embryos in an individually identifiable manner: a tool for studying oocyte developmental competence. *Reprod Fertil Dev* 22 (5), 839 (2010).
- 28 Merton J.S., Knijn H.M., Flapper H., Dotinga F., Roelen B.A., Vos P.L., Mullaart E., Cysteamine supplementation during in vitro

- maturation of slaughterhouse- and opu-derived bovine oocytes improves embryonic development without affecting cryotolerance, pregnancy rate, and calf characteristics. *Theriogenology* 80 (4), 365 (2013).
- 29 Voelkel S.A., Hu Y.X., Direct transfer of frozen–thawed bovine embryos. *Theriogenology* 37 (1), 23 (1992).
- 30 Dochi O., Yamamoto Y., Saga H., Yoshida N., Kano N., Maeda J., Miyata K., Yamauchi A., Tominaga K., Oda Y., Nakashima T., Inohae S., Direct transfer of bovine embryos frozen–thawed in the presence of propylene glycol or ethylene glycol under on-farm conditions in an integrated embryo transfer program. *Theriogenology* 49 (5), 1051 (1998).
- 31 Martínez A.G., Brogliatti G.M., Valcarcel A., de las Heras M.A., Pregnancy rates after transfer of frozen bovine embryos: a field trial. *Theriogenology* 58 (5), 963 (2002).
- 32 Thibier M., Biosecurity and the various types of embryos transferred. *Reprod Domest Anim* 41 (4), 260 (2006).
- 33 Sasaki M., Kato Y., Yamada H., Terada S., Development of a novel serum-free freezing medium for mammalian cells using the silk protein sericin. *Biotechnol Appl Biochem* 42 (Pt2), 183 (2005).
- 34 Ohnishi K., Murakami M., Morikawa M., Yamaguchi A., Effect of the silk protein sericin on cryopreserved rat islets. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 19 (4), 354 (2012).

- 35 Miyamoto Y., Teramoto N., Hayashi S., Enosawa S., An improvement in the attaching capability of cryopreserved human hepatocytes by a proteinaceous high molecule, sericin, in the serum-free solution. *Cell Transplant* 19 (6), 701 (2010).
- 36 Kundu S.C., Dash B.C., Dash R., Kaplan D.L., Natural protective glue protein, sericin bioengineered by silkworms: Potential for biomedical and biotechnological applications. *Prog Polym Sci* 33 (10), 998 (2008).
- 37 Nowshari M.A., Brem G., The protective action of polyvinyl alcohol during rapid-freezing of mouse embryos. *Theriogenology* 53 (5), 1157 (2000).
- 38 Sommerfeld V., Niemann H., Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology* 38 (2), 95 (1999).
- 39 Seidel G.E.J., Elsdon R.P., Brink Z., Cryopreservation of bovine embryos in media with chemically defined macromolecules. *Theriogenology* 33, 322 abstr. (1990).
- 40 Gardner D.K., Lane M., Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Biol Reprod* 48 (2), 377 (1993).
- 41 Lee E.S., Fukui Y., Synergistic effect of alanine and glycine on bovine embryos cultured in a chemically defined medium and amino acid uptake by in vitro-produced bovine morulae and blastocysts. *Biol Reprod* 55 (6), 1383 (1996).

- 42 Rosenkrans C.F.J., First N.L., Culture of bovine zygotes to the blastocyst stage: effects of amino acids and vitamins. *Theriogenology* 35, 266 abstr. (1991).
- 43 Naoi H., Otoi T., Shimamura T., Karja N.W., Agung B., Shimizu R., Taniguchi M., Nagai T., Developmental competence of cat oocytes from ovaries stored at various temperature for 24 h. *J Reprod Dev* 53 (2), 271 (2007).
- 44 Otoi T., Yamamoto K., Horikita N., Tachikawa S., Suzuki T., Relationship between dead cells and DNA fragmentation in bovine embryos produced in vitro and stored at 4 degrees C. *Mol Reprod Dev* 54 (4), 342 (1999).
- 45 Kimura K., Spate L.D., Green M.P., Roberts R.M., Effects of oxidative stress and inhibitors of the pentose phosphate pathway on sexually dimorphic production of IFN-tau by bovine blastocysts. *Mol Reprod Dev* 68 (1), 88 (2004).
- 46 Meintjes M., Bellow M.S., Broussard J.R., Paul J.B., Godke R.A., Transvaginal aspiration of bovine oocytes from hormone-treated pregnant beef cattle for IVF. *Theriogenology* 39 (1), 266 abstr. (1993).
- 47 Takuma T., Sakai S., Ezoe D., Ichimaru H., Jinnouchi T., Kaedei Y., Nagai T., Otoi T., Effects of season and reproductive phase on the quality, quantity and developmental competence of oocytes aspirated from Japanese black cows. *J Reprod Dev* 56 (1), 55

(2010).

- 48 Van Soom, A., Ysebaert M.T., Vanhoucke-De Medts A., Van de Velde A., Merton S., Delval A., Van Langendonck A., Donnay I., Vanroose G., Bols P.E., de Kruif A., Sucrose-induced shrinkage of in vitro produced bovine morulae: effect on viability, morphology and ease of evaluation. *Theriogenology* 46 (7), 1131 (1996).
- 49 Robertson, I., Nelson, R.E., Certification and identification of the embryo, In: Stringfellow DA, Seidel SM (eds), *Manual of the International Embryo Transfer Society, Third ed.* 103 (1998).
- 50 Ginther O. J., Knopf L., Kastelic J.P., Ovarian follicular dynamics in heifers during early pregnancy. *Biol Reprod* 41 (2), 247 (1989).
- 51 Cox J.F., Alfaro V., In vitro fertilization and development of OPU derived goat and sheep oocytes. *Reprod Domest Anim* 42 (1), 83 (2007).
- 52 Chaubal S.A., Molina J.A., Ohlrichs C.L., Ferre L.B., Faber D.C., Bols P.E.J., Riesen J.W., Tian X., Yang X., Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. *Theriogenology* 65 (8), 1631 (2006).
- 53 Ding L.J., Tian H.B., Wang J.J., Chen J., Sha H.Y., Chen J.Q., Cheng G.X., Different intervals of ovum pick-up affect the competence of oocytes to support the preimplantation development of cloned bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 75 (12), 1710 (2008).

- 54 Petyim S., Båge R., Forsberg M., Rodríguez-Martínez H., Larsson B.,
The effect of repeated follicular puncture on ovarian function in
dairy heifers. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 47 (10), 627
(2000).

图表

表 1. 個別培養された「と畜卵巣由来胚」の発生と品質におけるセリシン濃度の効果¹

セリシン濃度(%)	供試胚数	発生胚数 (%)			細胞数の平均 ± 標準誤差 (供試胚数)	
		合計	胚盤胞	拡張胚盤胞	胚盤胞	拡張胚盤胞
0	220	103 (45.1±3.6) ^{a,c}	42 (17.2 ± 2.6)	61 (27.9 ± 3.7) ^a	93.2 ± 4.8 (13)	150.0 ± 8.1 (26)
0.1	220	112 (52.5±3.9) ^{ab}	44 (19.4 ± 3.0)	68 (33.1 ± 4.0) ^{ab}	97.4 ± 5.5 (18)	155.1 ± 7.3 (32)
0.5	220	126 (59.9±3.7) ^b	44 (18.8 ± 2.8)	82 (41.1 ± 4.0) ^b	96.2 ± 3.3 (19)	159.6 ± 6.4 (38)
1.0	220	94 (40.2±4.1) ^c	30 (12.5 ± 3.3)	64 (27.7 ± 3.2) ^a	95.3 ± 6.3 (15)	148.0 ± 4.8 (22)

¹ 4区7~8胚を1回とし、30回繰り返し実施。百分率は平均±標準誤差を示す。

^{a-c} 同列異符号間で有意差あり (P<0.05)

表 2. 酸化ストレス条件下において個別培養された「と畜卵巢由来胚」の発生と品質におけるセリシン濃度の効果¹

過酸化水素 の暴露濃度 (μ M)	セリシン 濃度(%)	供試 胚数	発生胚数(%)			細胞数の平均 \pm 標準誤差 (供試胚数)	
			合計	胚盤胞	拡張胚盤胞	胚盤胞	拡張胚盤胞
50	0	160	38 (22.8 \pm 3.8) ^a	18 (9.9 \pm 2.8)	20 (12.9 \pm 2.4) ^{ab}	91.5 \pm 3.0 (18)	132.1 \pm 4.0 (20) ^a
	0.5	160	55 (33.7 \pm 4.2) ^{ab}	21 (12.3 \pm 2.2)	34 (21.5 \pm 3.3) ^b	93.2 \pm 3.7 (21)	142.4 \pm 5.0 (34) ^{ab}
100	0	165	40 (23.7 \pm 3.7) ^a	26 (14.8 \pm 2.5)	14 (8.9 \pm 2.2) ^a	98.5 \pm 5.8 (26)	145.6 \pm 7.5 (14) ^{ab}
	0.5	165	61 (36.5 \pm 4.7) ^b	21 (11.8 \pm 2.5)	40 (24.7 \pm 5.4) ^{bc}	99.2 \pm 4.3 (21)	153.9 \pm 4.6 (40) ^b

¹ 2 区 13~4 胚を 1 回とし、12 回繰り返し実施。百分率は平均 \pm 標準誤差を示す。

a-c 同列異符号間で有意差あり (P<0.05)

表 3. グループおよび個別培養において「経腔採卵由来胚」の発生における培養液へのセリシン添加の効果¹

培養条件	セリシン濃度(%)	供試胚数 ²	発生胚数 ³ (%)		
			4細胞期	胚盤胞	凍結可能胚盤胞 ⁴
集団	0	140	113 (79.5 ± 5.9)	80 (54.9 ± 8.6) ^a	55 (35.0 ± 7.1) ^a
	0.5	131	111 (85.5 ± 3.5)	85 (60.9 ± 6.6) ^a	66 (45.1 ± 7.0) ^a
個別	0	103	89 (84.9 ± 5.2)	31 (29.5 ± 3.8) ^b	19 (18.8 ± 2.6) ^b
	0.5	103	92 (88.4 ± 3.5)	49 (47.9 ± 5.0) ^{a,b}	37 (36.7 ± 3.9) ^a

¹ 集団および個別培養とも 12 回繰り返し実施。百分率は平均±標準誤差を示す。

² 体外受精 24 時間後に均等に分割した 2 細胞期胚は、実験 4 区に割り当てられた後、個別および集団で培養した。

³ 4 細胞期と胚盤胞へ発生した胚は、それぞれ 2 細胞期胚の培養後、24 時間目と 7 日目に評価した。

⁴ ランク A (good と fair) とした胚盤胞を凍結可能胚と分類した。

^{a,b} 同列異符号間で有意差あり (P<0.05)

表 4. 凍結融解した「経膈採卵由来胚」を直接移植した後、受胎牛の妊娠率、流産率、死産率および正常分娩率における培養液へのセリシン添加の効果

培養条件	セリシン濃度(%)	移植頭数	妊娠牛頭数 ¹	牛の頭数 ² (%)		
				流産 ³	死産 ⁴	正常分娩 ⁵
集団	0	54	14 (25.9)	0 (0)	2 (14.3)	12 (85.7)
	0.5	57	17 (29.8)	0 (0)	0 (0)	16 (100)
個別	0	19	4 (21.1)	0 (0)	1 (25.0)	3 (75.0)
	0.5	30	6 (20.0)	1 (16.7)	0 (0)	5 (83.3)

¹ 妊娠した牛の頭数／胚を移植した牛の頭数

² 集団培養(0.5%セリシン添加区)の妊娠牛 1 頭は、事故死のために除外した。

³ 流産した牛の頭数／(妊娠牛の頭数－死亡牛の頭数)。

⁴ 死産した牛の頭数／(妊娠牛の頭数－流産・死亡牛の頭数)。

⁵ 正常分娩した牛の頭数／(妊娠牛の頭数－死亡牛の頭数)。

表 5. 凍結融解した後、「ウシ体外胚」の生存性と発育における凍結液へのセリシン添加濃度の効果¹

セリシン濃度 ² (%)	供試胚数	胚数 (%)		
		破損した透明帯	生存した ³	孵化胚盤胞への発生 ⁴
Control	106	11 (13.5 ± 4.0)	84 (81.8 ± 4.3)	68 (68.2 ± 6.2)
0.1	107	15 (12.7 ± 4.4)	88 (84.8 ± 5.1)	74 (71.6 ± 5.7)
0.5	106	13 (11.1 ± 3.5)	89 (82.3 ± 2.5)	78 (69.4 ± 5.7)
1	104	7 (5.7 ± 2.9)	92 (81.8 ± 7.4)	76 (66.8 ± 7.1)

¹ 4区 13~4胚を1回とし、8回繰り返し実施。百分率は平均±標準誤差を示す。

² 凍結は、様々な濃度のセリシンを添加した凍結液で一般的な緩慢凍結法を用いた。コントロール区は、セリシンの代替に 0.4% BSA と 20% FBS を添加した。

³ 胚の生存率としては、融解された胚を 24 時間体外培養後、胞胚腔の再拡張で評価した。

⁴ 孵化した胚盤胞率は、培養の 72 時間後に評価した。

表 6. 凍結融解した「ウシ体内胚」を直接移植した後、受胎牛の妊娠率、流産率、死産率および正常分娩率における凍結液へのセリシン添加の効果

凍結液 ¹	移植頭数	妊娠牛頭数 ²	牛の頭数 ³ (%)		
			流産 ⁴	死産 ⁵	正常分娩 ⁶
コントロール	674	270 (40.1) ^a	23 (8.8)	8 (3.4)	227 (87.3) ^a
0.5S+20F	283	134 (47.3) ^b	6 (4.6)	1 (0.8)	123 (94.6) ^b
0.5S	249	105 (42.2) ^{a,b}	4 (3.8)	3 (3.0)	97 (92.4) ^{a,b}

¹ 体内胚は、0.4%BSA + 20%FBS (コントロール区)、0.5%セリシン + 20%FBS (0.5S+20F 区) および 0.5% セリシン単独 (0.5S 区) が添加された凍結液により、凍結され、受胎牛に直接移植された。

² 妊娠した牛の頭数 / 胚を移植した牛の頭数

³ コントロール区と 0.5S+20F 区の妊娠牛それぞれ 10 頭と 4 頭は、売却したので除外した。

⁴ 流産した牛の頭数 / (妊娠牛の頭数 - 売却した牛の頭数)。

⁵ 死産した牛の頭数 / (妊娠牛の頭数 - 流産・売却した牛の頭数)。

⁶ 正常分娩した牛の頭数 / (妊娠牛の頭数 - 売却した牛の頭数)。

^{a,b} 同列異符号間で有意差あり (P<0.05)

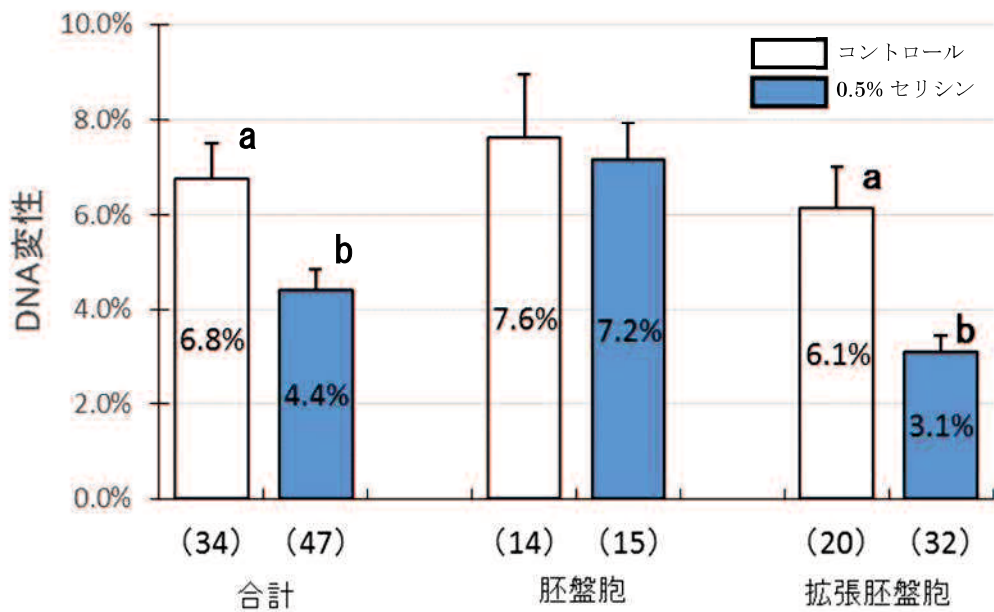


図 1. 個別培養中に 100 μ M 過酸化水素を暴露した胚から発生した胚盤胞の DNA 損傷率におけるセリシンの効果

それぞれの棒グラフは、平均 \pm 標準誤差を示す。

変性した核内 DNA の評価のために用いられた胚盤胞の数は、下段にそれぞれの区分で示した。

a^{*}b 同列異符号間で有意差あり (P<0.01)