Effect of Cumulus Cells on the Development of Bovine Oocytes Matured and Fertilized *in Vitro*

Naokazu TAKADA, Akio TSUKAMOTO¹⁾, Yousuke KUROKAWA²⁾, and Yasuo SHIOYA³⁾

Miyagi Prefectural Animal Industry Experiment Station, Iwadeyama-cho 989-64,

¹⁾Okayama Prefectural Center for Animal Husbandry, Osa-cho 719-35,

²⁾Saga Prefectural Livestock Experiment Station, Yamauchi-cho 849-23, and

³⁾National Institute of Animal Industry, Tsukuba Norin Kenkyudanchi, P.O. Box 5, Ibaraki-ken 305

(Accepted for publication August 20, 1990)

Summary. Effect of the contact between embryos and cumulus cell monolayers on the development of 8–16 cell bovine embryos to blastocysts was investigated in IVF system. *In vitro* matured oocytes were inseminated by frozen-thawed sperm capacitated with heparin. After 72 hr of the insemination, oocytes were removed from cumulus cells and embryos developed to 8–16 cell stage were cultured for eight days after insemination under three different conditions; i.e. (i) direct contact: the embryos were directly placed on the cumulus cell monolayers, (ii) non-contact: a permeable filter was placed between embryos and the cumulus cell monolayers, (iii) without cumulus cells: the embryos were cultured without cumulus cell monolayers. Frozen-thawed semen from two bulls were used. The proportion of embryos developed to blastocyst stage (no. of blastocysts/no. of 8–16 cell embryos) were 32.9 (23/70)~36.9 (24/65), 25.7 (18/70)~44.1 (30/68) and 7.4 (5/68)~9.2% (6/65), respectively. The result showed that the direct contact of embryos with cumulus cell monolayers was not necessary for the expression of the co-culture effect on the development to blastocyst stage and suggested that the effect was due to diffusable factors.

KEY WORDS: BOVINE EMBRYOS, *IN VITRO* FERTILIZATION, CO-CULTURE, CUMULUS CELLS.

Jpn J Anim Reprod 37, 9–13, 1991

牛体外受精卵の発育に及ぼす卵丘細胞の影響

高田 直和・塚本 章夫¹⁾・黒川 洋介²⁾・塩谷 康生³⁾

宮城県畜産試験場 〒989-64 玉造郡岩出山町

¹⁾岡山県総合畜産センター 〒719-35 阿哲郡大佐町

²⁾佐賀県畜産試験場 〒849-23 杵島郡山内町

³⁾農林水産省畜産試験場 〒305 茨城県筑波農林研究団地内局私書箱 5 号

牛の体内及び体外受精卵を卵のみで体外で培養すると 8–16細胞期で発生が停止する (Thibault, 1966; Camous *et al.*, 1984; Eystone and First, 1986). 同様の発生停止はヒツジでは 8–16細胞期に (Bondioli and Wright, 1980) ブタでは 4 細胞期に (Davis, 1985), マウスでは 2 細胞期に (Whittingham and Biggers, 1967) 起こることが報告されている. しかしながら牛の体外受精卵は, 卵丘

細胞 (Fukuda *et al.*, 1987) や, 卵管上皮細胞 (Eystone *et al.*, 1987) もしくは栄養外胚葉 (Nakao *et al.*, 1988) のいずれかで共培養すると胚盤胞まで発育させることができる. 牛体外受精卵が, 卵丘細胞と共培養することによって, 胚盤胞まで発育する作用機構については, 未だ不明であるが, 今のところ, 胚が卵丘細胞層と接触することによる物理的因子によるものか, あるいは液性因子

によるものかの二点が考えられる。本実験では、牛体外受精卵を卵丘細胞層と接触させずに共培養する方法を考案し、その後の胚の發育を調べた。

材料と方法

未成熟卵の採取と体外成熟：ホルスタイン種の卵巣を食肉処理場において屠畜直後に採取した。卵巣は抗生物質（ペニシリン100 U/ml, ストレプトマイシン100 μ g/ml, 明治製薬）を加え38～39℃に温めた生理的食塩水に入れて実験室に運び、5 mm 以下の小卵胞から卵子を吸引採取した。卵子の吸引には、抗生物質と 3 mg/ml の牛血清アルブミン（BSA）を加えた修正リン酸緩衝液の少量を18Gの針を付けた 5 ml の注射器に吸引したものを使用した。緊密な卵丘細胞層が付着している卵子のみを選抜し、流動パラフィンで覆った100 μ l の培養液中に10個ずつ入れ、5 %炭素ガス、95 %空気、39℃の炭素ガス培養器に入れ20～24時間培養した。成熟培地は、25 mM ヘpes緩衝 TCM199（GIBCO）に、非働化子牛血清（CS）を10%，FSH（アントリン，デンカ製薬）を2 μ g/ml，エストラジオール-17 β （Sigma）を1 μ g/ml 加えて用いた。

体外受精：精子は2頭の黒毛和種の凍結精液を用いた。融解後、BSA を除いた修正タイロッド液（BO 液，Brackett and Oliphant, 1975）にカフェイン（安息香酸ナトリウムカフェイン中のカフェインを50%として計算，Sigma）を10 mM 加えた液（Caf-BO 液）で2回洗浄した。洗浄後、精子濃度を Caf-BO 液で 20×10^6 精子/ml に調整した精子浮遊液を、BSA 20 mg/ml とヘパリン10U/ml（ノボヘパリン注，ノボインダストリーA/S）を含む修正タイロッド液（Hep-BSA-BO 液）で等倍に希釈した。この精子浮遊液を、100 μ l の小滴にして流動パラフィンで覆い、炭素ガス培養器で15分間培養した。体外成熟卵を Hep-BSA-BO 液で2回洗浄し、精子浮遊液に約50個ずつ導入した。

体外發育：卵子は媒精6時間後に発生培地に移した。発生培地は、25 mM ヘpes緩衝 TCM199に非働化 CS10%

を加え、直径35 mm のプラスチックシャーレ（Nunc, Inter Med）に4 ml 分注し、流動パラフィンで覆って用いた。1シャーレあたりの卵子数は、50～100個とした。一部の卵子を媒精18時間後に抜き取り、標本にして精子進入状況を検査した。媒精72時間後、卵子を卵丘細胞から取り外し、卵分割状況を検査するとともに、8-16細胞期に發育した胚を以下の3区に分けて媒精後8日目まで培養を続けた。

接触区;8-16細胞期胚を、卵丘細胞が単層状に發育したシャーレに入れて培養した。

非接触区;底面が 0.4μ m のフィルターの円筒形セル（Millicell-HA，ミリポア社）に胚を入れ、このセルを接触区と同様に卵丘細胞が単層状に發育したシャーレに入れて培養した。

非共培養区;新しいシャーレに発生培地を4 ml 入れて胚を培養した。いずれの区においても媒精後8日目に胚盤胞への發育を検査した。

脱出胚盤胞への發育：媒精後8日目までに出現した胚盤胞はすべて、接触区と同様に卵丘細胞層の上に置いてさらに48時間培養し、脱出胚盤胞への發育率を調べた。

統計処理：差の検定は、 χ^2 検定によった。

結 果

媒精18時間で抜き取って調べた受精率は、精子Aで93.3 (14/15)～100% (17/17)，精子Bで94.1 (16/17)～100% (17/17)と良好であった。体外受精卵の発生率を表1に示した。2細胞期以上への発生率は43.3～59.6%，8-16細胞期への発生率は22.7～29.6%であった。8-16細胞期胚を卵丘細胞層と接触あるいは接触させないで培養した場合の胚盤胞への發育率（胚盤胞数/供試8-16細胞期胚数）を表2に示した。接触区、非接触区および非共培養区における胚盤胞への發育率は、それぞれ32.9 (23/70)～36.9 (24/65)，25.7 (18/70)～44.1 (30/68)および7.4 (5/68)～9.2% (6/65)であり、非共培養区で有意に低かった ($P < 0.01$)。發育した胚盤胞の媒精後8日目以降における脱出胚盤胞への發育率（脱出胚盤胞数/

Table 1. *In vitro* development of bovine embryos following *in vitro* maturation and fertilization

Bull	No. of oocytes	Trials	No. of oocytes cleaved (%)	No. of oocytes developed to 8-16 cell (%)
A	984	5	426(43.3)	223(22.7)
B	840	4	501(59.6)	249(29.6)

Table 2. Effect of co-culture with cumulus cells on development of 8–16 cell bovine embryos to blastocysts

Bull	Trials	No. of embryos developed (%)		
		Co-culture with cumulus cells		Without cumulus cells
		Direct contact	Non contact	
A	5	24/65(36.9) ^{a)}	30/68(44.1) ^{a)}	6/65(9.2) ^{b)}
B	4	23/70(32.9) ^{a)}	18/70(25.7) ^{a)}	5/68(7.4) ^{b)}

P<0.01; a vs b.

Table 3. Effect of co-culture with cumulus cells on hatching of blastocysts developed *in vitro*

Bull	Trials	No. of hatched blastocysts/no. of blastocysts		
		Co-culture with cumulus cells		Without cumulus cells
		Direct contact	Non contact	
A	5	18/24(75.0) ^{a)}	22/30(73.3) ^{a)}	1/6(16.7) ^{b)}
B	4	16/23(69.6) ^{a)}	13/18(72.2) ^{a)}	0/5(0) ^{b)}

P<0.01; a vs b.

胚盤胞数)を表3に示した。接触区,非接触区および非共培養区における脱出胚盤胞への発育率は,それぞれ69.6(16/23)~75.0(18/24),72.2(13/18)~73.3(22/30)および0(0/5)~16.7%(1/6)であり,非共培養区で有意に低かった(P<0.01)。

考 察

牛体外受精によって得た8-16細胞期胚を卵丘細胞層に接触あるいは接触させないで培養した結果,接触していない場合でも接触している場合と同様の割合で胚盤胞に発育することが明らかとなった。

牛体外受精卵を卵丘細胞と共培養すると胚盤胞へ高率に発育することはすでに多数報告されている(Kajihara *et al.*, 1987; Aoyagi *et al.*, 1989; Berg and Brem, 1990)。しかしながら,胚盤胞への発育促進効果の原因はよく分かっていない。Heymanら(1987)は,生体から回収した牛初期胚を,栄養外胚葉の断片と共培養すると,46%が桑実胚に発育し,同組織を培養して得られた条件付け培地によっても同様の結果が得られることを報告した。またEystoneとFirst(1989)は,生体から回収した牛初期胚を,卵管上皮細胞と共培養すると,43%が桑実胚~胚盤胞に発育し,条件付け培地でも同様の結果が得ら

れることを報告している。これらの実験結果は,共培養系における細胞の増殖支持作用が,液性因子であることを示唆するものである。本実験結果は共培養に用いた細胞の種類は異なり,また条件付け培地は用いなかったが,胚の発育促進作用は液性因子であるとした彼らの報告を支持するものであった。

胚の発育が液性因子により促進される機構は二点考えられる。第一点は卵丘細胞が胚の細胞増殖を促進する物質を分泌するというものである。卵細胞はprogesteroneとestradiol-17 β の2種類のステロイドホルモン(Hamberger *et al.*, 1978; Henderson *et al.*, 1987),ピルビン酸(Donahue and Stern, 1968)や特異的蛋白(Landefeld *et al.*, 1979)を分泌していることが報告されており,これらの物質が胚の発育を促進している可能性が考えられる。第二点は卵丘細胞の代謝により培養液に含まれる胚の発育抑制物質が除去されるというものである。培養液に含まれる発育抑制物質については,例えば,Ham's F10に含まれるHypoxanthineはマウスの2-cell block(Loutradis, 1987)を,修正タイロード液に含まれる燐酸とグルコースはハムスターの2-cell block(Schini and Bavister, 1988)を起こすことが知られている。しかしながら,これらの仮説は現在のところ

証明されていない。

胚盤胞への発育率に影響する要因として、卵巣の個体差 (Goto *et al.*, 1990), 種雄牛の個体差 (Yamada *et al.*, 1988), 発育培地に添加する血清の種類 (Fujitani *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 1989), 発育培地の量 (Takuma *et al.*, 1989), 共培養する細胞の濃度 (Tokunaga and Tsunoda, 1989) などが報告されている。牛体外受精卵を卵丘細胞と共培養した場合における胚盤胞への発生率は、報告者により異なる (15.1% : Goto *et al.*, 1988; 22.2% : Jiang *et al.*, 1989)。本実験で得られた、接触区における8-16細胞期胚の胚盤胞への発育率は、32.9~36.9%であった。これは、供試した成熟卵に対する率として考えてみると7.3~8.2%となる。これは Goto ら (1988) や Jiang ら (1989) に比べると低率であったが、供試した卵数 (50~100) に対して発育培地の量 (4 ml) が多かったことによると考えられる。また媒精72時間で8細胞期に達しない胚を実験から除外したことも一因である。除外した8細胞期以下の胚も胚盤胞に発育するからである。

本実験結果から、牛体外受精卵を卵丘細胞と共培養した場合における胚の発育促進効果は液性因子である可能性が示唆された。今後は卵丘細胞を培養して得られた条件付け培地を用いて実験を行う必要がある。またさらに研究を重ねて、細胞増殖因子を明らかにしてゆかねばならない。

謝 辞

卵巣採取に御協力いただいた筑西食肉公社及び茨城県県西食肉衛生検査所の方々に対して御礼申し上げます。

文 献

- Aoyagi Y, Fukui Y, Iwazumi Y, Urakawa M, Minegishi Y, Ono H (1989) Effect of culture system on development of *in vitro* fertilized bovine ova into blastocysts. *Theriogenology* 31: 168 (Abstr).
- Berg U, Brem G (1990) Developmental rates of *in vitro* produced IVM-IVF bovine oocytes in different cell co-culture systems. *Theriogenology* 33: 195 (Abstr).
- Bondioli KR, Wright RW Jr (1980) Influence of culture media on *in vitro* fertilization of ovine tubal oocytes. *J Anim Sci* 51: 660-667.
- Brckett BG, Oliphant G (1975) Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol Reprod* 12: 260-274.
- Camous S, Heyman Y, Meziou W, Menezo Y (1984) Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. *J Reprod Fert* 72: 479-485.
- Davis DL (1985) Culture and storage of pig embryo. *J Reprod Fert*, Suppl 33: 115-124.
- Donahue RP, Stern S (1968) Follicular cell support of oocyte maturation. :Production of pyruvate *in vitro*. *J Reprod Fert* 17: 395-398.
- Eystone WH, First NL (1986) A study of the 8- to 16-cell developmental block in bovine embryos cultured *in vitro*. *Theriogenology* 25: 152 (Abstr).
- Eystone WH, Vignieri J, First NL (1987) Co-culture of early bovine embryos with oviductal epithelium. *Theriogenology* 27: 228 (Abstr).
- Eystone WH, First NL (1989) Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J Reprod Fert* 85: 715-720.
- Fukuda Y, Ichikawa M, Kubo K, Koike Y, Takami K, Ontani T, Toyoda Y (1987) Development to the blastocysts of bovine oocytes that matured and fertilized *in vitro*. Proc 79th Ann Meet Jpn Soc Zootech Sci pp 18 (Abstr) (in Japanese).
- Fujitani Y, Shioya Y, Kuwayama M, Hanada A (1987) Study of *in vitro* development of bovine oocytes that matured and fertilized *in vitro*. Proc 72nd Ann Meet Jpn Soc Anim Reprod pp 17 (Abstr) (in Japanese).
- Goto K, Kajihara Y, Kosaka S, Koba M, Nakanishi Y, Ogawa K (1988) Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes. *J Reprod Fert* 83: 753-758.
- Goto K, Takuma Y, Ooe N, Ogawa K (1990) *In vitro* development of bovine oocytes collected from ovaries of individual cows after *in vitro* fertilization. *Jpn J Anim Reprod* 36: 110-113.
- Hamberger L, Hillensjö T, Åhrén K (1978) Steroidogenesis in isolated cells of preovulatory rat follicles. *Endocrinology* 103: 771-777.
- Henderson KM, McNatty KP, Smith P, Gibb M, O'Keefe LE, Lun S, Heath DA, Prisk MD (1987) Influence of follicular health on the steroidogenic and morphological characteristics of bovine granulosa cells *in vitro*. *J Reprod Fert* 79: 185-193.
- Heyman Y, Menezo Y, Chesne P, Camous S, Garnier V (1987) *In vitro* cleavage of bovine and ovine early embryos: improved development using co-culture with trophoblastic vesicles. *Theriogenology* 27: 59-68.
- Jiang HS, Wang WL, Lu KH, McCarthy D, Gordon I (1989) *In vitro* culture of early bovine embryos derived from *in vitro* fertilization, comparison with *in vivo* culture. Proc Ann Conf Soc Study Fert pp 50 (Abstr).
- Kajihara Y, Goto K, Kosaka S, Nakanishi Y, Ogawa K (1987) *In vitro* fertilization of bovine follicular oocytes and their development up to hatched blastocysts *in vitro*. *Jpn J Anim Reprod* 33: 173-180 (in Japanese).
- Landefeld TD, Campbell KL, Midgley AR, Jr (1979) Rapid changes in the synthesis of specific ovarian granulosa cell proteins induced by human choriogonadotropin.

- Proc Natl Acad Sci USA 76: 5153-5157.
- Nakao H, Suemori H, Nakatsuji N (1988) Effect of trophoblastic vesicles on the development of bovine embryos that fertilized *in vitro*. Proc 74th Ann Meet Jpn Soc Anim Reprod pp 34 (Abstr) (in Japanese).
- Schini SA, Bavister BD (1988) Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. *Biol Reprod* 39: 1183-1192.
- Takuma Y, Goto K, Koba M, Tokumaru M, Nakanishi Y, Ogawa K (1989) Optimum number of oocytes derived from *in vitro* fertilization in the medium of development. Proc 76th Ann Meet Jpn Soc Anim Reprod pp 62 (Abstr) (in Japanese).
- Thibault C (1966) La culture *in vitro* de l'oeuf de vache. *Annls Biol Anim Biochem Biophys* 6: 159-164.
- Tokunaga T, Tsunoda Y (1989) An overcoming of "*in vitro* 2-cell block" by co-culture with embryonal fibroblast cells in the mouse. *Jpn J Anim Reprod* 35: 119-124 (in Japanese).
- Wang WL, Jiang HS, Lu KH, McCarthy D, Gordon I (1989) The effect of media and sera on the *in vitro* development of early bovine embryos. Proc Ann Conf Soc Study Fert pp 50 (Abstr).
- Whittingham DG, Biggers JD (1967) Fallopian tube and early cleavage in the mouse. *Nature* 213: 942-943.
- Yamada H, Sato T, Kitamura S, Shioya Y, Hanada A (1988) Developmental rates to blastocysts from oocytes derived from *in vitro* fertilization using epididymal or ejaculated spermatozoa in cattle. Proc 74th Ann Meet Jpn Soc Anim Reprod pp 67 (Abstr) (in Japanese).

要 約

牛の体外受精卵を用い、胚と卵丘細胞層の接触の有無が胚盤胞への発育に及ぼす影響を調べた。未成熟卵を体外で20～24時間成熟させ、ヘパリンで受精能を獲得させた精子で媒精した。媒精72時間後に、卵丘細胞から卵子を外し、8-16細胞期胚のみを取り出した。そして以下に示す3区に分けて、媒精後8日間培養した。即ち、接触区：胚を卵丘細胞層の上において培養する。非接触区：胚を底面がフィルターの内筒形セルに入れ、このセルを卵丘細胞層の上において培養する。非共培養区：培養液のみで胚を培養する。2種類の精子を用いて実験を行った結果、接触区、非接触区および非共培養区における胚盤胞までの発育率（胚盤胞数/供試8-16期胚数）はそれぞれ32.9(23/70)～36.9%(24/65), 25.7(18/70)～44.1%(30/68) および7.4(5/68)～9.2%(6/65)であり、接触区と非接触区との間には差がなく、非共培養区で有意に低かった。これらの結果から、卵丘細胞層は胚に直接接触していても発育促進効果があり、その作用発現には、液性因子が関与していることが示唆された。