

## 無血清培地を用いたスナネズミ胚の体外発生

木村直子・佐々木みち子・戸津川清

山形大学農学部生物資源学科生物機能調節学講座

(平成16年10月1日受理)

### Development of Mongolian Gerbil Embryos in Chemically Defined Medium

Naoko KIMURA · Michiko SASAKI and Kiyoshi TOTSUKAWA

Laboratory of Animal Reproduction,

Section of Bioresource,

Department of Agricultural Science

(Received October 1, 2004)

#### Summary

The mongolian gerbil is an experimental model animal for epilepsy. On the purpose of improvement of culture medium for mongolian gerbil embryos, a present study was conducted to examine the development of mongolian gerbil embryos in three kinds of chemically defined mediums, KSOM, mRIECM and HECM-3. Pronuclear oocytes after *in vivo* or *in vitro* fertilization, were cultured for 96 hours in 5% CO<sub>2</sub> in air at 37.5 °C. In all mediums, both *in vivo* and *in vitro*, the fertilized embryos were blocked development to the 8 cell stage. However, the rate of development to the 3~4 cell stage in KSOM was higher than that of the mRIECM and HECM-3 (KSOM : 18.5%, mRIECM : 0%, HECM-3 : 7.9%). These results suggest that KSOM is the more appropriate medium in the three kinds of mediums. Furthermore, we should improve further the medium base on KSOM, for culture of mongolian gerbil embryos.

Key words: mongolian gerbil, embryo, *in vitro* development

#### 目 的

キクゲネズミ科に属する齧歯類であるスナネズミ (mongolian gerbil *Unguiculatus*) は、主に中国東北部からモンゴル東部に生息する野生のネズミである。てんかん様発作 (痙攣)<sup>1)</sup> を起こしたり、コレステロールの長期間投与によってもコレステロール血症がみられない特異的代謝を呈する。また寄生体に対する感受性も高く、フィラリア感染など様々な疾患モデル動物として注目されている。日本では1960年代に実験動物化され、今後様々な分野で活用の拡大が期待されている。

齧歯類の中でもマウス、ラット、ハムスターは、過排

卵処理法、体外受精法、体外培養法、移植法がほぼ確立されており、種々の応用研究が行われている。一方、齧歯類の中でも産仔数が4~5匹と少ないスナネズミの生殖機構は未解明な部分が多く、報告<sup>2), 3), 4), 5)</sup> も少ない。体外培養中に多くの哺乳動物でみられる胚の発生阻害は、スナネズミの場合でも観察されている。この発生阻害が起こる胚のステージは種によって異なり、マウス<sup>6), 7)</sup> およびハムスター<sup>8), 9)</sup> では2細胞期、ラット<sup>10)</sup> およびブタ<sup>11)</sup> では4細胞期、ヒツジおよびウシでは8細胞期に発生阻害が生じると報告されている。スナネズミの場合、2細胞期以降の発生が阻害されることが明らかになっている<sup>12), 13)</sup>。この発生阻害の原因は未だ解明されていない

キーワード : スナネズミ, 胚, 体外発生

が、代謝的な要素、特に発生初期における呼吸や解糖系の作用が深く関わっていると考えられている<sup>20)</sup>。マウス、ラット、ハムスター等の実験動物においても、初期胚の発生阻害はみられるものの、今日ではそれを克服し、胚盤胞までの発生が可能な培地が確立されている。一方、スナネズミでは、適した体外培養用基礎培地が確立されていないのが現状である。

そこで本実験では、スナネズミ胚の発生阻害の克服に焦点を当て、マウスで用いられているKSOM、ラットで用いられているmR1 ECM、ハムスターで用いられているHECM-3の3種類の培養培地（Table 1）を用いて、①自然交配－体外培養、②体外受精－体外培養を行い、発生について比較検討を行った。

## 材料と方法

### 1. 供試動物

スナネズミは7～8週齢の成熟未経産雌、また4～6ヶ月齢の成熟雄を使用した。

### 2. 過排卵処理

雌スナネズミへの過排卵処理は発情周期を考慮せず、PMSG 20 IU/匹を腹腔内注射し48時間後、hCG 20 IU/匹を腹腔内注射した。

#### 3-①自然交配－体外培養

##### 1) 卵の回収と培養

雌は過排卵処理後雄と一晚同居させ、hCG投与後15時間で卵管摘出および卵の回収を行った。その後得られ

Table 1 Medium for *in vitro* fertilization and *in vitro* development.

Components	TYH (mg/100 ml)	KSOM (mg/100ml)	mR1ECM (mg/100ml)	HECM-3 (mg/100ml)
NaCl	697.6	555.2	448.2	665.0
KCl	35.6	18.6	23.8	22.4
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	25.1	25.2	29.4	27.9
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	16.2	4.8	—	—
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	29.3	4.9	—	—
MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	—	—	9.4	9.4
Na-pyruvate	11.0	2.2	5.5	—
Na-lactate	—	0.14 ml	0.14 ml	0.05 ml
NaHCO <sub>3</sub>	210	210	210	210
Glucose	135	3.6	135	—
BSA	4 mg/ml	1.0 mg/ml	—	—
PVA	—	—	1.0 mg/ml	0.1 mg/ml
Glutamine	—	14.6	1.46	2.9
EDTA	—	0.4	—	—
EAA	—	—	2 %	—
NEAA	—	—	1 %	—
Phenolred	0.2	—	—	—
Penicillin	100 IU/ml	100 IU/ml	100 IU/ml	—
Streptomycin	50 μg/ml	50 μg/ml	50 μg/ml	—

た卵は、KSOM, mR1ECM, HECM-3 の培養培地に振り分け、それぞれの培地で3回洗浄した後、培養を行った。培養は300 $\mu$ lドロップの培地に卵10~20個を入れて、37.5°C, 95%空気・5%CO<sub>2</sub>気相下のインキュベーター内で行った。

## 2) 観 察

培養後24時間毎に96時間まで、位相差顕微鏡で観察を行った。

## 3-②体外受精-体外培養

### 1) 体外受精用精子の準備

精子前培養培地および受精培地には、マウスの体外受精用培地であるTYHを使用した。培地は前日に分注し、37.5°C, 95%空気・5%CO<sub>2</sub>気相下のインキュベーター内で平衡化した。

屠殺した雄を開腹、精巣上体尾部を摘出し、1ml TYH液中で切り刻み、静置して精子を泳出させ、精子懸濁液とした。この液の上澄みをマイクロシリンジで10~30 $\mu$ l取り、前培養培地に導入した。前培養時間はスナネズミの場合、2~4時間が最も受精率が高いという当研究室の基礎データを元に、2~4時間とした。

### 2) 卵の回収と媒精

hCG投与後15時間で卵管摘出および卵の回収を行った。その後、TYH培地で3回洗浄した。前培養した精子(最終濃度: 1~1.5 $\times 10^6$ /ml)を含んだTYH培地に洗浄した卵を入れて媒精を行った。媒精時間は6時間とし、37.5°C, 95%空気・5%CO<sub>2</sub>気相下のインキュベーター内に置いた。

### 3) 培 養

媒精6時間後、受精培地から卵を回収し、KSOM,

mR1ECM, HECM-3 の培養培地用に振り分け、それぞれの培地で3回洗浄した後、培養を行った。培養はそれぞれの300 $\mu$ lドロップの培地に卵10~20個を入れて、37.5°C, 95%空気・5%CO<sub>2</sub>気相下のインキュベーター内で行った。

## 4) 観 察

培養後24時間毎に96時間まで、位相差顕微鏡で観察を行った。

## 結 果

自然交配後、体外培養を行った場合、KSOMのみで3細胞期までの発生がみられたが、4細胞期以降への発生はみられなかった(Table 2)。mR1ECM, HECM-3では2細胞期で発生が停止した。体外受精-体外培養を行なった場合、KSOMで4細胞期までの発生がみられた(Table 3, Fig. 1)。KSOMでは48~72時間までの発生速度も速く、他の2種類の培地と比較して、発生率は高かった。しかし培養72時間後から退行がみられた。

## 考 察

本実験では、スナネズミ胚の体外発生における基礎培地の検討を目的に、KSOM, mR1ECM, HECM-3の3種類の培養培地(Table 1)を用いて、①自然交配-体外培養、②体外受精-体外培養を行った。

自然交配-体外培養系では、自然交配にも関わらず、2細胞期への発生率は非常に低かった(Table 2)。この原因としては、1) 過排卵処理がうまく作用しなかつ

Table 2 Development of *in vivo* fertilized embryos in each medium.

Medium	No. of oocytes	2 cell $\leq$ (%)	3 cell $\leq$ (%)	4 cell $\leq$ (%)
KSOM	21	2 (9.52)	1 (4.76)	0
mR1ECM	16	2 (12.5)	0	0
HECM-3	23	1 (4.35)	0	0

Table 3 Development of *in vitro* fertilized embryos in each medium.

	Medium	No. of oocytes	2 cell $\leq$ (%)	3 cell $\leq$ (%)	4 cell $\leq$ (%)	8 cell $\leq$ (%)
TYH	KSOM	63	16 (20.6)	9 (14.2)	3 (4.8)	0
	mR1ECM	57	2 (3.5)	0	0	0
	HECM-3	57	17 (29.8)	6 (10.5)	0	0

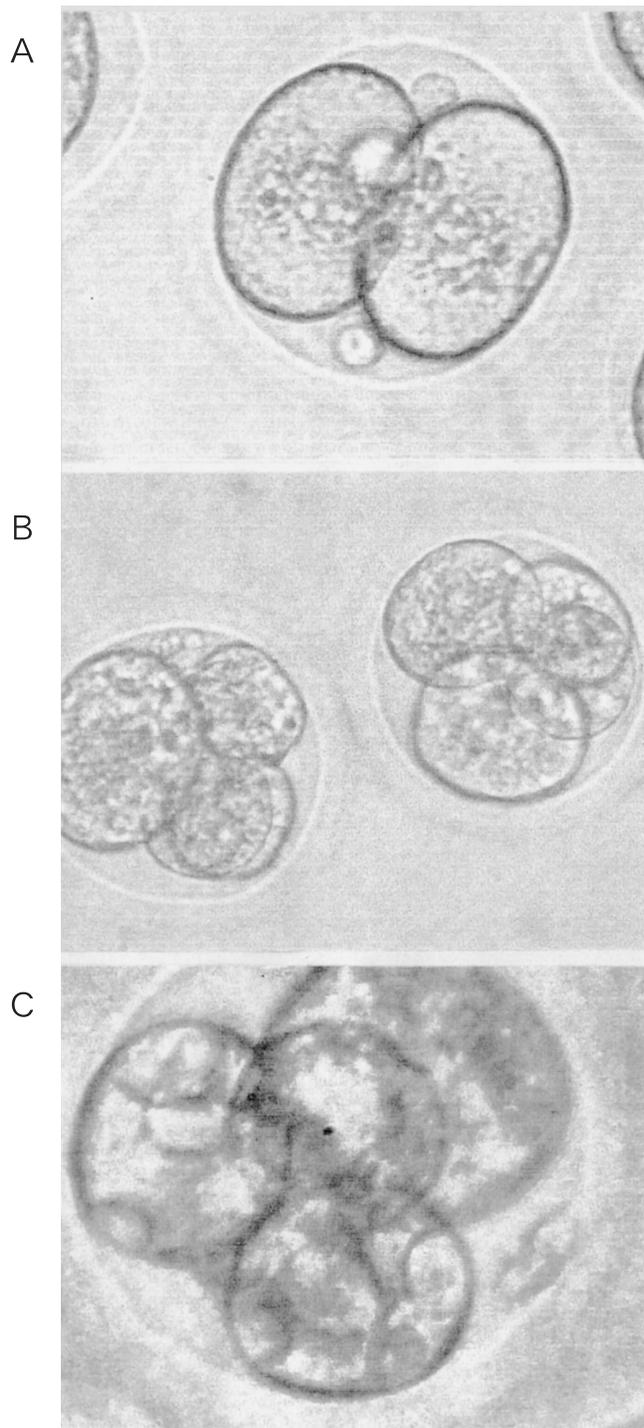


Fig. 1 Typical Mongolian gerbil embryos cultured in KSOM. A : 2-cell embryos cultured for 24 hours ; B : 4-cell embryos cultured in for 48~72 hours. C : degenerated 4-cell embryos cultured for 96 hours

た、2) ホルモンが作用しても雄と交尾しなかった、が考えられた。観察の過程において、ラット用培地のmR1 ECMで培養した卵は、培養24時間目で退行し始めるものが多く見られた。このことからmR1 ECMはスナネズミ胚培養に適していないことが予想された。

体外受精—体外培養系では、KSOMにおいて培養48~72時間で4細胞期まで発生した (Table 3)。KSOMおよびHECM-3では、培養24~72時間内で退行はみられなかったが、培養96時間後では著しい退行がみられた。

今回使用した培地であるKSOMは主にランダムプレットのマウスに用いられる比較的新しい発生阻害解除培地である。HECM-3はハムスター発生基礎培地であるHECMシリーズ<sup>19)</sup>の一つであり、アミノ酸、水溶性ビタミン (パントテン酸等) を加え改良がなされている培地である<sup>20)</sup>。今回使用したHECM-3はアミノ酸 (グルタミン以外) や水溶性ビタミン、ピルビン酸Naなどといった物質が含まれておらず、他の2種類の培地に比較してもシンプルな組成の培地である。HECM-3で培養した場合、胚のコンディションは良好であったが、発生率はKSOMの方が優れていたことから、HECM-3に含まれておらず、KSOMには含まれている何らかの物質が発生促進に繋がっていると考えられる。一方でmR1ECMは三好らがハムスター培地であるHECM-1に修正を加え、完成させた体外受精・培養培地である<sup>10)</sup>。mR1ECMはEAA (必須アミノ酸)、NEAA (非必須アミノ酸) が含まれている。アミノ酸はラット胚やウシ胚において発生を促進すると報告されているが<sup>17), 21)</sup>、一方でハムスター胚では特定の条件によって発生を抑制する<sup>27)</sup>ことが報告されている。従ってmR1 ECMのような種々のアミノ酸を含む培地では、スナネズミ胚は発生を抑制されている可能性が考えられる。

Tsujiiら<sup>19)</sup>は修正TCM199 (mTCM199) を用い、スナネズミまたはマウスの卵管細胞との共培養の結果、自然交配から得た1, 2細胞期胚を胚盤胞まで発生させることに成功している。共培養を行わずmTCM199のみで培養を行った場合でも、16細胞期まで発生している。このmTCM199は、ピルビン酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、血清 (FCS) を添加したもので、本実験で使用した培地と比較すると複雑な組成の培地である。またKSOM同様、リン酸塩も含んでいる。これまでの研究結果<sup>12)</sup>から受精培地及び発生培地にFCSを添加することで体外受精からの胚発生率が向上し、8細胞期まで発生しているこ

とを考慮すると、mTCM199における発生には、FCSが大きく関わっているとも考えられる。一方、発生培地に含まれるリン酸塩によって発生阻害が生じることは、ハムスターおよびラット等で報告されている<sup>14), 15)</sup>。松本ら<sup>22)</sup>は、リン酸塩によるラットの発生阻害胚ではクエン酸回路系の働きが阻害されていることを報告している。また、リン酸塩とグルコースの組み合わせで、齧歯類、家畜、ヒトといった様々な種で発生阻害の報告がされている<sup>10)</sup>。特にハムスター胚では、発生停止、呼吸量の減少、ミトコンドリア組織の崩壊といった障害が報告されている<sup>15), 20)</sup>。更に最近では、ハムスター胚は、グルコースのみでは発生阻害されず、リン酸塩との組み合わせにより発生阻害が生じると報告されている<sup>14), 28)</sup>。今回使用した培地の中で最も発生率が良好だったKSOMおよびmTCM199培地のいずれにもリン酸塩は含まれていた。

当研究室の過去の研究データでは、発生培地にリン酸塩を添加した場合、2細胞期から4細胞期発生が妨げられていた<sup>12)</sup>。しかしこの時使用した発生培地であるm-TyrはKSOMとは組成が違うため、KSOM内のリン酸塩がスナネズミ胚発生を阻害しているのか不明である。従って、今後の課題としては、まずKSOM内のリン酸塩の有無による発生実験、KSOMへのFCSの有無による発生実験等を行い、スナネズミ胚発生の阻害物質や促進物質を特定することが必要と考えられた。

## 引用文献

- 1) Cutler, M. G., Mackintosh, J. H. (1989) Epilepsy and behavior of Mongolian gerbil: an ethological study. *Physiology & Behavior*. 46 ; 561-566.
- 2) 石島芳郎・野中衆一・森干佐子・比嘉英俊 (1979) スナネズミの過排卵誘起. *家畜繁殖誌*25巻3号.
- 3) 佐藤栄治・新村末男・石田一男・山口本治 (1979) 過排卵スナネズミの排卵時間、卵子の形態および発生速度に関する研究. *新潟大農研報*15 ; 133-137.
- 4) 戸津川清 (1980) スナネズミの繁殖. *実験動物技術*15 ; 133-137.
- 5) 石原茂樹 (1997) スナネズミの発情周期を考慮した性腺刺激ホルモン投与による多胎妊娠に関する研究. 学士論文.
- 6) Pratt, H.P., Muggleton-Harris, A.L. (1988) Cycling cytoplasmic factors that promote mitosis in

- the cultured 2-cell mouse embryo. *Development* 104 : 115-120.
- 7) Bavister, B. D. (2000) Interactions between embryos and the culture medium. *Theriogenology* 53 : 619-626.
- 8) Bavister, B. D., Leibfried, M. L., Lieberman, G. (1983) Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. *Biol. Reprod.* 28 : 235-247.
- 9) Wittingham, D.G., Bavister, B. D. (1974) Development of hamster eggs fertilization in vitro and vivo. *J. Reprod. Fertil.* 38 : 489-492.
- 10) Kishi, J., Noda, Y., Narimoto, K., Umaoka, Y., Mori, T. (1991) Block to development in cultured rat 1-cell embryos in overcome using medium HECM-1. *Hum. Reprod.* 6 : 1445-1448.
- 11) Davis DL, Day BN. (1978) Cleavage and blastocyst formation by pig eggs in vitro. *J. Anim. Sci.* 46 : 1043-1053.
- 12) 荘 高弘. (1997) スナネズミの体外受精および体外受精に関する研究. 学士論文.
- 13) 吉村哲太郎. (1998) スナネズミの体外受精および体外受精に関する研究. 学士論文.
- 14) Seshagiri, P.B., Bavister, B. D. (1989) Glucose inhibits development of hamster 8-cell embryos in vitro. *Biol. Reprod.* 40 : 599-606.
- 15) Seshagiri, P. B., Bavister, B. D. (1991) Glucose and phosphate inhibit respiration and oxidative metabolism in cultured hamster eight-cell embryos : evidence for the "crabtree effect". *Mol. Reprod. Dev.* 30 : 105-111.
- 16) Miyoshi, K., Funahashi, H., Okuda, K., Niwa, K. (1994) Development of rat one cell embryos in a chemically defined medium. *J. Reprod. Fertil.* 100 : 21-26.
- 17) Miyoshi, K., Abeydeera, L. R., Okuda, K., Niwa, K. (1995) Effects of Osmolarity and amino acids in a chemically defined medium on development of rat one-cell embryos. *J. Reprod. Fertil.* 103 : 27-32.
- 18) McKiernan, S.H., Bavister, B. D., Tasca, R. J. (1991) Energy substrate requirements for in-vitro development of hamster 1-and 2-cell embryos to the blastocyst stage. *Hum. Reprod.* 6 : 64-75.
- 19) Tsujii, H., Saruwatari, T., Hamano, K. (2002) Development of Mongolian gerbil 1-cell embryos to blastocysts in co-culture with oviductal cells in TCM199 supplemented with pyruvate, lactate and fetal calf serum. *J. Reprod. Dev.* 48 : 287-292.
- 20) Barnett, D. K., Bavister, B.D. (1996) What is relationship between the metabolism of preimplantation embryos and their developmental competence? *Mol. Reprod. Dev.* 43 : 105-133.
- 21) Thompson, J. G., Simpson, A.C., Pugh, P. A., Tervit, H. R. (1992) Requirement for glucose during in vitro culture of sheep preimplantation embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 31 : 255-257.
- 22) 松本弘道、菅原七郎 (1996) ラット発生阻害胚における辞素活性の組織学的枚討. 第37回哺乳類動物卵子学界講演要旨. P33.
- 23) McKiernan, S. H., Bavister, B. D. (2000) Culture of one-cell hamster embryos with water soluble vitamins : pantothenate stimulates blastocyst production. *Hum. Reprod.* 15 : 157-164.
- 24) Ludwig, T. E., Squirrell, J. M., Palmenberg, A. C., Bavister, B. D. (2001) Relationship between development, metabolism and mitochondrial organization in 2-cell hamster embryos in the presence of low levels of phosphate. *Biol. Reprod.* 65 : 1648-1654.
- 25) Edward, R.G., Ruth E. F. (1960) Super ovulation treatment of adult mice : their subsequent natural fertility and response to further treatment. *J. Endocrin.* 21 : 147-154.