

ウシ体外受精卵の共培養系における カーボンナノチューブ複合素材の有用性

横尾正樹¹，伊藤一志²，小林正之³

¹ 秋田県立大学生物資源科学部アグリビジネス学科

² 秋田県立大学システム科学技術学部機械知能システム学科

³ 秋田県立大学生物資源科学部応用生物科学科

近年，受精卵の体外培養技術は，畜産分野や生殖補助医療分野において極めて重要な技術となっており，体外培養技術で得られた受精卵の品質を向上させる新しい技術開発が強く望まれている．これまでに我々は，従来法よりも細胞接着性，細胞増殖性が優れる新規細胞培養基質材（カーボンナノチューブ（CNT）複合素材）を開発している．本研究ではCNT複合素材を用いた受精卵培養デバイスを作製し，ウシ体外受精卵の共培養系におけるその有用性を検証した．本研究の結果から，ウシ体外受精卵との共培養に使用するウシ卵丘細胞の培養には，多層CNTを用いたCNT複合素材が適していることを確認することができた．さらに，多層CNTを用いたCNT複合素材上で，ウシ体外受精卵を卵丘細胞と共培養したところ，従来の共培養法よりもウシ体外受精卵の発育成績が良好であることが確認できた．以上の結果から，CNT複合素材はウシ体外受精卵と卵丘細胞との共培養系デバイスにも有用であることが明らかとなった．

キーワード：受精卵，初期発生，共培養系，カーボンナノチューブ，ウシ

近年，受精卵の体外培養技術の進歩は，畜産分野においては優良家畜の増産や家畜改良，生殖補助医療分野においてはヒト不妊治療に大きく貢献している．しかしながら，現行の体外培養技術で得られる受精卵は，体内で受精・発生した受精卵と比較して，品質（細胞数，生存性）が低く，これらを母体へ移植しても十分な受胎成績が得られないことが大きな課題となっている．したがって，体外で作出された受精卵の品質を向上させる培養技術の開発が強く望まれている．

これまでに体外受精卵の品質を改善する研究は，現在，世界中で行われている．しかし，その多くが培養液や培養条件を検討するものであり，培養に使用するデバイスそのものを新規に開発する研究は少

ない．そこで我々は，細胞培養用の基質材を開発することから研究を開始し，非生物由来材料であるカーボンナノチューブ（CNT）とシリコン樹脂（poly-dimethylsiloxane, PDMS）から成る新規複合素材（CNT複合素材）を開発した（伊藤と横尾，2012）．これまでに，このCNT複合素材を用いた細胞培養シートを使用してマウス受精卵の培養試験を実施した結果，従来法と比較して，受精卵の発育が促進されることが明らかとなった．さらに，得られた受精卵を子宮内へ受精卵移植したところ，従来法で培養した受精卵を移植するよりも良好な受胎成績が得られることを明らかにしている（平成 22 年度～平成 24 年度秋田県立大学学長プロジェクトにて実施）．つまり，これらの研究成果から，CNT

複合素材を哺乳動物の受精卵の培養に応用することで、品質の高い受精卵を効率的に作出できることが期待される。そこで本研究では、畜産分野へ応用することをめざして、CNT複合素材を用いたウシ体外受精卵培養デバイスを作製し、その有用性を検証することを目的とした。

材料・方法

受精卵培養デバイス

受精卵培養デバイスはPDMS (SILPOT 184 W/C, 東レダウコーニング) とCNT (名城カーボン) を使用して作製した (図1)。6ウェル培養ディッシュ (リプロプレート, 機能性ペプチド研究所) の各ウェルにPDMSを塗布し、50°C, 6時間の条件で硬化させた。その後、エタノール中に分散したCNT (単層CNT; 25 ng/mm², 50 ng/mm², 多層CNT; 25 ng/mm²) をPDMS表面に塗布することでCNT複合素材培養シートを作製し、風乾後、培養に供した。対照区として、無処理区 (CNT塗布なし) およびI型コラーゲン処理区を設けた。

ウシ卵丘細胞の採取と培養

秋田県食肉流通センターで採取した牛卵巣を15°Cで研究室まで運搬し、卵巣表面の胞状卵胞 (2-5 mm) から卵丘細胞-卵子複合体 (COCs) を吸引採取した。採取したCOCsは卵子成熟・共培養用培養液 (IVMD101, 機能性ペプチド研究所) 中で22時間培養し、媒精液 (IVF100, 機能性ペプチド研究所) を用いて体外受精に供した。6時間後、受精卵から剥離・除去したウシ卵丘細胞を回収し、受精卵培養デバイスのCNT複合素材培養シート上に播種し、IVMD101中で9日間培養した。なお、全ての培養は38.5°C, 5%CO₂, 95%空気の条件下で行った。

ウシ体外受精卵の作出と培養

秋田県食肉流通センターで採取した牛卵巣を15°Cに保温した状態で研究室へ運搬し、卵巣表面の胞状卵胞 (2-5 mm) からCOCsを吸引採取した。採取したCOCsはIVMD101中で22時間成熟培養した。培養後、IVF100で5.0×10⁶/mlに調製した牛精液と培

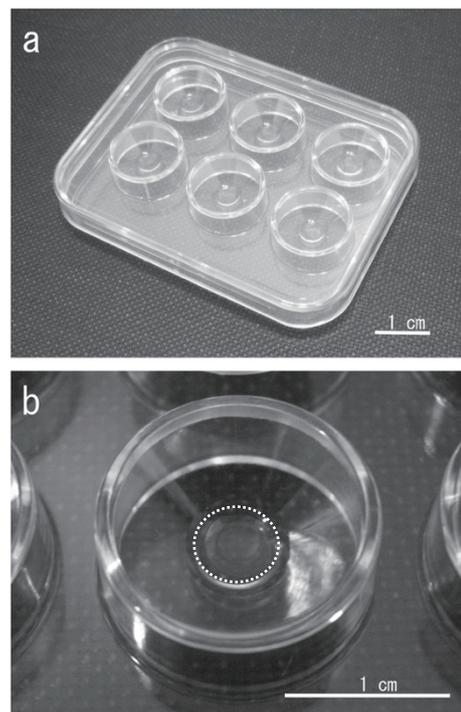


図1 本研究で使用した受精卵培養デバイス
a: 全体像, b: 培養ウェル拡大 (破線内にCNT複合素材が塗布されている)

養し、体外受精した。6時間後、余分な精子や卵丘細胞を除去した受精卵を受精卵培養デバイス上でウシ卵丘細胞と共に、IVMD101中で合計9日間の無血清培養を実施した。なお、全ての培養は38.5°C, 5%CO₂, 95%空気の条件下で行った。培養9日目に、胚盤胞への発生率 (胚盤胞数/培養受精卵数×100) および脱出胚盤胞発生率 (脱出胚盤胞数/培養受精卵数×100) を評価した。

統計処理

ウシ体外受精卵の発生率はカイ二乗検定を用いて解析した。全ての解析は、GraphPad Prism 6 (GraphPad Software) を用いて行い、危険率5%未満を有意と判定した。

結果・考察

ウシ卵丘細胞の培養に適したCNT複合素材の検討

ウシ体外受精用の共培養系を開発するにあたり、本研究では、受精卵と共培養するフィーダー細胞として「ウシ卵丘細胞」を選択した。受精卵と共培養するフィーダー細胞としては、他にも候補となる細胞として卵管上皮細胞 (Cordova et al., 2014), Vero 細胞 (Gómez et al., 2008) など報告があるが、卵丘細胞であれば、体外受精時に卵子から剥離・除去する卵丘細胞の一部を再利用することが可能であり、別途フィーダー細胞を準備する必要がないことから、卵丘細胞の方が将来的な実用性が高いと判断したためである。

図2に培養試験の結果の一部を示した。無処理区ではウシ卵丘細胞の培養ディッシュへの接着はほとんど観察されず、細胞塊（スフェロイド）を形成した。また、単層CNTにおいては25 ng/mm²と50 ng/mm²のいずれの条件においても伸展するウシ卵丘細胞数は少なく、無処理区と同様に、スフェロイドを形成する傾向が観察された。一方、多層CNT (25 ng/mm²) ではウシ卵丘細胞との接着性は良好で、適度な細胞増殖が観察された。一部、細胞塊を形成する箇所も観察されたが、コラーゲン処理（従来法）と比較しても遜色ない結果が得られた。したがって、ウシ卵丘細胞をウシ受精卵との共培養用フィーダー細胞として使用する場合、多層CNTを利用することが適していることが明らかとなった。

今回用いた単層CNTの濃度条件は、マウス卵丘細胞の培養試験で良好な成績を示した条件であった。したがって、同じ細胞種であっても動物種が異なるとCNTとの接着性や細胞増殖性に差が生じることが示唆された。現時点では、CNT複合素材における細胞の接着様式や接着タンパク質の詳細は明らかになっていないが、今後、フィーダー細胞を利用して共培養を実施する際には、フィーダー細胞に使用する細胞種や動物種に最適なCNT複合素材の選定、条件設定が必要であると考えられる。

ウシ体外受精用の共培養試験

ウシ卵丘細胞を用いた培養試験の結果から、多層CNT (25 ng/mm²) を塗布した培養デバイスを使用して、ウシ体外受精用の共培養試験を実施した。CNT複合素材上でウシ卵丘細胞と共培養したウシ体

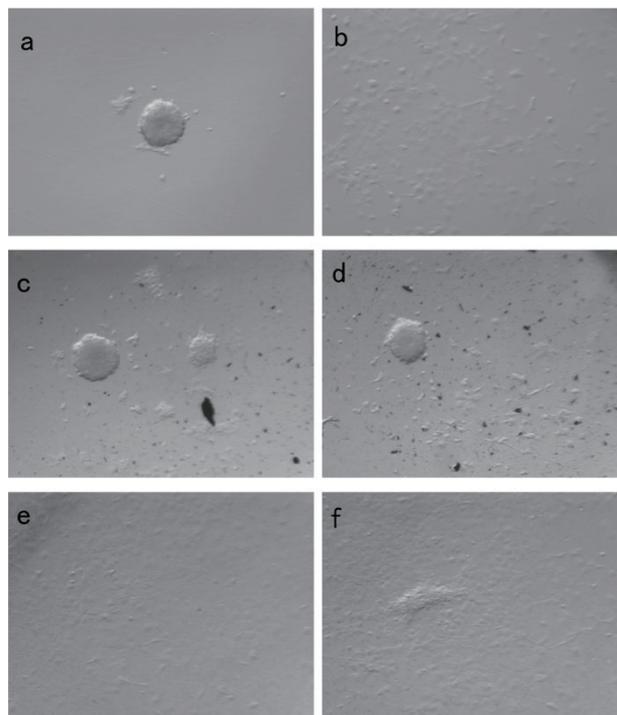


図2 ウシ卵丘細胞の増殖（無血清培養9日目）
a：無処理，b：コラーゲン処理，c：単層CNT (25 ng/mm²)，d：単層CNT (50 ng/mm²)，
e-f：多層CNT (25 ng/mm²)

外受精用の胚盤胞への発生率は24.4%であり、対照区（コラーゲン処理，6.5%）と比較して有意に高い発生率が得られた (P < 0.05)。また、より成長が進んだふ化胚盤胞以上に成長している受精卵の割合も11.5%と、対照区（1.3%）と比較して有意に高いことが確認できた (P < 0.05) (表1, 図3)。以上の結果から、CNT複合素材を利用した培養デバイスをウシ体外受精用の共培養に使用することで、品質のよい受精卵が効率良く作出できることが示唆された。

表1 卵丘細胞との共培養によるウシ体外受精用の発生成績

試験区	培養卵数	発生率(培養9日目)	
		胚盤胞数(%)	ふ化胚盤胞数(%)
対照区 (コラーゲン)	77	5 (6.5)	1 (1.3)
試験区 (多層CNT)	78	19* (24.4)	9* (11.5)

*: 対照区に対して有意差あり(P<0.05)

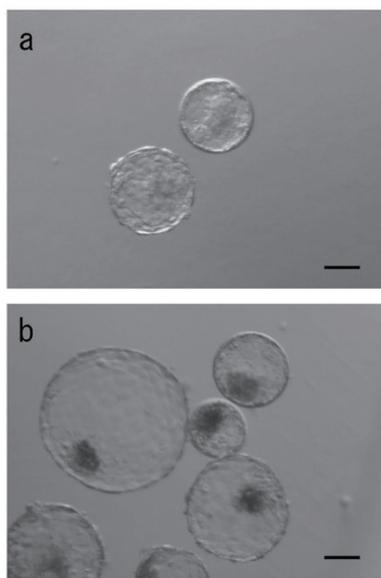


図3 ウシ体外受精卵（培養9日目）
a: 対照区（コラーゲン）, b: 試験区（多層CNT） スケールバー=100 μ m

本研究では、全ての培養に無血清培地を使用して実験を行ったが、本培養デバイスが無血清培養系においても有用であったことは興味深い。一般的な受精卵の培養では、5%程度の血清を添加して行う。しかし、血清を使用した培養法では、受精卵の品質が低い、得られた受精卵を移植しても、妊娠中の流産や死産が多い、過大児のリスクが高いといった問題が指摘されており、近年、そのようなリスクを回避できる無血清培養系による受精卵培養が注目されている（Abe and Hoshi, 2003 ; Fernández-Gonzalez et al., 2004）。本研究の結果は、我々が開発した培養デバイスがウシ受精卵の無血清培養系においても効果的であることを示しており、将来的に、畜産分野における家畜生産、家畜改良の発展に貢献できることが期待される。今後は、本培養デバイスが受精卵の作出効率を改善する作用機構についてさらに解析を進めていく予定である。

謝辞

本研究は、秋田県立大学平成26年度産学連携・共同研究推進事業によって行われた。また、牛卵巣の採材にご協力賜りました秋田県食肉流通公社および

秋田市食肉衛生検査所の方々に深謝いたします。また、実験補助員の工藤恵利子氏には、牛卵巣の採材、培養デバイスの作製等において多大なるご協力をいただきました。ここに深謝いたします。

文献

- Abe, H., Hoshi, H. (2003) . Evaluation of Bovine Embryos Produced in High Performance Serum-Free Media. *Journal of Reproduction and Development*, 49(3), 193-202.
- Cordova, A., Perreau, C., Uzbekova, S., Ponsart C., Locatelli, Y., Mermillod, P. (2014) . Development rate and gene expression of IVP bovine embryos cocultured with bovine oviduct epithelial cells at early or late stage of preimplantation development. *Theriogenology*, 81(9), 1163-1173.
- Fernández-Gonzalez, R., Moreira, P., Bilbao, A., Jiménez, A., Pérez-Crespo, M., Ramírez, M.A., Rodríguez De Fonseca, F., Pintado, B., Gutiérrez-Adán, A. (2004) . Long-term effect of in vitro culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(16), 5880-5885.
- Gómez, E., Rodríguez, A., Muñoz, M., Caamaño, J.N., Hidalgo, C.O., Morán, E., Facal, N., Díez, C. (2008) . Serum free embryo culture medium improves in vitro survival of bovine blastocysts to vitrification. *Theriogenology*, 69(8), 1013-1021.
- 伊藤一志, 横尾正樹 (2012) . 「細胞培養基材, 培養容器, 及び細胞培養基材の製造方法」, 特願2012-165354 (平成24年7月26日), 出願人: 公立大学法人秋田県立大学

〔平成27年6月30日受付〕
〔平成27年7月31日受理〕

Efficiency of carbon nanotube composites in a co-culture system of early bovine embryos

Masaki Yokoo¹, Kazushi Ito², Masayuki Kobayashi³

¹ *Department of Agribusiness, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University*

² *Department of Machine Intelligence and Systems Engineering, Faculty of Systems Science and Technology,
Akita Prefectural University*

³ *Department of Biotechnology, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University*

The improvement of in vitro culture systems is important for the production of embryos with high developmental competence because the quality of in vitro-produced embryos has continually been poorer than that achieved with in vivo-derived embryos. Until now, many studies have focused on improving embryo quality by evaluating the effects of different variables on the success of in vitro embryo development. Recently, we manufactured a novel cell culture substrate using carbon nanotube composites. In this study, we investigated the efficiency of the novel cell culture substrate in a co-culture system of early bovine embryos with cumulus cells. With embryos cultured on collagen-coated plates (conventional method), the proportion of blastocysts and hatched blastocysts was 6.5% and 1.3%, respectively. In embryos cultured on carbon nanotube composites, the proportion of blastocysts and hatched blastocysts was 24.4% and 11.5%, respectively, indicating that carbon nanotube composites had significantly higher developmental competence than collagen-coated plates ($P < 0.05$). From these results, we conclude that carbon nanotube composites could be used as culture substrates in co-culture systems for early bovine embryos.

Keywords: embryos, early development, co-culture system, carbon nanotube, bovine