

19. 無血清発生培地で生産したウシ体外胚の品質および耐凍性の検討

農林水産研究指導センター 畜産研究部 肉用牛・酪農チーム
○安達聡・渡邊竜二・佐藤恭二・(病鑑) 藤田達男

【目的】

ウシの体外受精胚生産において、発生培地への血清の添加が胚の発育に有効であることが知られており^{1,2,3)}、現在一般的な培養法として用いられている。一方で、血清にはロット間での胚生産効率の差異や病原体伝搬のリスクがあり、また、血清添加培養で生産された胚は脂肪の含有量が多く、血清無添加培養で生産された胚よりも耐凍性の劣ることが報告されている^{4,5)}。

そこで、本研究では血清を添加しなくても良品質な胚を安定して生産できる培養系の開発を目的とし、これまでに食肉処理場由来卵子を用いた胚生産試験において、無血清発生培地 PVA-SOFaa に上皮成長因子 (EGF)、インスリン様成長因子-I (IGF-I)、トランスフェリン (Tf)、セレン (Se) を添加し、さらに発生培養開始後 6 日目にグルコース (Glu) を添加することで良好な胚の発生成績が得られている⁶⁾。今回、本培養系で生産された胚の品質、耐凍性および経膈採卵-体外受精 (OPU-IVF) 技術による子牛生産への活用について検討したので報告する。

【材料および方法】

試験 1 は食肉処理場由来卵巣から、試験 2 は経膈採卵により生体卵巣から回収した卵丘細胞卵子複合体を用いた。成熟培養は 0.02AU/ml FSH、1 μ g/ml Estradiol-17 β 、0.2mM ピルビン酸、5%FCS 添加 TCM-199 で 20 ~ 22 時間、媒精は牛体外受精用媒性液 IVF100 (機能性ペプチド研究所) で 6 時間 (精子濃度 5.0×10^6 /ml)、いずれも 38.5 °C、5%CO₂ in air 気相下で実施した。その後、卵丘細胞を除去し、発生培養は SOFaa を基礎培地として 1mg/ml PVA と 100ng/ml EGF、50ng/ml IGF-I、5 μ g/ml Tf、5ng/ml Se を添加した (EITS) 区、EITS 区に発生培養開始後 6 日目に 4.0mM Glu を添加した (EITS + G) 区、5%ウシ胎仔血清を添加した (FCS) 区に分け、38.5 °C、90%N₂、5%CO₂、5%O₂ 気相下で実施した。

試験 1 で生産された胚盤胞期胚は、Sudan IVにより染色して細胞内脂肪滴の直径を計測し、大きさ毎に脂肪滴数を計数した。また、10%グリセリン+ 0.25M スクロース添加保存液で緩慢凍結し、融解後 20%FCS 添加 SOFaa で 72 時間培養して胚の生存率、透明帯脱出率を調査した。

試験 2 で生産された胚盤胞期胚は、同法で凍結・融解後、ダイレクト移植し受胎率を調査した。

【結果】

試験 1 : 1 胚あたりの細胞内脂肪滴数は、直径 5 μ m 以上の大脂肪滴数において EITS 区

(16.4 ± 6.2)、EITS + G 区 (18.3 ± 2.9) が FCS 区 (31.6 ± 3.9) よりも有意に少なかった。また、Glu 添加の有無による脂肪滴数の差は認められなかった (表 1)。

(表 1) 細胞内脂肪滴数

試験区	供試 胚数	脂肪滴数					
		大		中		小	
EITS	7	16.4	± 6.2 a	227.1	± 24.7	322.9	± 48.1
EITS+G	6	18.3	± 2.9 a	148.8	± 31.2	208.3	± 46.9
FCS	16	31.6	± 3.9 b	223.1	± 18.6	304.4	± 27.7

注1): 脂肪滴 大; ≥5 μm、中; 2.5-4.9 μm、小; <2.5 μm

注2): mean ± SEM、同列異符号間に有意差あり(P<0.05)

凍結・融解後、72 時間までの生存胚率及び脱出胚率は EITS 区 (85.7% 及び 81.0%)、EITS + G 区 (81.3% 及び 56.3%) が FCS 区 (25.9% 及び 22.2%) よりも有意に高かった。また、Glu 添加の有無による生存性の差は認められなかった (表 2)。

(表 2) 凍結融解後の生存性

試験区	供試 胚数	凍結融解後生存性									
		融解時		24h		48h		72h		脱出 胚数	
EITS	21	18	a	18	a	18	a	18	a	17	a
		85.7%		85.7%		85.7%		85.7%		81.0%	
EITS+G	16	15	a	13	a	13	a	13	a	9	a
		93.8%		81.3%		81.3%		81.3%		56.3%	
FCS	27	14	b	12	b	9	b	7	b	6	b
		51.9%		44.4%		33.3%		25.9%		22.2%	

注1): 上段は生存/脱出数、下段は生存/脱出率

注2): 同列異符号間に有意差あり(P<0.05)

試験 2: 経膈採卵由来卵子を用いた体外受精胚生産において、8 日目の胚盤胞発生率にいずれの区間でも有意な差は認められなかったが、EITS 区 (19.7%) は EITS + G 区 (30.1%)、FCS 区 (36.6%) にくらべやや低い傾向がみられた (表 3)。

(表 3) 経膈採卵由来卵子による胚生産成績

試験区	供試 卵子数	7 日目		8 日目	
		胚盤 胞数	胚盤胞率 (%)	胚盤 胞数	胚盤胞率 (%)
EITS	61	6	9.8 ± 4.0 a	12	19.7 ± 3.5
EITS+G	73	14	19.2 ± 2.0 ab	22	30.1 ± 3.5
FCS	41	15	36.6 ± 10.3 b	15	36.6 ± 10.3

注): mean ± SEM、同列異符号間に有意差あり(P<0.05)

経膈採卵由来卵子を用いて生産した胚の凍結・融解後移植による受胎率は EITS 区: 62.5%、EITS + G 区: 66.7%、FCS 区: 33.3% であり、無血清培養の 2 区で受胎率 60% 以上の良好な成績が得られた (表 4)。

(表 4) 凍結胚移植成績

試験区	移植頭数	受胎頭数	受胎率
EITS	8	5	62.5%
EITS+G	6	4	66.7%
FCS	6	2	33.3%

【考察】

血清には多種多量のタンパク、脂肪、アミノ酸、糖、ビタミン、無機塩、ホルモン様物

質や細胞成長因子などが含まれており⁷⁾、ウシの体外受精胚生産における発生培地への血清添加の目的はこれらの物質の胚への供給である⁸⁾。一方で、血清中に含まれる脂肪が細胞内に多量に蓄積されることが、体外受精胚の耐凍性を低下させる一因となることが報告されている⁹⁾。本研究では発生培地に成長因子等を添加することで、血清無添加でも良好な胚の発生成績が得られ、生産された胚は細胞内の大脂肪滴数が減少して耐凍性が向上することが示された。また、Glu 添加の有無により脂肪滴数や耐凍性に差は認められなかったことから、胚の発生率を考慮すると培養開始後 6 日目に栄養基質として Glu を添加することがより効果的であることが示された。本培養系は高能力雌牛からの経膈採卵由来卵子を用いた体外受精胚生産に活用可能であり、凍結・融解後移植で良好な受胎率が期待できることから、本技術による効率的な高能力産子生産の現場普及の一層の推進が可能となると考える。

【参考文献】

- 1) 小西正人, 青柳敬人. 1994. ウシ体外受精由来胚の胚盤胞への発育に関する合成培地の検討. *J. Reprod. Dev.*, 40:j1-j4
- 2) Pinyopummintr, T. and Bavister, B. D.1991.In vitro-matured/in vitro-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. *Biol. Reprod.*, 45:736-742.
- 3) Thompson, J. G., Allen,N.W.,McGowan,L.T.,Bell,A.C.S.,Lambert,M.G.and Tervit, H. R. 1998. *Theriogenology*, 49:1239-1249.
- 4) 星宏良, 山下祥子, 阿部宏之. 1997. 高品質ウシ体外受精卵を生産する無血清培養法の研究. 食肉に関する助成研究調査成果報告書, 16 : 1-5
- 5) 佐田竜一, 阿部宏之, 山下祥子, 辻井弘忠, 星宏良. 1999. ウシ体外受精卵の品質に影響する血清因子の研究. 食肉に関する助成研究調査成果報告書, 18:43-47
- 6) 梅木英伸 大分県畜産試験場 平成 20 年度試験成績報告書 38:1
- 7) 植木厚, 1987. 続生化学実験講座 8 血液 (下), 第 1 版. 891-897.東京化学同人. 東京.
- 8) 植木厚, 1990. 続生化学実験講座 18 細胞培養技術, 第 1 版. 40. 東京化学同人. 東京.
- 9) Toshikiyo Takahashi, Yasushi Inaba, Tamas Somfai, Masahiro Kaneda, Masaya Geshi, Takashi Nagai and Noboru Manabe. Supplementation of culture medium with L-carnitine improves development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro.*Reproduction, Fertility and Development* (DOI: 10.1071/RD11262).