

経膈採卵－体外受精による良品質胚生産の検討

安達聡・渡邊竜二・佐藤恭二・藤田達男

Good quality embryos production in cattle by OPU-IVF (ovum pick up-in vitro fertilization) technique that use serum-free medium

要 旨

本研究は、ウシ体外受精胚移植による効率的な高能力産子生産技術の確立および普及を目的としている。今回、これまでに開発した無血清発生培地SOFaaにPolyvinyl alcohol (PVA) ; 1mg/ml、上皮成長因子 (EGF) ; 100ng/ml、インスリン様成長因子-I (IGF-I) ; 50ng/ml、トランスフェリン (Tf) ; 5 μ g/ml、セレン (Se) ; 5ng/mlを添加し、さらに培養開始6日目にグルコース (Glu) ; 4.0mM を添加する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。

1. 食肉処理場由来卵子を用いた試験において、本培養系で生産された胚は血清添加培養で生産された胚に比べて細胞内の大脂肪滴数が少なく、凍結・融解後の生存性は高かった。また、これらにGlu添加の有無による差はみられなかった。
2. OPU由来卵子を用いた胚生産においても、本培養系を用いることにより血清添加培養と比較して遜色のない良好な胚の生産性が得られることが確認された。
3. 本培養系でOPU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60%以上の良好な成績が得られた。

これらの結果から、本培養系はOPU-IVF技術に活用可能であることが示され、本技術による効率的な高能力産子生産の一層の普及推進が可能となると考えられた。

(キーワード：無血清発生培地、細胞内大脂肪滴数、耐凍性、OPU-IVF、凍結・融解後移植)

背景および目的

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、当研究部では血清を添加しなくても良質な胚を安定して生産できる培養系の開発に取り組んできた結果、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SOFaaにPVA ; 1mg/ml、EGF ; 100ng/ml、IGF-I ; 50ng/ml、Tf ; 5 μ g/ml、およびSe ; 5ng/mlを添加し、さらに培養開始6日目にGlu ; 4.0mM 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OPU-IVF技術による子牛生産への活用について検討した。

なお、本内容は6県（神奈川、奈良、高知、山口、大分、宮崎）共同で実施した試験のうち当場の成績である。

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 (アントリンR10 ; 共立製薬)、1 μ g/ml Estradiol-17 β (SIGMA)、0.2mMピルビン酸 (SIGMA)、5%牛胎児血清 (FCS ; GIBCO) 添加TCM-199 (GIBCO) 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 $^{\circ}$ C、5%CO₂ in air、湿潤の条件下で実施した。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 (SIGMA) と100ng/ml EGF (SIGMA)、50ng/ml IGF-I (SIGMA)、5 μ g/ml Tf (機能性ペプチド研究所)、5ng/ml Se (機能性ペプチド研究所) を添加した (E

ITS) 区、EITS区に発生培養開始後 6 日目に4.0mM Glu (和光純薬) 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、1 胚あたり5 μ lの培養液中で38.5 $^{\circ}$ C、90%N₂、5%CO₂、5% O₂、湿潤の条件下で実施した。

試験 1 で生産された胚盤胞期胚の一部は、Niimuraらの報告⁷⁾に準じて細胞内脂肪滴をSudanIVにより染色して直径を計測し、大きさ (大; 5 μ m以上、中; 2.5 μ m以上5 μ m未満、小; 2.5 μ m未満) ごとに分けて計数した。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、試験 1 と同じ方法で凍結・融解後、ダイレクト移植し受胎率を調査した。

結果

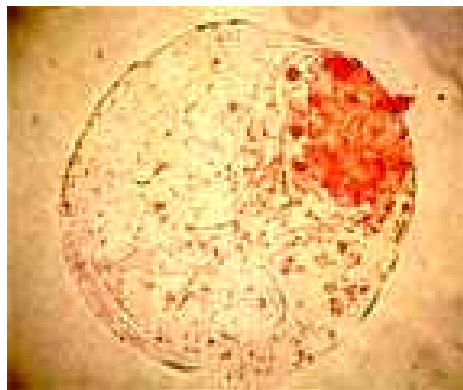
試験 1 : 食肉処理場由来卵子を用いた体外受精胚生産において、8 日目の胚盤胞発生率はEITS区(22.5%)でFCS区(36.2%)にくらべ低くなったものの、6 日目からGluを添加することで改善がみられ、EITS+G区(29.0%)とFCS区の間には有意な差は認められなかった (表 1)。

(表1)食肉処理場由来卵子による胚生産成績

試験区	供試回数	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	7	262	28	10.7 \pm 1.1 ^a	59	22.5 \pm 2.4 ^a
EITS+G	7	262	38	14.5 \pm 1.9 ^a	76	29.0 \pm 2.6 ^{ab}
FCS	7	257	88	34.2 \pm 3.4 ^b	93	36.2 \pm 3.8 ^b

注): mean \pm SEM、同列異符号間に有意差あり(P<0.05)

図 1 にSudanIVで染色した胚盤胞期胚の顕微鏡像を示した。細胞内の脂肪滴は赤く染まり明瞭に識別できた。



(図1) SudanIVで染色された細胞内脂肪滴

1 胚あたりの細胞内脂肪滴数は、5 μ m以上の大脂肪滴数においてEITS区 (16.4 \pm 6.2)、EITS+G区 (18.3 \pm 2.9) がFCS区 (31.6 \pm 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 2)。

(表2)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 \pm 6.2 ^a	227.1 \pm 24.7	322.9 \pm 48.1
EITS+G	6	18.3 \pm 2.9 ^a	148.8 \pm 31.2	208.3 \pm 46.9
FCS	16	31.6 \pm 3.9 ^b	223.1 \pm 18.6	304.4 \pm 27.7

注1): 脂肪滴 (大) \geq 5 μ m、(中)2.5 μ m \leq (中)<5 μ m、(小)<2.5 μ m
注2): mean \pm 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%、以下同順)、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 3)。

(表3)凍結融解後の生存性

試験区	供試胚数	凍結融解後生存性				脱出胚数
		4h	24h	48h	72h	
EITS	21	18 ^a	18 ^a	18 ^a	18 ^a	17 ^a
		85.7%	85.7%	85.7%	85.7%	
EITS+G	16	15 ^a	13 ^a	13 ^a	13 ^a	9 ^a
		93.8%	81.3%	81.3%	81.3%	
FCS	27	14 ^b	12 ^b	9 ^b	7 ^b	6 ^b
		51.9%	44.4%	33.3%	25.9%	

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、試験 1 の結果と同様にEITS区(19.7%)は他区にくらべやや低い傾向がみられ、6 日目からGluを添加したEITS+G区(30.1%)ではFCS区(36.6%)と比較しても遜色ない良好な成績が得られた (表 4)。

(表4)経膈採卵由来卵子による胚生産成績

試験区	供試回数	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	6	61	6	9.8 \pm 4.0 ^a	12	19.7 \pm 3.5
EITS+G	6	73	14	19.2 \pm 2.0 ^{ab}	22	30.1 \pm 3.5
FCS	6	41	15	36.6 \pm 10.3 ^b	15	36.6 \pm 10.3

注): mean \pm 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5）。

（表5）凍結・融解後移植成績

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⁸⁾、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⁹⁾。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¹⁰⁾。本研究では発生培地を無血清培地とすることで細胞内の脂肪滴形成を抑制し、体外受精胚の耐凍性向上ならびに受胎性向上を図ることを目的とした。今回、成長因子等含む5種の物質を発生培地に添加することにより、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一層の普及推進が可能となると考える。

引用文献

- 1) 小西正人, 青柳敬人. 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, 1994
- 2) Pinyopummintr, T. and Bavister, B. D. 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, 1991
- 3) Thompson, J. G., Allen, N. W., McGowan, L. T., Bell, A. C. S., Lambert, M. G. and Tervit, H. R. *Theriogenology*, 49:1239-1249, 1998
- 4) 星宏良, 山下祥子, 阿部宏之. 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, 1997

5) 佐田竜一, 阿部宏之, 山下祥子, 辻井弘忠, 星宏良. 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, 1999

6) 梅木英伸. 大分県畜産試験場試験成績報告書, 38:1, 2008

7) Niimura Suelo, Takano Hiroko, Onishi Akira and Hosoe Misa. Changes in the amount of proteins, glycogen and lipids in porcine oocytes during in vitro meiotic maturation. *Animal science journal* 73(5), 327-332, 2002

8) 植木厚. 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, 1987

9) 植木厚. 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, 1990

10) 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), 2012