

# 17. ウシ体外受精発生培養液への新鮮酵母エキス添加効果

農林水産研究指導センター畜産研究部  
○三村純一郎・(病鑑) 藤田達男・内村 誠

## 【目的】

近年、体外受精胚の研究分野では、OPUにより生体から採取された卵子を用いたOPU-IVF法の有用性が高まり、体外受精技術の開発が活発に行われている。しかしながら、一般にウシ体外受精胚は、体内受精胚に比べて胚の品質や耐凍性が低く、受胎率が低いことが知られている。そのため、効率的な子牛生産を行うためには、体外受精胚の培養技術や凍結保存技術を改善し、高受胎率が望める高品質な体外受精胚を生産する必要がある。

一方、酵母エキスは、食品、医薬品、農業など様々な分野で応用されており、人の美容分野では、酵母エキスに含まれるアミノ酸に表皮細胞に対する増殖促進効果や皮膚細胞再生効果が認められており、化粧品原料として用いられている。また、細胞培養系では、哺乳動物細胞の無血清培養液に利用されており、酵母エキスに含まれる特定のペプチドに細胞増殖促進効果があることが明らかにされている。しかしながら、これらの効果を持つ酵母エキスが受精卵の培養系に用いられた報告は見当たらない。

そこで、本研究は酵母エキスの細胞増殖促進効果に着目して、従来 of 牛胎児血清（以下、FBS）添加発生培養液に酵母エキスを添加することにより、胚細胞の増殖が促進され、胚盤胞発生率が向上するかどうかを明らかにするとともに、耐凍性への影響について検討した。

## 【材料及び方法】

### 1. 卵子採取～発生培養

食肉処理場由来の卵巣を保温容器に入れて実験室に持ち帰り、卵丘細胞卵子複合体を回収し、成熟培養液に1 µg/ml Estradiol-17 β、0.02AU/ml 卵胞刺激ホルモン、0.2mM ピルビン酸、5%FBSを添加したTCM-199を用いて38.5°C、5%CO<sub>2</sub>、95%空気、湿度飽和気相条件下で20時間培養した。

### 2. 媒精

同一製造ロットの黒毛和種「桜花久」の凍結精液を用いて、機能性ペプチド研究所の

### 【酵母エキスとは】

- ◆酵母に含まれる成分を抽出したもので、アミノ酸、ビタミン、成長因子、糖質及び核酸など各種栄養素を豊富に含む
- ◆マイコプラズマなど微生物の増殖を促進する効果あり  
(\*マイコプラズマ、スピロヘータ分離培養に必須)
- ◆哺乳動物株化細胞(CHO細胞など)の無血清培養に利用されており、酵母エキス中の特定のペプチドに細胞増殖促進効果がある(Mosserら、2015)
- ◆受精卵の培養に応用した報告は見当たらない

### 材料及び方法

#### 卵子採取

- ◆食肉処理場由来卵巣の直径2~6mm卵胞より吸引採取したA、Bランク以上の卵丘細胞複合体を供試

#### 成熟培養

- ◆1 µg/ml Estradiol-17 β・0.02AU/ml FSH・0.2mMピルビン酸・5%FBS加TCM199
- ◆培養条件: 38.5°C, 5%CO<sub>2</sub> in air 湿潤条件下 20h

#### 媒精

- ◆黒毛和種精液使用、最終精子濃度: 500万精子/ml
- ◆IVF100(機能性ペプチド研究所)
- ◆培養条件: 38.5°C, 5%CO<sub>2</sub> in air 湿潤条件下 6h

IVF100 で最終精子濃度が 500 万/ml になるように調整し、38.5°C、5%CO<sub>2</sub>、95%空気、湿度飽和気相条件下で 6 時間培養した。

### 3. 発生培養

媒精後、パストールピペットで卵丘細胞を除去し、形態的に正常な胚を供試した。培養液は FBS 添加 mSOFaa を用い、これに酵母エキス (新鮮酵母エキス; オリエンタル酵母工業) を 0.01%、0.05%、0.1% 及び 0.2% 添加した試験区と酵母エキス無添加の無添加の対照区を設定し、38.5°C、5%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>、90%N<sub>2</sub>、湿度飽和気相条件下で 8 日間培養を行った。

**発生培養**

- ◆ 媒精後、パストールピペットで卵丘細胞を除去し、斑模様等のない形態的に正常なものを供試
- ◆ 5%FBS加mSOFaaにYE(新鮮酵母エキス;オリエンタル酵母工業、Tokyo)を段階的に添加した添加区(0.01%区、0.05%区、0.1%区及び0.2%区)と対照区(0%区)を設定
- ◆ 培養条件: 38.5°C,5%CO<sub>2</sub>,5%O<sub>2</sub> in air 湿度飽和条件下7~8day
- ◆ 実験毎に0%区を置き、各添加区の試験を実施

**胚細胞数の計測**

- ◆ Day7の拡張胚盤胞を供試
- ◆ Propidium IodideとHoechst33342による二重染色
- ◆ 蛍光顕微鏡で計測

### 4. 胚細胞の計測

培養 7 日目の拡張胚盤胞を用いて、Propidium Iodide と Hoechst33342 による二重染色を行い、落射蛍光顕微鏡にて内細胞塊細胞と栄養膜細胞の細胞数を計測した。


### 5. 胚の凍結

培養 7 及び 8 日目に国際胚移植学会 (IETS) マニュアルの Code1 に準じて、正常な発育段階にあり、輪郭明瞭、正常ないしほぼ正常な形態を示し、変性部位が 15%以下の拡張胚盤胞を凍結保存した。凍結保存液には、10%グリセリン、0.25M スクロース、20%FBS 含有修正 TCM-199 を使用し、ダイレクト法により緩慢凍結保存した。

**凍結保存**

- ◆ Day7~8の拡張胚盤胞を10%Glyダイレクト法で緩慢凍結保存

凍結液: 10%Gly, 0.25M Suc, 20%FBS加TCM199  
希釈液: 0.25M Suc, 20%FBS加TCM199



**凍結胚の生存性試験**

- ◆ 融解後、20%CS加D-PBSで平衡し、0.1mM  $\beta$ -ME・20%CS加TCM199で培養
- ◆ 72~96h培養後の胚の生存と透明帯脱出の確認

### 6. 凍結胚の生存性試験

凍結胚の融解後、20%BS 添加 DPBS で 10 分間平衡し、培養液 (0.1mM  $\beta$ -メルカプトエタノール、20%CS 添加 TCM-199 で 72~96 時間培養し、胚の生存及び透明体脱出の有無を確認した。

### 7. 調査項目

本研究は、主に 3 つの点に絞って調査を行った。調査 1 は媒精後 48 h 卵割率と 7~8 日目の胚盤胞発生率及び拡張胚盤胞発生率、調査 2 は 7 日目の拡張胚盤胞の胚細胞数、調査 3 は 7~8 日目の拡張胚盤胞を凍結・融解し、培養 72~96 時間後の生存率及び脱出胚率を調査した。

なお、統計処理については、卵割率・胚発生率、胚生存率、脱出胚率はカイ二乗検定、胚細胞数は  $t$  検定で実施した。

**調査1**

- ◆ 媒精後48hの卵割率
- ◆ Day7~8の胚盤胞発生率及び拡張胚盤胞発生率

**調査2**

- ◆ Day7の拡張胚盤胞の胚細胞数

**調査3**

- ◆ Day7~8の拡張胚盤胞を凍結・融解し、培養72~96h後の胚生存率及び脱出胚率

**統計処理**

- ◆ 卵割率、胚発生率、胚生存率、脱出胚率は $\chi^2$ 検定  
胚細胞数は $t$ 検定

## 【結果】

### 1. 発生培養液への酵母エキス添加濃度別、卵割率、胚発生率

各試験区間で卵割率に有意差は認められなかったが、胚盤胞発生率は0.05%区が0%区と0.2%区に対して有意に高値であり( $p < 0.01$ )、拡張胚盤胞発生率も同様に0.05%区が0%区( $p < 0.05$ )と0.2%区( $p < 0.01$ )に対して有意に高値であった。

### 2. 発生培養液への酵母エキス添加濃度別、内細胞塊、栄養膜細胞数

酵母エキス0%区と胚盤胞発生率が最も高かった0.05%区の内細胞塊細胞、栄養膜細胞を計測した結果、内細胞塊細胞数は $57.3 \pm 3.6$ 、 $59.0 \pm 2.5$ 、栄養膜細胞数は $67.2 \pm 7.2$ 、 $64.3 \pm 1.8$ 、総細胞数は $124.5 \pm 9.0$ 、 $123.3 \pm 3.8$ という結果となり、いずれにおいても両区ともに有意差は認められなかった。

### 3. 酵母エキス添加濃度別、凍結融解後の胚生存率、脱出胚率

各試験区間で有意差は認められず、酵母エキスの添加が耐凍性に影響していないことが推察された。

## 【考察】

牛体外受精発生培養液に酵母エキスを0.05%添加することにより、胚盤胞発生率が13.2%、拡張胚盤胞発生率が9.1%向上した。7日目拡張胚盤胞の胚細胞数に変化はなく、また、凍結融解、培養後の胚生存率、脱出胚率に差は認められなかった。以上の結果より、胚発生率の向上において、発生培養液への酵母エキス添加の有用性が示唆された。

酵母エキスは体外受精卵培養に使われた例がなく、血清と同様にどのように作用しているか未知の部分が多い。今後は、脂肪滴生成の抑制に着目し、耐凍性の向上を目指す試験として、酵母エキスとL-カルニチンとの組合せ試験及び血清添加量の減量と酵母エキス増量を組合せた試験など、更なる研究が必要であると考える。また、各調査においてもさらに例数を重ね検討するとともに、受胎試験も行い、高品質な体外受精胚生産を可能とする発生培養方法の確立を図りたい。

## 結果

表1. 発生培養液へのYE添加濃度別、卵割率、胚発生率

YE添加濃度 (%)	供試卵子数	実験回数	卵割率 (%)	胚盤胞発生率 (%)	拡張胚盤胞発生率 (%)
0.0	356	13	72.2	43.9 B	38.5 b
0.01	92	2	72.8	52.2	43.5 a,b
0.05	256	13	78.9	57.1 A	47.6 A,a
0.1	189	11	76.7	50.5 a	40.3 a,b
0.2	152	8	78.9	39.7 B,b	28.5 B,c

\* 同列異符号間に有意差あり A,B:( $p < 0.01$ )、a,b,c:( $p < 0.05$ )

表2. 発生培養液へのYE添加濃度別、内細胞塊、栄養膜細胞数

YE添加濃度 (%)	供試胚数	内細胞塊細胞	栄養膜細胞	総細胞数
0.0	10	$57.3 \pm 3.6$	$67.2 \pm 7.2$	$124.5 \pm 9.0$
0.05	4	$59.0 \pm 2.5$	$64.3 \pm 1.8$	$123.3 \pm 3.8$

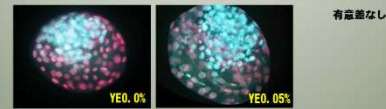


表3. YE添加濃度別、凍結融解後の胚生存率、脱出胚率

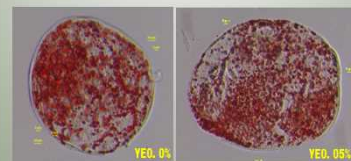
YE添加濃度 (%)	供試凍結胚数	胚生存率 (%)	脱出胚率 (%)
0.0	49	67.3	53.1
0.01	25	80.0	52.0
0.05	27	70.4	55.6
0.1	24	70.8	66.7
0.2	14	50.0	50.0

有意差なし

## まとめ、考察

- ウシ体外受精発生培養液にYEを0.05%添加することにより、
  - 胚盤胞発生率が13.2ポイント( $p < 0.01$ )、拡張胚盤胞発生率が9.1ポイント( $p < 0.05$ )向上
  - Day7拡張胚盤胞の胚細胞数に変化なし
  - Day7~8拡張胚盤胞の凍結融解・培養後の胚生存率、脱出胚率に変化なし
- 胚発生率の向上において、発生培養液へのYE添加の有用性が示唆された

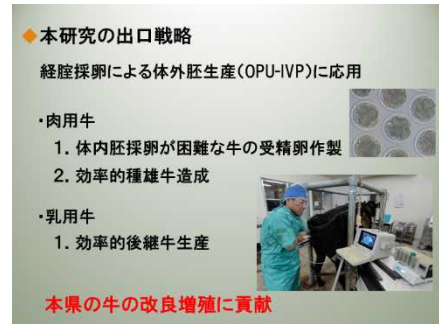
- 今後は、脂肪滴生成の抑制に着目し、耐凍性向上を目指す
  - YEとL-カルニチンとの組合せ試験
  - 血清添加量の減量とYE増量を組合せた試験



Day7拡張胚盤胞を脂肪染色(Sudan4)

## 【出口戦略】

現在、畜産研究部では施設整備に向けて動いているところである。将来的により高度な機能を備えた受精卵製造施設と本研究で培ったより高度な技術を活用して、肉用牛では体内胚採卵が困難な牛の採卵及び効率的種雄牛造成、乳用牛では効率的に後継牛を生産し、本県の牛の改良増殖に貢献したいと考えている。



## 【参考文献】

- ・ 共同研究「OPU-IVPによる効率的ウシ体外受精由来胚生産方法の検討」第26回受精卵移植関連新技術全国会議. 2023, 14-18
- ・ 福島護之, 富永敬一郎, 秦谷豊, 内海恭三. 体外受精由来胚盤胞の凍結能についての特性. *Journal of Reproduction and Development*. 1992, 38, 49-54.
- ・ 福島護之. 体外受精・体外培養法で作出された牛胚盤胞の凍結融解後の受胎性, 繁殖技術会誌. 1992, 14, 1-5. ・ 山崎裕也, 井上智実, 笹木哲也. 石川県産酵母の化粧品素材としての有効性評価. 石川県工業試験場研究報告. 2020, 69, 28-31.
- ・ 荻野輝. 新規酵母エキスのヒト皮膚への有効性. *FRAGRANCE JOURNAL*. 2016, 44-6, 86
- ・ 御筆千絵, 加世田国与士. 温泉酵母を用いた加水分解コラーゲン-エネルギー再生機構の促進による肌の再生. *FRAGRANCE JOURNAL*. 2016, 12, 38-43
- ・ 川野大地, 廖箏箏, 聶菁, 伊達朗, Eduardo Perez, Jose Fernandez, Corey Webb, Kristen Huber, Jeffry B. Stock, 川上純司, 付子華. 好熱性細菌および酵母菌による多段階培養発酵技術から得られた発酵エキスの皮膚に対する有用性. *日本化粧品学会誌*. 2020, 44-3, 194-202
- ・ Mathilde Mosser, Romain Kapel, Isabelle Chevalot, Eric Olmos, Ivan Marc, and Annie Marc, Eric Oriol, Fractionation of Yeast Extract by Nanofiltration Process to Assess Key Compounds Involved in CHO Cell Culture Improvement. *Biotechnology Progress*. 2015, 31, 875-882
- ・ 久々宮萌果, 澤野貴之, 倉原貴美. 酪農生産基盤強化に向けた黒毛和種体外受精卵生産技術の確立. 平成29年度大分県農林水産研究指導センター畜産研究部試験成績報告書. 2017, 47
- ・ R de la Fuente, W. A. King, Use of chemically defined system for the direct comparison of inner cell mass and trophectoderm distribution in murine, porcine and bovine embryos. *Zygote*. 1997, 5, 309-320.