

無血清培地を用いた牛体外受精由来胚の生産

須崎哲也・赤塚裕人・溝辺敬美 (宮崎県畜産試験場)

Tetsuya SUZAKI, Hirohito AKATSUKA and Takami MIZOBE :
Production of in vitro fertilized bovine embryos in serum-free culture medium

牛の対外受精由来胚の生産を行う場合、血清培地を用いて胚を培養するのが一般的である。しかし、牛牛血清 (CS) や牛胎児血清 (FCS) などの血清は商品やロットによりその成績がばらつくため、試験を開始する際にロットチェックなどを事前に行うことが必要である。このため、より簡易にまた安定的に胚生産を行う方法の確立が望まれている。今回、(株)機能性ペプチド研究所が開発した無血清培地キットを用いて従来の血清培地と比較した場合の牛体外受精由来胚の発生能について検討した。なお、本試験は実用化促進支援研究で行った。

1. 材料および方法

食肉センター由来の牛卵巣から未成熟卵子を採取し、無血清培地区 (A法: 共培養区。B法: 非共培養区) は IVMD101 (修正 TCM-199) で、血清培地区 (C法) は 10% FCS 加 TCM-199 で 22 時間培養した。1頭の黒毛和種牛精液を用い、A、B法は IVP100 (修正 B0液) で、C法はカフェイン-ヘパリン法 (B0液) で、精子濃度を 500 万/ml に調整後 6 時間媒精した。媒精が終了した卵子-卵丘細胞複合体をシャーレにコラーゲン処理し、IVMD101 で作成したドロップに移し、A法は媒精後 8 日目まで卵丘細胞層と共培養した (38.5°C, 5% CO₂ in air)。B法は媒精後 1 日目まで卵丘細胞層と共培養し、その後 8 日目まで IVD101 で低酸素の気相条件 (38.5°C, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂) で非共培養した。C法は媒精が終了した卵子-卵丘細胞複合体をピペッティングにより裸化し、媒精後 2 日目まで CR1aa-BSA で培養した。その後、8 日目まで 10% FCS 加 CR1aa で低酸素の気相条件 (38.5°C, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂) で非共培養した。胚盤胞期胚を 20% CS 加修正 TCM-199 を基本液にした 1.5M エチレングリコール + 0.2M トレハロースでプログラムフリーザーを用い -30°C まで凍結し、液体窒素中 (-197°C) で保存した。融解は液体窒素からストローを取り出し 30-33°C の温湯に浸漬し、培養は IVMD101 で卵丘細胞層と 72 時間共培養した (38.5°C, 5% CO₂ in air)。また A法および B法で作出した胚については発情周期を同調した受胚牛へ凍結胚を融解後直接移植した。

2. 結果および考察

第 1 表に試験方法別体外受精成績を示した。媒精後 48 時間の分割率は、B法は A、C法より有意に高い成績であった。また媒精後 8 日目の胚盤胞発生率は、A、B法は C法と同様な成績であった。無血清培地区が血清培地区より分割率が高くなったのは、無血清培地に卵丘細胞

の膨化と受精能を高める効果のある TGF- α が入っていたためだと考えられた。第 2 表に凍結胚の融解・培養後の生存性を示した。融解後 72 時間後の脱出胚の割合は A法は C法より有意に高くなり、B法は C法より高い傾向となった。写真 1 に無血清培地で作出した胚を、写真 2 に血清培地で作出した胚を示した。無血清培地で作出した胚を顕微鏡下で観察すると血清培地で作出した胚より白っぽく見えるが、これは胚の栄養膜細胞に含まれる脂肪顆粒 (無血清培地は大型の脂肪顆粒少数、血清培地は大型の脂肪顆粒多数) によるものだと阿部らは報告している。

今回、無血清培地で作出した胚が血清培地で作出した胚より耐凍性に優れていたのは、このことが関係していると考えられた。また、無血清培地で作出した胚を凍結融解後、移植したところ受胎率 41.7% (5/12) で良好な成績が得られ、2頭の正常な黒毛和種の産子が得られている。以上のように、無血清培地で牛体外受精胚の生産を行うと胚の発育が安定している、胚の品質が高い、試薬の調整が必要ない、血清の選定が必要でない、特別な機械・施設等が必要でない等があげられ、牛体外受精由来胚の生産に無血清培地が有効であることが示された。

第 1 表 試験方法別体外受精成績

試験区	供試卵数	分割率 (%)	胚盤胞発生率 (%)
A 法	355個	87.3% ^b	42.3%
B 法	489個	91.6% ^a	39.3%
C 法	362個	82.6% ^c	40.9%

注) a-b: 異符号間に有意差あり (p < 0.05)
a-c: 異符号間に有意差あり (p < 0.01)

第 2 表 凍結胚の融解・培養後の生存性

試験区	供試胚数	生存胚率 (%)		
		24時間後	48時間後	脱出胚
A 法	50個	92.0% ^a	88.0% ^a	74.0% ^a
B 法	50個	94.0% ^a	84.0% ^a	70.0%
C 法	50個	74.0% ^b	64.0% ^b	52.0% ^b

注) a-b: 異符号間に有意差あり (p < 0.05)

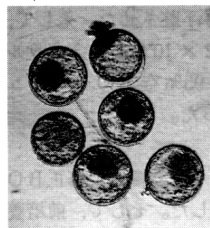


写真 1

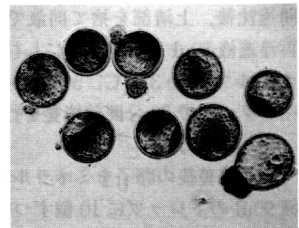


写真 2