

## HP-SOF 培地を用いた牛体外受精技術の検討

須崎哲也・赤塚裕人・長友隆典(宮崎県畜産試験場)

Tetsuya SUZAKI, Hirohito AKATSUKA and Takanori NAGATOMO .

## Effects of HP-SOF Medium on the Development of In Vitro Fertilized Bovine Embryos

Tervit 社<sup>1)</sup>によって開発された合成卵管液 SOF 培地は、牛の体外受精を行う場合、一般的に用いられる基礎培地である。成分が単純で作成しやすい反面、安定性に乏しい培地でありその使用期限は短い。そのため、長期間にわたって使用できる SOF 培地の開発が望まれていた。(株)機能性ペプチド研究所(以下、ペプチド研)が開発した HP-SOF 培地は、SOF 培地に必須および非必須アミノ酸を添加し、pH 安定化のための HEPES を添加した培地である。またカルシウムと乳酸を L-乳酸カルシウムとして添加することにより、塩化カルシウムの添加量を SOF 培地の半量とすることで、沈殿生成を抑え製品の安定性を増している。今回、HP-SOF 培地を用いた牛体外受精の成績を、当场において良好な成績の得られている、無血清培地 IVMD101 と比較した。

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

今回、試験に供した HP-SOF 培地(ペプチド研製)は SOF 培地に NaOH, HEPES, L-Calcium Lactate, PVA, 硫酸ゲンタマイシン, 必須 非必須アミノ酸を添加したものである。A 法は HP-SOF 培地の卵丘細胞層との共培養区, B 法は HP-SOF 培地の非共培養区, C 法は IVMD101 培地(ペプチド研製)の卵丘細胞層との共培養区とした。食肉センター由来の黒毛和種雌牛の卵巣から未成熟卵子を採取し、IVMD101 で 22 時間成熟培養した。媒精は 1 頭の黒毛和種牛精液を用い、IVF100(ペプチド研製)で精子濃度を 500 万/ml に調整後 6 時間行なった。媒精が終了した卵子-卵丘細胞複合体を A 法は媒精後 8 日目まで 10%FCS 加 HP-SOF 培地で卵丘細胞層と共培養した(38.5°C, 5% CO<sub>2</sub> in air)。B 法は 10%FCS 加 HP-SOF 培地で、媒精後 2 日目まで卵丘細胞層と共培養し(38.5°C, 5%CO<sub>2</sub> in air), その後 8 日目まで 10% FCS 加 HP-SOF 培地で、低酸素の気相条件(38.5°C, 5%CO<sub>2</sub> 5%O<sub>2</sub> 90%N<sub>2</sub>)で非共培養した。C 法は媒精後 8 日目まで IVMD101 で卵丘細胞層と共培養した(38.5°C, 5%CO<sub>2</sub> in air)。媒精後 48 時間で分割率を、媒精後 8 日目で胚盤胞発生率を調べた。

## 2. 結果および考察

第 1 表に試験方法別の体外受精成績を示した。媒精後 48 時間の分割率は、A, B 法は C 法と同様な成績であった。正常に分割したと考えられる 5-8cell 以上の割合は、A 法 69.3%, B 法 69.8%, C 法 68.7% で A, B 法は C 法と同様な成績であった。胚の発育速度は、媒精後 6 日目に A, B 法で胚盤胞が発生したのに対し、C 法では発

生しなかった。媒精後 7 日目の胚盤胞発生率は、A, B 法が約 20.0% であるのに対し、C 法は約 14.0% と低い傾向を示したが、媒精後 8 日目になると、胚盤胞発生率は、A 法は C 法と同様な成績となり、B 法は C 法より若干低い傾向となった。

第 1 表 体外受精成績

試験区	供試卵数	分割率 (%)	胚盤胞発生率 (%)		
			day6	day7	day8
A 法	153 個	81.0	2.6	22.2	31.4
B 法	139 個	81.3	5.0	21.6	27.3
C 法	115 個	80.9	0.0	13.9	30.4

注) A 法: 10%FCS 加 HP-SOF co-culture

B 法: 10%FCS 加 HP-SOF non co-culture

C 法: IVMD101 co-culture

培養液中に含まれるグルコース濃度が、胚の発生に影響していることはよく知られている。本試験に用いた HP-SOF 培地のグルコース濃度は 1.5mM であるのに対し、IVMD101 培地のグルコース濃度は 5.6mM と約 4 倍である。つまり、HP-SOF 培地では、グルコースによる初期胚への影響が少なかったため、胚盤胞が早い時期に出現したと考えられた。また、IVMD101 培地では、共培養であったため、卵丘細胞の代謝をとおしてグルコース濃度が至適化され、結果として、最終的に胚盤胞発生率に差がなかったものと考えられた。

本試験により作出した胚盤胞を、顕微鏡下で観察すると、HP-SOF 培地で作出した胚は、IVMD101 培地で作出した胚に比べ、内部細胞塊が若干不明瞭であった。このことが、胚の品質や耐凍性にどのように影響するかは不明である。移植試験を含め、引き続き調査する必要があると思われる。

以上のように HP-SOF 培地を用いて牛体外受精胚の生産を行ったところ、良好な成績が得られた。HP-SOF 培地の保存期間は約 6 カ月と長く、基礎培地として用いる場合、有効であることが示された。

## 参考文献

- 1) Tervit H R, Whittingham D G, Rowson L E R, (1972) 'Successful culture in vitro of sheep and cattle, J Reprod Fertil, 30:493-497