

ウシ体外受精における添加物の効果の検討

大谷徳寿・谷原礼諭・上村圭一・三谷英嗣・田中 隆¹⁾

The examination of the effect of the additive in bovine in-vitro fertilization.

Noritoshi OTANI, Ayatsugu TANIHARA, Keiichi UEMURA, Hidetugu MITANI, Takashi TANAKA

要 約

ウシ体外受精における胚盤胞発生率の向上を図るため、成熟培地、発生培地に各種添加物を添加し、その効果の比較を検討した。成熟培地を5%FCS加TCM199、発生培地を5%FCS加CR1aaとした従来の培養法を対照区とし、それにFSH 0.02AU/ml、ピルビン酸0.2mM、Estradiol-17 β 1 μ g/ml、EGF 10ng/ml、Betain 3mMを添加した試験区を設定した。また、体外受精では生体内に近い低酸素条件下での培養が高い発生率を得られるといわれており、その比較も試みた。その結果、いずれの試験区においても、対照区との有意な差は見られなかった。

結 言

肉用素ウシの低コスト生産という面から体外受精技術が利用され、本技術で生産される子ウシの数は増加している。体外受精胚の生産コストは、体外受精後の胚盤胞への発生率で異なり、これを高めるためには、体外受精系の各処理を適正な条件に設定することが重要である。そこで今回、様々な添加物の添加を試み、胚盤胞発生率向上の条件を検討した。

材料及び方法

1. 体外受精(対照区)

基本となる培養は、「ウシ生体卵子吸引・体外受精技術マニュアル¹⁾」：(独)家畜改良センター」を参考とし、1～5の方法により実施した。

1. 卵巣採取及び保存

と畜場で採取した黒毛和種の卵巣を抗生物質（ペニシリン100U/ml、ストレプトマイシン100 μ g/ml：明治製菓）を添加した25°Cの滅菌生理食塩水に保存し、輸送した。

2. 未成熟卵子の回収

と殺後6時間以内に、卵巣から未成熟卵子の回収を行った。卵子吸引は、1%子ウシ血清(CS；GIBCO)を加えた乳酸加リンゲル液(ハルゼンV注射薬：日本全薬)を用い、回収した卵子のうち、卵丘細胞が3層以上または透明体周囲全体に付着した卵子を選別し、同液及び成熟培地と同一培地で3回洗浄後、成熟培養に供した。

3. 成熟培養

卵巣採取前日に、25mM HEPES 緩衝 TCM199 (GIBCO) にウシ胎児血清(FCS；ICN)0.5ml/10ml、抗生物質を添加した培養液を培養皿(4Well Multidish；NUNC)の各ウェルに500 μ lずつ分注後、流動パラフィン(ナカライテスク)を重層し、気相平衡したものを成熟培地として用いた。培養は各ウェルに約50個ずつ未成熟卵子を入れ、38.5°C、5%CO₂、湿度飽和の条件下で20時間行った。

1) 現 香川県西部家畜保健衛生所

ウシ体外受精における添加物の効果の検討

4. 媒精

精液は、当場で繋養している黒毛和種「讃福茂」号の凍結精液を用いた。体外受精は、凍結精液融解後、市販の媒精液(IVF100;機能性ペプチド研究所)を用いて、2,000rpm、5分間で2回遠心洗浄し、最終精子数が 5×10^6 精子/mlに調整した媒精用ドロップ100 μ lに、媒精液で3回洗浄した成熟卵子20個を入れて、38.5 $^{\circ}$ C、5%CO₂、湿度飽和の条件下で6時間行った。

5. 発生培養

媒精を終了した卵子は、発生培養と同一培地で3回洗浄した。発生培養は、5%FCS、抗生物質、0.25mg/ml リノール酸アルブミン(SIGMA)を加えたCR1aaを培養皿(4Well Multidish: Nunc)の各ウェルに500 μ lずつ分注後、流動パラフィンを重ねし、気相平衡したものを用いた。培養は、各ウェルに約50個ずつ卵子を入れ、38.5 $^{\circ}$ C、5%CO₂、湿度飽和の条件下で行った。発生培養開始後、48時間目に卵丘細胞からの剥離、初期発生検査を行い、以後、24時間ごとにシャーレの縁を叩き、胚が底面の卵丘細胞に接着し、取り込まれ押しつぶされるのを防いだ。媒精日を0として7日まで胚盤胞の発生を検査した。

II. 添加物添加による比較試験

試験区は基本となる培養法の成熟培地、発生培地それぞれに添加物を添加することにより、卵割率、胚盤胞発生率の比較を行った。添加状況は表. 1のとおりである。

表. 1 添加物添加試験区分

試験区	成熟培地	発生培地
1	0.02AU/ml FSH (アトリン;テッカ) 0.2mM ピルビン酸(SIGMA)	添加なし
2	0.02AU/ml FSH (アトリン;テッカ) 0.2mM ピルビン酸(SIGMA) 1 μ g/ml Estradiol-17 β (SIGMA)	添加なし
3	0.02AU/ml FSH (アトリン;テッカ) 0.2mM ピルビン酸(SIGMA) 1 μ g/ml Estradiol-17 β (SIGMA) 10ng/ml EGF (SIGMA)	10ng/ml EGF (SIGMA)
4	0.02AU/ml FSH (アトリン;テッカ) 0.2mM ピルビン酸(SIGMA) 1 μ g/ml Estradiol-17 β (SIGMA) 10ng/ml EGF (SIGMA) 3mM Betaine (SIGMA)	10ng/ml EGF (SIGMA) 3mM Betaine (SIGMA)
5	0.02AU/ml FSH (アトリン;テッカ) 0.2mM ピルビン酸(SIGMA) 10ng/ml EGF (SIGMA) 3mM Betaine (SIGMA)	10ng/ml EGF (SIGMA) 3mM Betaine (SIGMA)
6	0.02AU/ml FSH (アトリン;テッカ) 0.2mM ピルビン酸(SIGMA) 10ng/ml EGF (SIGMA) 3mM Betaine (SIGMA)	10ng/ml EGF (SIGMA)

ウシ体外受精における添加物の効果の検討

III. 低酸素条件での比較試験

培養環境を成熟、発生いずれの場合も、38.5°C、5%CO₂、90%N₂、湿度飽和の低酸素条件とし、以下の2試験区で実施した。

表. 2 低酸素条件試験区分

試験区	成熟培地	発生培地
7	添加なし	添加なし
8	0.02AU/ml FSH (アトリン;デッカ) 0.2mM ピルビン酸(SIGMA) 10ng/ml EGF(SIGMA) 3mM Betain(SIGMA)	10ng/ml EGF(SIGMA) 3mM Betain(SIGMA)

結果及び考察

対照区、試験区それぞれの発生状況は、表. 3のとおりである。

表. 3 対照区および試験区の発生状況

試験区	試験回数	卵巣数	供試卵数 (A)	卵割数 (B)	卵割率% (B)/(A)	胚盤胞数 (C)	胚盤胞発生率% (C)/(A)
対照区	3	10.3	52.0	34.0	64.6	16.3	31.0
1	3	9.7	46.0	29.0	62.4	9.3	20.2*
2	2	14.0	52.5	31.0	59.0	15.5	30.5
3	2	13.5	54.5	33.0	61.9	15.5	30.0
4	2	13.0	64.0	34.0	54.7	20.5	33.5
5	3	10.3	46.7	28.3	62.3	18.0	38.5*
6	2	12.0	62.0	30.0	47.8	18.0	28.2
7	5	10.4	49.6	27.4	54.6	15.8	29.6
8	3	8.0	40.7	24.0	59.3	14.0	35.4

* : P<0.05

対照区と各試験区において、卵割率、胚盤胞発生率に有意差は見られなかった。

成熟培地に FSH、Estradiol-17β 等、ホルモンを添加すると卵丘細胞の臍潤化は促進したが、その後の卵割率、胚盤胞発生率には差が認められなかった。このことは、ホルモン添加の有無により、その後の発生率に差が見られなかったとする既報²⁾と一致した。

既報³⁾では、EGF(Epidermal Growth Factor : 上皮成長因子)を体外培養液に添加することにより、卵割率、胚盤胞発生率を向上させる効果を認めたとしており、特に、発生培地への添加効果が大きいことを示唆していたが、本試験では、有意な差は見られなかった。

Betaine は、浸透圧平衡化物質のひとつであり、培養期間中全ての培地に 3mM 濃度で添加することにより、胚盤胞発生率が向上するといわれている⁴⁾。試験区 5 では期間中全て、試験区 6 では成熟培地のみ添加したが胚盤胞発生率に有意な差はみられなかった。しかし、試験区 5 は、今回の試験区で最も胚盤胞発生率が高かった。

酸素濃度については、ウシ胚発生における至適酸素分圧は 4~12% であり、生体内に近い低酸素条件下の培養方法が高い発生率を得られる⁵⁾といわれているが、本試験では有意な差は見られなかった。

香川畜試報告、43 (2008)、8-11

参考文献

- 1) (独) 家畜改良センター, ウシ生体卵子吸引・体外受精技術マニュアル, 2007.
- 2) 溝下和則ほか, 牛体外受精胚作出と移植成績, 鹿児島県肉用牛改良研究所研究報告書 1:12-15, 1995.
- 3) 梅木英伸, 経膈採卵-体外受精によるウシ胚生産の取り組み, 日本胚移植学雑誌 28(1), 36-43, 2006
- 4) 遠山牧人ほか, ウシの体外受精胚生産における培養液への Betaine の添加効果, 日畜会報 77(4) :479-483, 2006
- 5) 青木義和ほか, 低酸素非共培養法によるウシ体外受精胚の生産効率向上と品質改善, 滋賀畜技セ研報 7:1-4, 2000