

牛体外受精胚の培養液と凍結液の改善による受胎率の向上

[要約] 牛体外受精胚は、培養3日目に199培養液のグルコース濃度を半減した培養液へ交換し、シュクロースを添加した凍結液で凍結すると耐凍性、受胎率が向上する。

畜産研究所・大家畜部・畜産工学研究室					連絡先	092-925-5232	
部会名	畜産	専門	繁殖	対象	家畜類	分類	指導

[背景・ねらい]

培養液TCM199（以下 199培養液）は、成分に含まれるグルコースが発生初期の胚に影響を及ぼすため、平成 9年度成果では、グルコースを含まない培養液と組み合わせて、培養 3日目に 199培養液へ移して培養し、胚の発生率を向上させた。しかし、さらに発生率を高めるには、培養液中のグルコース濃度について検討する必要がある。また、胚の凍結時には、凍結液に細胞保護の目的で糖が添加されるが、糖の種類については明らかにされていない。

そこで、培養液のグルコース濃度及び凍結液に添加する適正な糖の種類を明らかにすることにより、体外受精胚の耐凍性及び受胎率を向上させる。

[成果の内容・特徴]

- 1 199培養液のグルコースを含まない培養液で培養を開始し、培養 3日目に 199培養液のグルコース濃度を半減した培養液（199(1/2G)）に胚を移し培養すると、胚の発生率が向上する（表1）。
- 2 胚の凍結において、凍結液にはトレハロースよりシュクロースを添加した方が、胚の融解後の生存率が高くなる（表2）。
- 3 体外受精胚は、培養 3日目から 199(1/2G)培養液で培養し、シュクロースを添加した凍結液で凍結すると、従来に比べて受胎率が向上する（表3）。

[成果の活用面・留意点]

- 1 体外受精胚作出機関において利用できる。

[具体的データ]

表1 培養液中のグルコース濃度の違いが胚の発生率に及ぼす影響 (平成 8~10年)

培養液	グルコース濃度(mM)	供試胚数	発生数	発生率(%)
199	5.56	841	322	38.3 ^a
199(1/2G)	2.78	694	351	50.6 ^b

- 注) ①体外受精後、199(グルコース不含:0G)で培養を開始し、培養2日目で4細胞以上に発育した胚を培養3日目に各培養液へ移して培養を継続した。
 ②胚発生数は培養7日目で胚盤胞、8日目で拡張胚盤胞、9日目で脱出胚盤胞に達した胚の総数。
 ③気相条件は3%CO₂、10%O₂、87%N₂、38.5℃。
 ④符号a、b間に1%の危険率で有意差あり(χ²検定)。

表2 凍結液の糖の種類が融解後の胚の生存性に及ぼす影響 (平成 8~10年)

糖の種類	供試胚数	融解後の生存性	
		生存数(%)	脱出数(%)
トリアコース	80	57(71.3) ^a	44(55.0)
シュクロース	52	45(86.5) ^b	35(67.3)

- 注) ①供試胚は培養3日目から199(1/2G)で培養し、7日目に凍結。
 ②凍結液は20%子牛血清,10%イソレック'リコ-ル添加D-PBS。添加した糖の濃度はそれぞれ0.1M。
 ③凍結胚は融解後、20%牛胎子血清、βメルカプトエタノ-ル添加TCM199で、4日目まで生存数、脱出数について観察。
 ④気相条件は3%CO₂、10%O₂、87%N₂、38.5℃。
 ⑤符号a、b間に5%の危険率で有意差あり(χ²検定)。

表3 シュクロースを添加した凍結液で凍結した胚の受胎率 (平成10年)

区	移植頭数	受胎数	受胎率(%)
試験区	11	6	54.5
参考値	86	22	25.6

- 注) ①試験区は、胚を培養3日目から199(1/2G)で培養し、凍結液0.1Mシュクロース, 20%子牛血清,10%イソレック'リコ-ル添加D-PBSで7日目に凍結。
 ②参考値は、同一移植機関での移植成績(平成10年度)。
 ③移植はダイレクト法で2胚移植。

[その他]

研究課題名: 体外受精胚の耐凍性向上のための品質強化技術の確立

予算区分: 経常

研究期間: 平成10年度(平成 8~10年)

研究担当者: 森美幸、笠正二郎、上田修二

発表論文等: 平成 8~10年度畜産関係試験成績書