

無血清培地と血清添加培地を組み合わせた牛生体採取卵子の良質胚生産率向上					
[要約] 生体採取した牛卵子を用い効率よく良質胚を生産するには、体外成熟、発生1日までは無血清培地 (IVMD101) で培養し、発生3日または5日まではグルコースを含まない血清添加199培地、その後は血清添加199培地で培養する。					
担当部署	畜産研究所・大家畜部・畜産工学研究室 肉用牛研究室			連絡先	092-925-5232
対象作物	肉用牛・乳用牛	専門項目	繁殖	成果分類	技術改良

[背景・ねらい]

牛の体内胚採取技術とともに、近年、超音波診断装置を利用して経膈的に生体から卵子を採取し、体外受精して胚を生産する試みがなされており、体外胚を生産する培養キットも市販されている。しかし、と畜場由来の卵巣卵子（と畜卵子）と比較して、少数の生体採取卵子を体外培養すると一般的に胚発生率（生産率）が低い。そのため、現場段階において生体卵子採取技術が利用される場面は少なく、過排卵処置に反応しない遺伝的に価値の高いドナーの産子生産に限られているのが現状である。

そこで、生体から採取した少数の卵子を用いても、と畜卵子の集合培養と同様に効率的に体外胚を生産するため、当場の体外発生技術に無血清培地 (IVMD101) を組み合わせて、良質で高い発生率の体外胚生産システムを確立する。（要望機関名：北九州家保 (H9)）

[成果の内容・特徴]

1. 培地選択とその組み合わせのスクリーニング試験として、と畜卵子を用いて、胚発生を調査した。その結果、体外成熟から発生1日までは無血清培地を用い、その後、発生3日または5日まではグルコースを含まない血清添加199培地で、その後は血清添加199培地で培養することにより、高い胚発生率（26%）と良質胚率（16%）が得られる（表1）。
2. 生体から採取する少数卵子は、体外成熟から発生1日までは無血清培地を用い、発生3日または5日まではグルコースを含まない血清添加199培地で、その後は血清添加199培地で培養すると良質胚（良質胚率：19%）を効率的に生産できる（表2）。

[成果の活用面・留意点]

1. 胚移植機関で、生体採取卵子から体外胚を効率的に生産する技術として活用できる。
2. 本体外胚生産システムは同一気相条件で可能なため、一台の培養器で済み、経済的である。

[ 具体的データ ]

表1 培地の組み合わせがと畜卵子の胚発生に及ぼす影響 (平成11年～13年)

試験区	培地				卵子数 (平均)	胚発生率 (%)		
	成熟	発生1 (D0~D1)	発生2 (D1~D3orD5)	発生3 (D3orD5~D9)		分割	発生	良質
A	体	—————▶	—————▶	—————▶	45	82 <sup>a</sup>	21	8
B	外	—————▶	—————▶	-----▶	54	89 <sup>a</sup>	11 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
C		—————▶	.....▶	-----▶	48	69 <sup>d</sup>	26 <sup>b</sup>	16 <sup>c</sup>
D	受	—————▶	.....▶	-----▶	45	67 <sup>bb</sup>	13 <sup>a</sup>	6 <sup>d</sup>
E (常法)	精	-----▶	.....▶	-----▶	36	69 <sup>d</sup>	28	11 <sup>b</sup>

- 注) 1. —————▶ : 無血清培地IVMD101  
 2. -----▶ : 5%牛胎子血清添加TCM199  
 3. .....▶ : 10%牛胎子血清添加グルコース不含TCM199  
 4. -----▶ : 10%牛胎子血清添加TCM199  
 5. 分割: 発生2日までに2細胞以上へ分割した胚の割合  
 6. 発生: 発生9日までに胚盤胞期以降へ発生した胚の割合  
 7. 良質: 発生8日までに胚盤胞期以降へ発生し形態的に良質な胚の割合  
 8. 成熟: 体外成熟20~24時間  
 9. 発生1: 体外受精完了~1日 (D0~D1)  
 10. 発生2: 発生1日~3または5日 (D1~D3orD5)  
 11. 発生3: 発生3または5日~9日 (D3orD5~D9)  
 12. 気相条件: 3%CO<sub>2</sub>、10%O<sub>2</sub>、87%N<sub>2</sub>、38.5  
 13. 供試卵子: 細胞質に異常がなく、卵丘細胞が付着している卵子  
 14. 同一系列内異符号間で有意差あり (a-b.c-d:p<0.05, A-B:p<0.01)

表2 生体採取卵子の体外胚発生 (平成11年～13年)

試験区	培地				胚発生率 (%)		
	成熟	発生1 (D0~D1)	発生2 (D1~D3orD5)	発生3 (D3orD5~D9)	分割	発生	良質
A	体	—————▶	—————▶	—————▶	84 <sup>A</sup>	25	7
C	外	—————▶	.....▶	-----▶	74 <sup>A</sup>	28	19
E	受	-----▶	.....▶	-----▶	42 <sup>B</sup>	18	12

- 注) 1.~14.は表1と同じ  
 15. 供試牛および卵子: 黒毛和種経産牛 (供試卵子数: 平均5卵子/試験)  
 16. 培養皿: リプロC1プレート  
 17. 卵子採取超音波装置: 周波数5.0MHz コンバックスタイプ探触子 吸引圧60~100mmHg

[ その他 ]

研究課題名: 超音波診断装置を利用した効率的胚生産技術の確立

予算区分: 事業 (畜産振興総合対策)

研究期間: 平成13年度 (平成11~13年)

研究担当者: 笠正二郎、森美幸、上田修二、磯崎良寛、古賀鉄也、平嶋善典、稲田淳

発表論文等: 平成11~13年度畜産関係試験成績書