

牛体外受精胚の少数培養での栄養膜小胞との共培養による胚発生率向上					
[要約]牛体外受精胚を少数培養する場合、TCM199にビタミンを添加した培養液を用いて栄養膜小胞と共培養することにより、胚の発生率、良質胚率が向上する。					
担当部署	家畜部・畜産工学チーム			連絡先	092-925-5232
対象作目	乳用牛・肉用牛	専門項目	バイオテック	成果分類	技術改良

[背景・ねらい]

経膣採卵で採取された卵子からの胚生産システムは確立されたが（平成13年度成果）、卵子培養過程において、胚の数が少なくなるほど胚の発生率が低いという問題がある。経膣採卵で採取される卵子が3個以下である場合が全体の3割程度を占めることから、少数培養での胚発生率の向上が望まれる。一方、初期胚由来の細胞からなる栄養膜小胞は、妊娠認識物質を含め数種の因子を分泌することから、発生初期の胚と共培養することで胚発生を促進できる可能性がある。しかし、共培養のため栄養膜小胞を胚の発生培養用の培養液で培養すると小胞の発育が悪いことから、胚と栄養膜小胞の共培養に適した培養液への改善が必要である。そこで、栄養膜小胞と胚との共培養法を確立し、少数培養での胚の発生率の向上を図る。（要望機関名：畜産課（H10））

[成果の内容・特徴]

- 1．胚と共培養する目的でTCM199を用いて栄養膜小胞を培養しても、小胞面積の増加は殆ど認められずRPMI1640に比べて発育状況は悪いが、TCM199にビタミンを添加して培養することにより小胞面積は増加し、栄養膜小胞の発育を改善することが可能となる（表1）。
- 2．体外受精胚を1個培養する場合、受精後3日目からビタミンを添加したTCM199を用いて栄養膜小胞と共培養することにより、卵丘細胞との共培養や他の培養液で栄養膜小胞と共培養する場合と比較して発生胚率および良質胚率が高くなる（表2）。
- 3．発生した胚の凍結融解後の生存率に差は認められないことから（表3）、結果的にビタミンを添加したTCM199培養液で栄養膜小胞と共培養する方法が良質な胚を最も多く生産する（表2）。

[成果の活用面・留意点]

- 1．経膣採卵で採取卵子数が少ない場合において利用できる。
- 2．共培養に用いる栄養膜小胞は、20日齢前後の細胞増殖の盛んなものを使うのが望ましい。
- 3．栄養膜小胞と共培養する際には2日に1度培地交換を行う。

[具体的データ]

表 1 培養液の違いによる栄養膜小胞の発育状況 (平成13年)

培養液	小胞面積 mm^2	
	14日齢	21日齢
TCM199+ビタミン	2.45 ± 1.63	10.64 ± 6.30
TCM199	2.13 ± 2.08	3.94 ± 2.80
RPMI1640	3.71 ± 2.30	13.54 ± 9.68

- 注) 1. 栄養膜小胞：体外受精由来脱出胚盤胞 (受精後9日目) を各試験区の培養液で体外培養
 2. 各試験区の培養液には10% FCS, 100 μM MEを添加
 3. ビタミン：MEM ビタミン溶液* ($\times 100$) を10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 添加
 (* 組成：ビタミン B_1, B_2, B_4, B_6, B_c 他ビタミンB複合体が含まれる)
 4. 小胞面積：供試した脱出胚盤胞1個から発育した栄養膜小胞の面積 (平均値 \pm 標準偏差)

表 2 体外受精胚の1個培養での胚発生状況 (平成13~14年)

試験区		受精後7~8日目		
共培養	培養液	供試胚数	発生胚数 (%)	良質胚数 (%)
小胞	TCM199+ビタミン	45	36 (80) ^a	30 (67) ^a
小胞	TCM199	44	31 (70) ^{a c}	24 (55) ^{a c}
小胞	RPMI1640	44	16 (36) ^b	8 (18) ^b
卵丘	TCM199	45	25 (56) ^{b c}	19 (42) ^c

- 注) 1. 供試胚：体外受精後2日目で8細胞に達している胚で統一
 2. 共培養 小胞：供試胚1個 + 栄養膜小胞2~4個 / 培養液200 μl
 3. 共培養 卵丘：供試胚1個 + 卵丘細胞 / 培養液100 μl
 4. 発生胚：拡張胚盤胞に達した胚
 5. 良質胚：発生胚のうち内部細胞塊が明瞭な胚
 6. 各項目において異符号間に有意差あり ($p < 0.05$, ² 検定)

表 3 凍結融解後の胚の生存性 (平成14年)

試験区		供試胚数	48時間後 生存胚数 (%)
共培養	培養液		
小胞	TCM199+ビタミン	24	20 (83)
小胞	TCM199	21	16 (76)
小胞	RPMI1640	6	5 (83)
卵丘	TCM199	14	10 (71)

- 注) 1. 供試胚：各試験区で受精後7~8日目に発育した良質胚
 2. 凍結法：凍結液 (10% EG, 0.1M Suc, 20% FCS 添加 PBS) を用い、緩慢凍結
 (室温 - (-1 /分) -7 (10分保持、植氷) (-0.3 /分) -30 LN)
 3. 生存胚：融解後、凍結時の発育ステージ (拡張胚盤胞) 以降まで発育した胚

[その他]

研究課題名：乳牛胚の大量生産技術の確立
 予算区分：県特 (スーパー乳牛)
 研究期間：平成14年度 (平成13、14年)
 研究担当者：森 美幸、笠 正二郎、上田修二
 発表論文等：平成13、14年度畜産関係成績書