

## 19. 無血清発生培地で生産したウシ体外胚の品質および耐凍性の検討

農林水産研究指導センター 畜産研究部 肉用牛・酪農チーム

○安達聡・渡邊竜二・佐藤恭二・(病鑑) 藤田達男

### 【目的】

ウシ体外受精胚の発生培養には血清添加培地が多く用いられているが、血清にはロット間での胚生産効率の差異や病原体伝搬のリスクがあり、また、生産された胚は脂肪の含有量が多く体内受精胚と比較して凍結融解後の移植で低受胎となる等の課題があることから、安全で良品質な胚を安定して生産可能な化学的組成の明らかな培養液の開発が求められている。これまでに無血清発生培地 PVA-SOFaa に上皮成長因子 (EGF)、インスリン様成長因子- I (IGF-I)、トランスフェリン (Tf)、セレン (Se) を同時添加し、さらに発生培養開始後 6 日目にグルコース (Glu) を添加することで良好な胚の発生成績が得られている。今回、本培養系で生産された胚の品質および耐凍性について報告する。

### 【材料および方法】

試験 1 は食肉処理場由来卵巣から、試験 2 は経膈採卵により生体卵巣から回収した卵丘細胞卵子複合体を用いた。成熟培養は 0.02AU/ml FSH, 1 $\mu$ g/ml Estradiol-17 $\beta$ , 0.2mM ピルビン酸, 5%FCS 添加 TCM-199 で 20 ~ 22 時間, 媒精は牛体外受精用媒性液 IVF100 (機能性ペプチド研究所) で 6 時間 (精子濃度 5.0 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml), いずれも 38.5 °C, 5%CO<sub>2</sub> in air 気相下で実施した。その後、卵丘細胞を除去し、発生培養は SOFaa を基礎培地として 1mg/ml PVA と 100ng/ml EGF, 50ng/ml IGF-I, 5 $\mu$ g/ml Tf, 5ng/ml Se を添加した (EITS) 区, EITS 区に発生培養開始後 6 日目に 4.0mM Glu を添加した (EITS + G) 区, 5%FCS を添加した (FCS) 区に分け, 38.5 °C, 90%N<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>, 5%O<sub>2</sub> 気相下で実施した。

試験 1 で生産された胚盤胞期胚は、Sudan IV により染色して細胞内脂肪滴数を計数した。また、10%グリセリン+ 0.25M スクロース添加保存液で緩慢凍結し、融解後 20%FCS 添加 SOFaa で 72 時間培養して胚の生存率、透明帯脱出率を調査した。

試験 2 で生産された胚盤胞期胚は、同法で凍結・融解後、ダイレクト移植し受胎率を調査した。

### 【結果および考察】

試験 1 : 1 胚あたりの細胞内脂肪滴数は、5 $\mu$ m 以上の大脂肪滴数において EITS 区 (16.4  $\pm$  6.2), EITS + G 区 (18.3  $\pm$  2.9) が FCS 区 (31.6  $\pm$  3.9) よりも有意に少なかった。また、凍結・融解後の生存胚率及び脱出胚率は EITS 区 (85.7%及び 81.0%), EITS + G 区 (81.3%及び 56.3%) が FCS 区 (44.4%及び 22.2%) よりも有意に高かった。

試験 2 : 凍結胚移植での受胎率は EITS 区 62.5% (5/8), EITS + G 区 66.7% (4/6), FCS 区 33.3% (2/6) であり、無血清培養区で受胎率 60%以上の良好な成績が得られた。

以上の結果から、PVA-SOFaa に EGF, IGF-I, Tf, Se, Glu を添加した無血清発生培地を用いて生産された胚は、細胞内への脂肪滴の蓄積が抑えられたため耐凍性が向上し、受胎率向上につながったと推察され、今後の経膈採卵-体外受精技術に応用可能である。