

[成果情報名] ロウソク培養技術を応用した卵子の成熟培養

[要約] と畜場施設内の炭酸ガス培養器のない状況下で、ロウソク培養法により成熟培養した卵子を用いて体外胚を生産することで、炭酸ガス培養器内で成熟培養した卵子と同等の胚盤胞発生率を得ることができる。

[キーワード] ロウソク培養、卵子成熟培養、体外受精

[担当] 三重科技セ・畜産研究部・家畜改良繁殖グループ

[連絡先] 電話 0598-42-2194、電子メール shimah01@pref.mie.jp

[区分] 関東東海北陸農業・畜産草地

[分類] 技術・参考

[背景・ねらい]

平成 13 年度の牛海綿状脳症 (BSE) 発生以降その防疫対策が強化され、BSE 検査結果が出るまでは、と畜場施設外へ卵巣を持ち出すことができなくなった。生存性の高い卵子を確保するためには、採材直後の卵巣からできるだけ早く卵子を吸引する必要がある、そのためにはと畜場施設内で卵子成熟培養を行う必要がある。しかし、一般のと畜場施設内には炭酸ガス培養器は無く、また、卵巣からの卵子吸引採取や成熟培養等の操作を行うためのスペースを確保することも難しい。そこで、表-1 に示すとおり、温度調節機能を備えた小型の保温機と気密性を保つことが可能な密封容器を使用し、机 1 基程のスペースで一連の操作ができる簡易な卵子成熟培養技術について検討する。

なお、ロウソク培養法とは密封容器内でロウソクを燃焼させることで、容器内の酸素濃度を減少させ、かつ、二酸化炭素濃度が上昇した気相条件を作り出す方法で、微好気性細菌の培養技術として利用されている (表 1)。

[成果の内容・特徴]

1. 媒精終了後に第一極体を確認できた卵子 (以下、「成熟卵子」) の割合は、表-2 に示すとおり 60.5 ~ 88.6% の間で推移し、平均 75.4% (775/1,028 個) である (表 2)。
2. 媒精 64 時間後の卵子分割率は 61.2 ~ 75.9 % で推移し、平均 66.6% (685/1,028 個) である。
3. 胚盤胞への発生率は表-3 に示すとおり 31.6 ~ 40.0 % で推移し、平均 34.4% (354/1,028 個) である (表 3)。
また、媒精終了後に第一極体を確認できた卵子の体外胚への発生成績では、分割率は 77.3 % (599/775 個)、胚盤胞への発生率は 40.6 % (315/775 個) である。
4. 炭酸ガス培養器を使用した場合と同等の、卵子の成熟率と媒精後の胚盤胞発生率が得られ、簡易的な卵子成熟培養法として利用できる。

[成果の活用面・留意点]

1. 炭酸ガス培養器を用いる必要がないため、約 38℃ の温度管理ができる器具があれば、と畜場施設内の僅かなスペースを利用して卵子の成熟培養が可能である。
2. 卵巣採材場所が遠方の場合、採材現場で卵子の吸引採取から成熟培養開始までの操作を行うことで、採取直後の良好な卵子が確保できるとともに、移動時間の有効活用も可能になる。
3. 密封容器内でのロウソクを燃焼させる高さにより、ロウソクの燃焼時間が変化し、容器内の気相条件が異なるため、ロウソクはできるだけ低い位置で燃焼させることが望ましい。

[具体的データ]

表-1 ロウソク培養の概要

卵子成熟培地:10%子牛血清加M-199

培養方法:

- ①密封容器の底に紙を敷き、蒸留水で十分湿らせる
- ②卵子を入れた四穴シャーレを湿らせた紙の上に置く
- ③四穴シャーレの上部でロウソクを燃焼させ、密封容器の蓋を閉める
- ④密封容器を小型の保温機に入れて成熟培養を開始

(参考)・成熟培養温度は39°Cに設定

・密封容器内の酸素濃度は約14.7%、二酸化炭素濃度は約2.2%

表-2 ロウソク培養による卵子の成熟成績

試験実施回数	培養卵子数	成熟卵子数	成熟率(%)
1	116	96	82.8%
2	137	100	73.0%
3	116	79	68.1%
4	136	115	84.6%
5	167	101	60.5%
6	247	190	76.9%
7	65	55	84.6%
8	44	39	88.6%
合計	1,028	775	75.4%

表-3 ロウソク培養卵子の体外胚発生成績

試験実施回数	培養卵子数	胚盤胞発生数	発生率(%)
1	116	39	33.6%
2	137	52	38.0%
3	116	42	36.2%
4	136	45	33.1%
5	167	55	32.9%
6	247	78	31.6%
7	65	26	40.0%
8	44	17	38.6%
合計	1,028	354	34.4%

* 胚盤胞発生数:媒精日を0日として7日目に発生した胚盤胞のうち肉眼的に良好な胚と、これ以外で10日目までに脱出胚盤胞に発生したもの

[その他]

研究課題名:肉用牛増産技術開発事業

予算区分:県単

研究期間:1998～2002年度

研究担当者:島田浩明、水谷将也、余谷行義

発表論文等:

1)島田・水谷・余谷(2003)日本胚移植研究会大会講演要旨:55