

牛個別体外受精における有効な発生培養液							
[要約] 牛個別体外受精後の発生培養にm-SOFやCR1aaを用いることにより、TCM199よりも高い胚盤胞の発生率が得られる。その胚を凍結しても生存性に問題はない。胚の初期発生を阻害するとされるグルコースは、濃度が低いほど胚盤胞の発生率が高くなる。							
三重県農業技術センター畜産部・大家畜担当 家畜改良繁殖担当				連絡先		TEL 05984-2-2029	
部会名	畜産・草地	専門	繁殖	対象	家畜類	分類	指導

[背景・ねらい]

牛個別体外受精によって優良雌牛由来の良質胚を効率的に生産するために、従来より使用されてきた培養液TCM199に代わって、合成卵管液(m-SOF)やCR1aaを体外受精後の発生培養に使用し、胚盤胞発生率が向上するかどうかの検討を行った。また、m-SOF、CR1aaで作成した胚の品質を調べるために、胚の耐凍性や細胞数も併せて検討した。

[成果の内容・特徴]

1. 体外受精後、m-SOF、CR1aaで培養したところ、胚盤胞の発生率はそれぞれ48.6%と43.4%であり、TCM199の19.6%と比べ有意に高い胚盤胞発生率を得た(表1)。
2. m-SOF、CR1aaから得られた胚を1.5Mエチレングリコールまたは1.4Mグリセリンを用いて凍結後・融解したところ、両耐凍剤ともに、m-SOFの生存率は、6日目胚・7日目胚が高く、CR1aaでは7日目胚が高かった。このことから、この時期の胚が凍結に適していることがわかった(表2)。胚の細胞数については、m-SOF、CR1aa、TCM199それぞれ胚盤胞で98、91、104、拡張胚盤胞が141、141、144であり、統計的な有意差はなかった(表3)。
3. m-SOF中のグルコース濃度が胚の発生におよぼす影響を調べたところ、グルコース濃度が1.5M、0.5M、0.1M、0Mと低いほど、2細胞以上の胚への分割率が74%から88%へと向上し、胚盤胞への発生率も32%から59%へと向上することが明らかとなった(表4)。

[成果の活用面・留意点]

1. 県単独の和牛受精卵供給体制事業において体外受精胚の生産に活用。
2. 将来、クローン胚の培養に利用。

[具体的データ]

表 1 培養液の種類別発生成績

区分	培養卵数	分割卵数	分割率	胚盤胞数	胚盤胞発生率
m-SOF	1026	829	80.8	499	48.6 ^a
CR1aa	447	378	84.6	194	43.4 ^b
TCM199	1216	865	71.1	238	19.6 ^c

a c : **、b c : *

表 2 凍結・融解成績

耐凍剤の種類	区分	胚の日齢	1.5M エチレングリコール		1.4M グリセリン	
			生存率	脱出胚率	生存率	脱出胚率
m-SOF		6日目	85.7(18/21)	28.6(6/21)	81.8(18/22)	45.5(10/22)
		7日目	92.3(12/13)	53.8(7/13)	87.5(14/16)	62.5(10/16)
		8日目	35.9(14/39)	25.6(10/39)	46.7(7/15)	13.3(2/15)
CR1aa		6日目	66.7(2/3)	33.3(1/3)	75.0(3/4)	25.0(1/4)
		7日目	91.6(11/12)	41.7(5/12)	100.0(6/6)	66.7(4/6)
		8日目	59.3(16/27)	18.5(5/27)	63.6(7/11)	27.3(3/11)

表 3 細胞数 (7日目胚)

区分	胚盤胞		拡張胚盤胞	
	胚数	細胞数	胚数	細胞数
m-SOF	4	98.3	5	140.8
CR1aa	4	91.5	2	141.0
TCM199	4	104.0	4	143.5

表 4 培養液のグルコース濃度別発生成績

グルコース濃度(mM)	培養卵数	分割卵数	分割率	胚盤胞数	胚盤胞発生率
1.5	122	95	73.6	41	31.8
0.5	109	82	75.2	43	39.4
0.1	213	180	84.5	109	51.2
0.0	391	342	87.5	232	59.3

[その他]

研究課題名：牛胚の効率的生産技術に関する研究
 予算区分：県単
 研究期間：平成9年度(平成8~10年)
 研究担当者：榊原秀夫、西康裕、余谷行義
 発表論文等：牛体外受精胚の体外培養におけるSOFの適用、日本胚移植学雑誌、Vol.18, No.2, 132-138, (1996-5).
 SOFを用いた牛個別体外受精、第11回東日本家畜受精卵移植研究会講演要旨、1996.
 発生培養にm-SOF、CR1aaを用いた牛個別体外受精、第7回西日本胚移植研究会講演要旨、1996.