

## 2 1 . 酪農生産基盤強化に向けた 黒毛和種体外受精卵生産技術の確立

農林水産研究指導センター畜産研究部 宇佐家畜保健衛生所<sup>1)</sup>  
○久々宮萌果 澤野貴之<sup>1)</sup> 松井英徳 (病鑑) 藤田達男

### 【背景および目的】

近年、県内酪農家戸数は約 150 戸まで減少し、県内乳用牛の頭数も減少が続くといったようにおおい酪農は危機的状況に陥っており、この状況に対して、乳牛への黒毛和種体外受精卵移植技術の普及拡大に取り組むことは酪農家における所得向上対策として有効と考えられる。しかし、体外培養条件が体内での胚の発生環境と異なることから、牛の体外胚は体内胚と比べて胚の品質が低下し、受胎率が低いという課題がある<sup>1)</sup>。これらの問題点を解決するために、Takahashi らは L-カルニチン (Cal) を、森らはリファンピン (Rif) を血清添加培地に添加することにより胚の耐凍性向上に成功している<sup>2,3)</sup>。これは、Cal には脂肪代謝を促進することにより細胞内脂肪を減少させる効果、Rif には P 糖タンパクを過剰発現させることにより代謝物排出機能を強化する効果があるためだと考えられている。今回、これらの報告を利用して、耐凍性の高い胚生産が可能な無血清培地への Cal または Rif の添加により、さらに生産される胚の耐凍性が向上するのではないかと推測した。そこで今回、無血清培地への Cal または Rif の添加による効果を検討したので報告する。

### 【材料および方法】

食肉処理場から採取した黒毛和種の卵巣 291 個より回収した卵丘細胞卵子複合体を用いた。成熟培養は、0.02 AU/ml FSH、1 µg/ml Estradiol-17β、0.2 mM ピルビン酸、100 U/ml ペニシリン G、100 µg/ml ストレプトマイシン、5%FCS 添加 TCM-199 を成熟培養液として 20 ~ 22 時間成熟培養し、IVF100 (機能性ペプチド研究所) を媒精液として黒毛和種「隆誉」の精液を精子濃度 1×10<sup>7</sup>/ml に調整し、6 時間媒精した。成熟培養、媒精ともに 38.5 °C、5%CO<sub>2</sub> in air、湿潤の条件下で実施した。その後、卵丘細胞を除去して、5 つの試験区を設定して 38.5 °C、5%CO<sub>2</sub> 5%O<sub>2</sub> in air、湿潤の条件下で発生培養を行った (図 1)。血清添加区の発

図 1 発生培養の試験区設定

■ 血清添加区

 血清添加培地

■ 無血清区

 無血清培地


■ 無血清+Cal 区

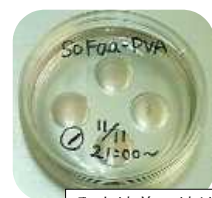
 無血清培地 + カルニチン (0.6mg/ml)

■ 無血清+Rif 区

 無血清培地 + リファンピン (10µM)

■ 無血清+Cal+Rif 区

 無血清培地 + カルニチン (0.6mg/ml) + リファンピン (10µM)



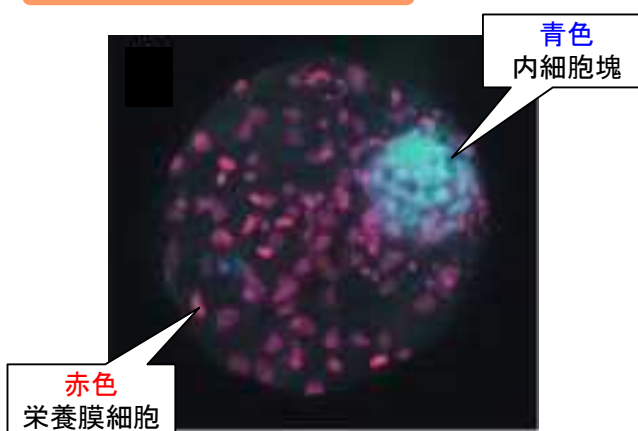
発生培養の培地

生培養液は mSOF を基礎培地として 2%BME、1%MEM、5%FCS を添加した。無血清区の発生培養液は mSOF を基礎培地として 2%BME、1%MEM、1 mg/ml PVA、100 ng/ml EGF、50 ng/ml IGF- I、5 µg/ml Tf、5 ng/ml Se を加え、発生培養開始後 6 日目に 4.0mM Glu を添加した。また、3～5 区については、無血清区と同じ発生培養液を用いるが、発生培養開始後 6 日目に 4.0mM Glu を添加する際に同時に 0.6mg/ml Cal を添加した無血清 + Cal 区、10µM Rif を添加した無血清 + Rif 区、0.6mg/ml Cal と 10µM Rif の両方を添加した無血清 + Cal + Rif 区とした。

今回、試験 1 では、無血清培地への Cal または Rif の添加による効果を検討するために、各試験区において分割率、媒精 8 日後の胚盤胞発生率、拡張胚盤胞の細胞数（血清添加区、無血清区、無血清 + Cal 区のみ）を調査した。また、緩慢凍結した拡張胚盤胞を融解後に培養し、胚の生存率及び透明帯脱出率を調査した。なお、拡張胚盤胞の細胞数は、de la Fuente ら<sup>4)</sup>による二重染色法を用い、内細胞塊と栄養膜細胞をそれぞれ青色と赤色に染めることにより測定を行った（図 2）。

試験 2 では、生産された体外胚の移植試験を行った。県内酪農家 4 戸で飼養されている乳牛 77 頭を供試牛、1～5 区の新鮮卵又は凍結卵を供試卵として移植を行い、受胎率及び分娩成績を調査した。

図 2 拡張胚盤胞の二重染色



## 【結果】

### 試験 1

体外受精卵生産時の分割率及び胚盤胞発生率については、各試験区間で有意差は認められなかった。しかし、無血清 + Cal + Rif 区で分割率が最も高値となり、血清添加区で胚盤胞発生率が最も高値となった（表 1）。

表 1 分割率及び媒精 8 日後の胚盤胞発生率

試験区	供試卵子数	分割率(数)	胚盤胞発生率(数)
血清添加	462	80.3 (371)	42.6 (197)
無血清	410	78.5 (323)	37.5 (154)
無血清 + Cal	364	80.2 (292)	37.3 (136)
無血清 + Rif	197	80.7 (159)	40.1 (79)
無血清 + Cal + Rif	146	85.6 (125)	41.0 (60)

拡張胚盤胞の細胞数については、血清添加区、無血清区、無血清 + Cal 区の各試験区間で内細胞塊、栄養膜細胞及び総細胞数に有意差は認められなかった。しかし、血清添加区で内細胞塊及び総細胞数が最も高値となり、無血清 + Cal 区で栄養膜細胞が

最も高値となった（表2）。

**表2 拡張胚盤胞の細胞数**

試験区	供試胚数	内細胞塊	栄養膜細胞	総細胞数
血清添加	7	36.5±0.9	79.0±1.9	115.5±2.3
無血清	3	30.6±1.7	76.3±2.0	107.0±3.0
無血清+Cal	3	35.0±2.3	79.3±1.4	114.3±2.1

注) mean±SEM

凍結融解 48 時間後の胚生存率は、血清添加区に比較して無血清区に添加剤を加えた3つの区（無血清+Cal、無血清+Rif、無血清+Cal+Rif）で有意に高値であった。また、無血清区と比較した場合には、有意差は認められなかったが、無血清区に添加剤を利用した3つの区でより高値であった。次に、凍結融解 48 時間後の透明帯脱出率は、血清添加区に比較して無血清を利用した4つの区（無血清、無血清+Cal、無血清+Rif、無血清+Cal+Rif）で有意に高値であった。また、無血清区と比較した場合には、有意差は認められなかったが、無血清区に添加剤を利用した3つの区でより高値であった（表3）。

**表3 凍結融解48時間後の胚生存率及び透明帯脱出率**

試験区	供試胚数	胚生存率(数)	透明帯脱出胚率(数)
血清添加	66	65.1 (43) a	53.0 (35) a
無血清	59	77.9 (46)	71.1 (42) b
無血清+Cal	50	86.0 (43) b	78.0 (39) b
無血清+Rif	29	89.6 (26) b	79.3 (23) b
無血清+Cal+Rif	32	87.5 (28) b	81.2 (26) b

注) 同列異符号間に有意差あり(p < 0.05)

#### 試験 2

新鮮卵移植の受胎率は、血清添加区で18頭中4頭受胎の22.2%、無血清を利用した4つの区（無血清、無血清+Cal、無血清+Rif、無血清+Cal+Rif）で25頭中4頭受胎の16.0%であった。また、凍結卵移植の受胎率は、血清添加区で7頭中0頭受胎の0%、無血清を利用した4つの区で27頭中3頭受胎の11.1%であった（表4）。

**表4 新鮮卵及び凍結卵移植の受胎率**

試験区	新鮮卵			凍結卵		
	移植頭数	受胎頭数	受胎率	移植頭数	受胎頭数	受胎率
血清添加	18	4	22.2	7	0	0
無血清利用区	25	4	16.0	27	3	11.1

注) 無血清利用区: 無血清、無血清+Cal、無血清+Rif、無血清+Cal+Rifの4つの試験区

新鮮卵及び凍結卵移植により受胎した11頭は全て経産牛であり、H28年10月までで11頭中4頭が正常分娩、3頭が流産、4頭が妊娠中であった（表5）。正常分娩された産子4頭のうち3頭が雌、1頭が雄であった。

**表5 分娩成績**

試験区	正常分娩頭数	流産頭数	現在妊娠中の頭数
血清添加	2	2	0
無血清利用区	2	1	4

注)無血清利用区:無血清、無血清+Cal、無血清+Rif、無血清+Cal+Rifの4つの試験区

### 【考察】

無血清培地への Cal や Rif の添加による効果を検討したところ、試験 1 より、添加剤を利用した区では添加剤未使用の区と比較して、有意差はなかったものの胚の耐凍性向上が認められた。このことから、血清添加培地だけでなく、耐凍性が高い胚の生産が可能である無血清培地においても、添加剤の使用によりさらなる耐凍性向上が期待できるということが示唆された。

発生率や細胞数については、無血清利用区で生産された胚は血清添加区のものより有意差はなかったものの劣り、耐凍性については有意に優れる結果となった。また、試験 2 の受胎率については、無血清利用区は血清添加区と比較して新鮮卵移植ではより低値となり、凍結卵移植ではより高値となった。これらの結果については、血清添加培地では糖や蛋白、細胞性因子などの多種多量な物質が含まれているために胚は良好な発生を示すが、血清に含まれる脂肪が胚に多量に蓄積されることで無血清培地で生産された胚と比較して耐凍性は低下すると報告されており<sup>5,6)</sup>、これらが原因となりこのような結果となったと考えられる。

今回、Cal や Rif を無血清培地へ添加することで胚の耐凍性向上が認められたが、無血清培地では、発生率や細胞数において依然血清添加培地に劣るといった傾向にあった。今後は、血清添加培地への添加剤も検討し、各調査においてさらに例数を重ね検討していき、高品質な体外胚生産を可能とする発生培養方法の確立を図りたい。

### 【参考文献】

- 1) 松本光晴, 音井威重, 鈴木達行. 修正合成卵管液 (m-SOF) に添加した乳酸とグルコースが牛体外受精胚の発生に及ぼす効果. *J. Mamm. Ova Res.*, 16: 73-76. 1999.
- 2) Takahashi, T., Inaba, Y., Somfai, T., Kaneba, M., Geshi, M., Nagai, T. and Manabe, N. Supplementation of culture medium with L-carnitine improves development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*, 25: 589-599. 2013.
- 3) 森美幸, 笠正二郎, 山口昇一郎, 磯崎良寛, 上田修二, 服部眞彰. 第 104 回日本繁殖生物学会大会, セッション ID: OR1-6. 2011.
- 4) de la Fuente, R., King, W. A. Use of chemically defined system for the direct comparison of inner cell mass and trophectoderm distribution in murine, porcine and bovine embryos. *Zygote*, 5: 309-320. 1997.
- 5) 阿部宏之, 山下祥子, 佐田竜一, 辻井弘忠, 佐藤威, 星宏良. 高品質ウシ体外受精胚生産を可能とする体外培養システム—無血清培地および血清添加培地で作出した胚の品質評価—. *Tiss. Cult. Commun.*, 19: 17-27. 2000.
- 6) 安達聡, 渡邊竜二, 佐藤恭二, 藤田達男. 経膈採卵-体外受精による高品質胚生産の検

討. 平成 23 年度大分県農林水産研究指導センター畜産研究部試験成績報告書 41. 2012.