

17. ウシ体外受精発生培養液への新鮮酵母エキス添加効果

農林水産研究指導センター畜産研究部

○三村純一郎・(病鑑) 藤田達男・内村 誠

【目的】酵母エキス (YE) は、哺乳動物株化細胞の無血清培養に利用されており、YE に含まれる特定のペプチドに細胞増殖促進効果があるといわれている (Mosser. ら、2015)。本研究では、従来の牛胎児血清添加発生培養液に YE を添加することにより、胚細胞の増殖が促進され、胚盤胞～拡張胚盤胞発生率が向上するかどうかを明らかにするとともに、耐凍性への影響について検討した。

【材料及び方法】食肉処理場由来卵巣から吸引した卵丘卵子複合体を用いた。成熟培養は $1 \mu\text{g/ml}$ Estradiol-17 β 、 0.02AU/ml FSH、 0.2mM ビルビン酸、5%FBS 添加 TCM199 で 20h 培養。媒精は本県黒毛和種雄牛精液を用い、IVF100 (機能性ペプチド研究所) で精子濃度 $5.0 \times 10^6/\text{ml}$ に調整して 6h 培養。卵丘細胞を除去し、発生培養には 5%FBS 添加 mSOFaa を用い、これに YE (新鮮酵母エキス; オリエンタル酵母工業、東京) を 0%、0.01%、0.05%、0.1% 及び 0.2% 添加した試験区 (各区供試卵子数 92~351) を設定し、 38°C 、5%CO₂、5%O₂ 湿潤下で培養。

(調査 1) 媒精日を Day0 として媒精後 48h の卵割率、Day7~Day8 の胚盤胞発生率及び拡張胚盤胞発生率を調査。

(調査 2) YE 0%区と 0.05%区の Day7 拡張胚盤胞を PI 及び Hoechst33342 で二重染色し胚の細胞数を調査。

(調査 3) 全試験区の Day7~Day8 の拡張胚盤胞を緩慢凍結 (10%Gly ダイレクト法) で凍結保存後、融解し、 0.1mM β ME、20%FBS 添加 TCM199 で 72h~96h 培養し、培養後の生存率及び脱出胚率を調査。

(統計処理) 卵割率・胚発生率、胚生存率、脱出胚率はカイ二乗検定、細胞数の比較は t 検定で実施。

【結果】調査 1 では、卵割率については試験区間に有意差は認められなかった。Day7~Day8 の胚盤胞発生率と拡張胚盤胞発生率は、順に YE 0%区が 43.9%と 38.5%、0.01%区が 52.2%と 43.5%、0.05%区が 57.1%と 47.6%、0.1%区が 50.5%と 40.3%、及び 0.2%区が 39.7%と 28.5%であり、胚盤胞発生率では 0.05%区が 0%区と 0.2%区に対して有意 ($p < 0.01$) に高値であり、拡張胚盤胞発生率では 0.05%区が 0%区 ($p < 0.05$) と 0.2%区 ($p < 0.01$) に対して有意に高値を認めた。調査 2 では、0%区及び 0.05%区の平均細胞数に有意差は認められなかった。調査 3 では、凍結融解後の胚生存率及び脱出胚率は、いずれも各試験区間に有意差は認められなかった。

以上の結果から、牛胎児血清添加発生培養液に YE を 0.05%添加することにより、耐凍性を低下させることなく、胚盤胞～拡張胚盤胞発生率を向上させることが明らかになり、ウシ体外受精発生培養液への YE 添加の有用性が示唆された。