

## 技術情報

### 体外発生培地への不飽和脂肪酸の添加が 牛体外受精胚に与える影響 ～体外受精胚の凍結・融解後の生存性の向上を目指して～

#### 1. はじめに

ウシの体外受精技術の発展により、食肉処理場由来の卵巣から採取した卵子の体外受精によって胚が多数生産され、肥育牛生産や育種改良への利用が進んできました。体外受精技術に関する研究も培養法に関する検討が盛んに行なわれ、その結果、胚発生率の飛躍的な改善も見られるようになってきています。また、近年は OPU (経膈採卵: Ovum Pick-Up) 技術の普及により、食肉処理場由来の卵巣から採取した卵子に限らず、生体の卵巣から採取された卵子を用いた胚生産の割合が増加する傾向にあります。

しかし、体外受精によって生産される胚の凍結融解後の生存性(耐凍性)は、体内受精胚に比べて低く、生産した体外受精胚を積極的に活用するためには、胚の凍結保存技術の確立が重要な要因の1つとなります。

胚の耐凍性には、体外受精胚作成時に用いる培養液の組成も影響するとされており、その一つとして不飽和脂肪酸を培養液へ添加することで胚の耐凍性を高めることが知られています。そこで今回は不飽和脂肪酸の一種であるリノール酸、オレイン酸を体外発生培地へ添加することで、胚の耐凍性に与える影響を調査したので報告します。



図1 ウシの体外受精胚(胚盤胞期胚)

#### 2. 調査の概要

##### [使用した不飽和脂肪酸について]

今回の調査では、培地中での安定性や融解性を高めるため、不飽和脂肪酸としてリノール酸を含むリノール酸アルブミン(以下 LAA)とリノール酸とオレイン酸を含むリノール酸-オレイン酸アルブミン(以下 LOA)と呼ばれる市販の試薬を用いました。

##### [調査1 LAA と LOA 添加効果]

発生培養 5 日目以降の体外発生培地(mSOFaa-5%CS)へ LAA 又は LOA を 0.25mg/ml 添加したものを 8 日目まで培養を継続しました。培養 8 日目時点で胚盤胞期になった胚を緩慢凍結法により凍結し、融解後 2、24、48 時間の生存率を調査しました(表1)。

表1 各試験区の培地組成 [調査1]

試験区	供試胚数	培地の組成		
		基本液	添加試薬	培地1mlあたりの試薬の添加(mg/ml)
無添加区	132	mSOFaa-5%CS	—	—
LAA添加区	92	mSOFaa-5%CS	LAA	0.25
LOA添加区	117	mSOFaa-5%CS	LOA	0.25

##### [調査2 LOA の添加濃度による効果]

発生培養 5 日目以降の体外発生培地(mSOFaa-5%CS)へ LOA をそれぞれ無添加、0.25、0.5、1.0mg/ml 添加し、8 日目まで培養を継続しました。培養 8 日目時点で胚盤胞期になった胚を緩慢凍結法により凍結し、融解後 2、24、48 時間の生存率を調査しました(表2)。

表2 各試験区の培地組成 [調査2]

試験区	供試胚数	培地の組成		
		基本液	添加試薬	培地1mlあたりの試薬の添加(mg/ml)
無添加区	6	mSOFaa-5%CS	—	—
0.25mg/ml添加区	12	mSOFaa-5%CS	LOA	0.25
0.5mg/ml添加区	11	mSOFaa-5%CS	LOA	0.5
1.0mg/ml添加区	5	mSOFaa-5%CS	LOA	1.0

### 3. 結果およびまとめ

[調査1]での各区の凍結融解後の胚の生存率を図2に示します。まず、2時間後では各区の生存率に有意な差は認められませんでした。24時間後では、LOA区の生存率が無添加区に対して有意に高くなりました。さらに48時間後では、LOA区がLAA区と無添加区のどちらに対しても有意に生存率が高くなっていることが分かりました。この結果より、体外発生培地へのLOA添加は、胚の凍結融解後の生存性を高めるのに有効であることが分かりました。

とで凍結融解後の胚の生存性が改善されることが分かりました。また今回の試験では、発生培地へのLOA添加時間は発生培養の後半3日間のみとして調査を行いました。今後は添加時間を変化させることによる影響も調査していきたいと思えます。これらの結果が、体外受精胚の凍結融解後の生存率の向上や利用増加につながればと思います。

(酪農肉牛課 西村主任研究員)

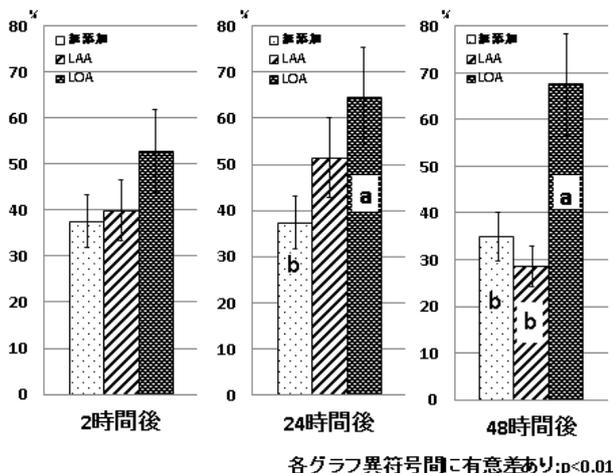


図2 各区の凍結融解後の胚の生存率 [調査1]

[調査2]での各区の凍結融解後の胚の生存率を図3に示します。今回の調査では2、24、48時間のいずれもLOA添加区が無添加区に比べて生存率が高い傾向を示しました。しかし、LOAの添加濃度による生存性への影響は認められませんでした。

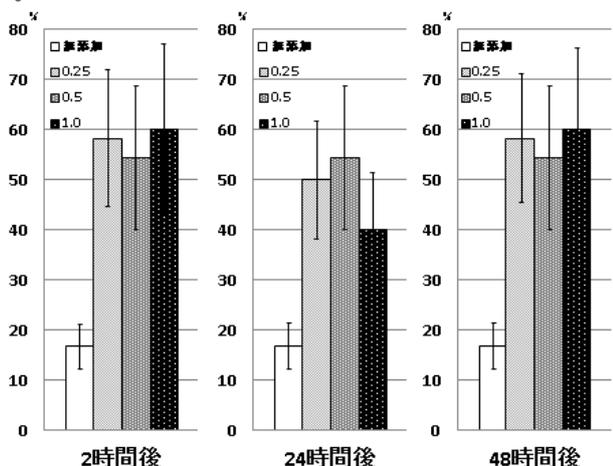


図3 各区の凍結融解後の胚の生存率 [調査2]

### 4. おわりに

今回の調査結果から、体外発生培地へリノール酸-オレイン酸アルブミン (LOA) を添加するこ