平成12年度試験研究成果

区 分	研究	題　名	ウシ核移植再構築胚における体外培養系の比較

〔要約〕
　ウシ核移植再構築胚の体外培養系の比較において、CR1aaを基本培地とした血清添加共培養系は、発生率が高く、発育が早い傾向が認められ、市販のIVD101培地を用いた無血清非共培養系は、培養日数により発育ステージが集中する傾向が認められた。

キーワード	再構築胚	血清添加共培養系	無血清非共培養系	家畜工学研究室

1　成果の内容
（１）血清添加共培養系（Ａ群）、無血清非共培養系（Ｂ群）の胚盤胞発生率はそれぞれ35.9%、22.8%であり、両群間に有意な差が認められた（表１）。
（２）Ａ群においては桑実期以降の発育が0.5～1日程度Ｂ群より早い傾向が認められた（図１，２）。
（３）発育ステージの経過は、Ａ群に比べＢ群で比較的狭い期間で桑実期（６日目）および胚盤胞（７日目）に至る傾向がある（図１,２）。
（４）Ａ群、Ｂ群の再構築胚移植による受胎成績は、12月末現在で、それぞれ20%（1/5頭）、60%（3/5頭、内2頭流産）である。

2　成果の活用方法及び留意事項
（１）移植可能胚の作出効率はＡ群で優れているが、体外培養系での血清添加の及ぼす影響について、受胎率及び正常産子の得られる効率について考慮していく必要がある。
（２）血清添加培地での体外培養系について、細胞質内の脂肪顆粒が増加するとの報告があり、再構築胚の耐凍能に対する影響を考慮する必要がある。
（３）再構築胚発育過程で、後期桑実期および胚盤胞発生は、Ｂ群において集中して発現しているため、培養系としての安定性に優れていると考えられる。
（４）正常産子をより効率的に得るために、各培養系について再構築胚の細胞数、特に内細胞塊の細胞数について調べる必要がある。
（５）供試材料及び培養条件
　供核細胞：黒毛和種２頭　頚部皮下線維芽細胞　培養細胞（７代継代）
　　　　　　凍結融解後３日間10%FCS加DMEMで培養、その後血清飢餓状態（0.5%FCS加DMEM）で５日間培養。
　受核細胞：食肉処理場採材卵巣由来卵子。

　Ａ群：細胞融合後48時間CR1aa+0.3%BSA（5%CO_2+5%O_2+90%N_2）非共培養、その後CR1aa+5%FCS（5%CO_2+95%air）共培養。
　Ｂ群：IVD101（5%CO_2+5%O_2+90%N_2）非共培養、細胞融合後48時間で約80%の培地交換。

3　当該事項に係る試験研究課題
　[家畜バイオテクノロジー２]　１－（０）
　核移植技術による優良種畜の大量生産技術の開発

4　参考文献・資料
（１）Yamashita et al.Bovine blastocyst formation from IVM/IVF produced zygotes in serum and serum free medium.Theriogenology 45,197(1996)
（２）阿部ら．血清培地及び無血清培地で作出したウシ胚の組織学的研究．東日本家畜受精卵移植技術研究会報15号．54(1999)
（３）牛島ら．生体回収胚、体外受精胚および核移植胚における細胞分裂回数の変動．第９２回日本繁殖生物学会講演要旨．85(1999)
（４）阿部ら．血清培地及び無血清培地で作出したウシ胚の組織学的研究．東日本家畜受精卵移植技術研究会報16号．22(2000)

5　試験成績の概要

表１　培養系による胚盤胞発生率

	供試数	発生数	発生率
Ａ群	247	92	37.25
Ｂ群	249	54	21.69
合計	496	146	29.44

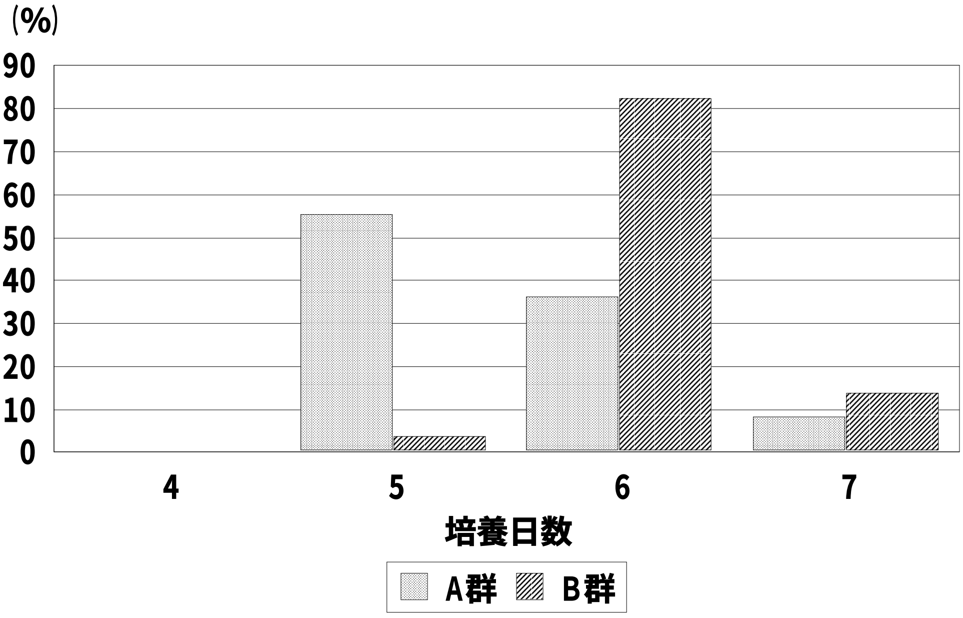

図１　後期桑実期発生率

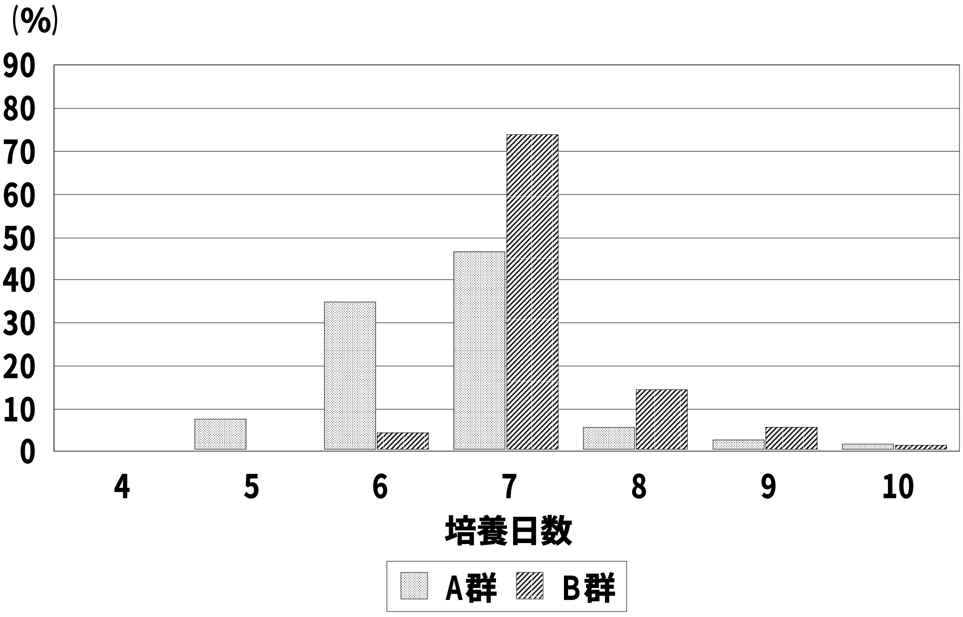

図２　胚盤胞発生率