

ダイゴGF21添加培地を用いた牛体外成熟・体外培養系の検討

下司 雅也・鈴木 修\*・関野 美晴・坂口 実

(東北農業試験場・\*草地試験場)

Effects of Daigo's GF21 on the *In Vitro* Maturation, Fertilization and Development of Bovine Oocytes.

Masaya GESHI, Osamu SUZUKI\*, Miharuru SKINO and Minoru SAKAGUCHI

(Tohoku National Agricultural Experiment Station・\*National Grassland Research Institute.)

1 はじめに

牛体外成熟・体外培養においては添加血清の種類や製造ロットが培養成績に影響することが知られており<sup>2) 3)</sup>, 安定で効率の良い体外成熟・体外培養系を確立するためには血清のロットチェック等の多大な労力が必要となる。

ところで, 最近細胞増殖促進因子製剤ダイゴGF21が開発された。ダイゴGF21は牛血清から分取された細胞増殖促進因子を主成分とする製剤で, ①牛胎児血清(FCS)と同等の細胞増殖効果が期待できる, ②ロット変動が少ない, ③価格変動がなく, FCSに比べて安価, ④微生物(細菌, 真菌, ウイルス, マイコプラズマ等)が滅菌・除去されている, ⑤牛血清等にしばしばみられる細胞毒性がない等の特徴を持つことから, ダイゴGF21が牛の体外成熟・体外培養に使用できるならば培養成績の安定化に役立つ可能性がある。

今回, 牛の体外成熟・体外受精・体外培養系におけるダイゴGF21使用の可能性について検討したので報告する。

2 試験方法

(1) 試験1

ダイゴGF21(日本製薬)あるいはFCS(M. A. Bioproducts)の添加が牛未受精卵の成熟率・受精率あるいは初期発生率等に及ぼす影響を検討した。屠畜卵巣より未成熟卵胞卵子を注射筒を用いて吸引採取し, 洗浄後, 成熟培地(TCM199(GIBCO)+10%FCS又はGF21+0.02AU/ml卵胞刺激ホルモン(アントリン;デンカ製薬))で20~22時間成熟培養後に媒精に供した。精子は凍結精液を融解後, 10mMカフェイン(SIGMA)加BO液(Brackett and Oliphant's Medium<sup>1)</sup>)で2回洗浄し, 2.5×10<sup>7</sup>/mlの濃度に調製した。10IU/mlヘパリン(清水製薬), 20mg/ml牛血清アルブミン(SIGMA)加BO液で等倍希釈し, 100μlのドロップを作成し, 30分の前培養後に体外成熟卵子を約10個づつ導入した。媒精6時間後に発生培地(TCM199+10%雌牛血清又はGF21+ピルビン酸)に移し, 媒精54時間後に裸化して卵割率を調べた後, 卵丘細胞との共培養を継続した。雌牛血清は, 発情後7日目の血清を用いた。一部の卵は媒精22時間後にエタノール:酢酸(3:1, V/V)で固定し, 1%アセト

ルセインで染色して成熟率及び受精率を調べた。ただし, 雌雄両前核及び精子尾部の確認できる卵を受精卵とした。また, 培地の交換は48時間毎に行い, 媒精後7~10日にかけて胚盤胞への発生状況を調べた。

(2) 試験2

FCS添加成熟培地で体外成熟後, 体外受精した牛受精卵を媒精54時間後の初期発生確認時を境にして, 発生培地への添加を①GF21→GF21, ②GF21→雌牛血清, ③雌牛血清→GF21, ④雌牛血清→雌牛血清と変化させて卵丘細胞と共培養し, 胚盤胞への発生率に及ぼす影響を調べた。ただし, 試験1とは異なるロットの雌牛血清を用いた。また, 初期発生確認時に4細胞期以上に発生した胚を以後の培養に用いた。

3 試験結果及び考察

表1には成熟培地へのGF21又はFCSの添加が牛未成熟卵の成熟率及び受精率に及ぼす影響を示した。成熟率, 受精率ともFCS添加成熟培地区でやや高くなるものの処置区間に有意な差は認められなかった。表2には媒精54時

表1 成熟率, 受精率に及ぼす影響

添加血清		供試卵数	成熟率 (%)	受精率 (%)
成熟培地	発生培地			
GF21	雌牛血清	21	85.7(18)	77.8(14)
	GF21	27	92.6(25)	72.0(18)
	小計	48	89.6(43)	74.4(32)
FCS	雌牛血清	46	93.5(43)	81.4(35)
	GF21	34	88.2(30)	80.0(24)
	小計	80	91.3(73)	80.8(59)

注。( )内は卵数

表2 初期発生あるいは胚盤胞への発生に及ぼす影響

添加血清		供試卵数	卵割率* (%)	8細胞期への発生率* (%)	胚盤胞への発生率** (%)
成熟培地	発生培地				
GF21	雌牛血清	121	49.6(60) <sup>a</sup>	12.4(15) <sup>ab</sup>	5.0(6) <sup>b</sup>
	GF21	178	45.5(81) <sup>a</sup>	6.2(11) <sup>a</sup>	1.1(2) <sup>a</sup>
FCS	雌牛血清	383	60.6(232) <sup>b</sup>	19.3(74) <sup>b</sup>	11.0(42) <sup>c</sup>
	GF21	511	65.4(334) <sup>b</sup>	19.2(98) <sup>b</sup>	8.0(41) <sup>bc</sup>

注。( )内は卵数

\* 媒精54時間後に観察

\*\* 媒精後7~10日間に胚盤胞まで発生した胚

a-c 異符号間に5%水準で有意差あり(χ<sup>2</sup>検定)

間後における卵割率(2細胞期以上への発育率), 8細胞期以上への発生率及び媒精後7~10日間における胚盤胞への発生率を示した。ダイゴGF21添加成熟培地区では, 初期発生や胚盤胞への発生率はFCS添加成熟培地区に比べて悪く, 特に全期間ダイゴGF21添加区では胚盤胞への発生はほとんど認められなかった。一方, FCS添加成熟培地区ではダイゴGF21添加発生培地区で胚盤胞への発生率がやや低くなるものの, 初期発生については雌牛血清添加発生培地区との間に有意な差は認められなかった。以上の結果から, ダイゴGF21を成熟培地に添加した場合には受精後の発生能に悪影響を与えることが推察された。

試験2の結果を表3に示した。体外培養の全期間にダイゴGF21を添加した場合には胚盤胞への発生率が低くなるものの, それ以外の処置区では胚盤胞への発生率に差は認められなかった。このことから, ダイゴGF21添加の場合には, 牛初期胚の体外培養において問題となる8セルブロッ

ク(8から16細胞期で発育が停止すること)を効率よく解除できないように推察された。

#### 4 ま と め

牛の体外成熟・体外受精・体外培養系におけるダイゴGF21使用の可能性について検討した。その結果, ダイゴGF21を成熟培養に用いた場合にはその後の発生能に悪影響を及ぼし, 発生培地に添加した場合には初期発生には問題はないものの全期間発生培地に添加した場合には胚盤胞への発生率を低下させることが明らかになった。以上のことから, 牛体外成熟・体外培養系において血清の代用品としてのダイゴGF21の有効性は認められない。

#### 引用文献

- 1) Brackett, B. G.; Oliphant, G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. Biol. Reprod. 12: 260-274.
- 2) Fukui, Y.; McGowan, L. T.; James, R. W.; Pugh, P. A.; Tervit, H. R. 1991. Factors affecting the *in vitro* development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. J. Reprod. Fert. 92: 125-131.
- 3) Younis, A. I.; Brackett, B. G.; Fayrer-Hosken, R. A. 1989. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. Gamete Res. 23: 189-201.

表3 胚盤胞への発生に及ぼす影響

添加血清	供試胚数*	胚盤胞への発生率**
6~54hr→54hr~	(4-cell以上)	(%)
G F 21→G F 21	113	13.3 (15) <sup>a</sup>
G F 21→雌牛血清	60	38.3 (23) <sup>b</sup>
雌牛血清→G F 21	84	42.9 (36) <sup>b</sup>
雌牛血清→雌牛血清	124	38.7 (48) <sup>b</sup>

注。( )内は卵数

\* 媒精54時間後に観察

\*\* 媒精後7~10日間に胚盤胞まで発生した胚

a-c 異符号間に5%水準で有意差あり ( $\chi^2$ 検定)