

化学的組成の明らかな培地を用いた豚胚の体外生産に関する研究

鈴木千恵

In vitro production of porcine embryos using chemically defined media

Chie SUZUKI

近年、豚の体外受精技術は改善されてきているものの、体外受精由来胚の生産効率は極めて低く、更なる生産効率の向上と安定した生産技術の開発が望まれている。そこで、本研究では、豚の体外成熟卵子の体外受精率およびその後の胚発生率の向上と安定化を図るため、血清やウシ血清アルブミン (BSA) などの動物由来製品を添加しない化学的組成の明らかな培地を用いた体外受精および発生培養系の確立を試みた。

第1章 化学的組成の明らかな培地を用いた豚体外受精法の確立

化学的組成の明らかな培地を用いた体外成熟卵子の体外受精法を確立するために、体外受精用基礎培地 (豚配偶子用培地, porcine gamete medium, PGM) を開発し、その基礎培地 (PGM) へのテオフィリン、アデノシンおよびシステインの添加が体外成熟卵子の受精および発生に及ぼす影響について検討した。その結果、PGM へ適量のテオフィリン (2.5mM)、アデノシン (1 μ M) およびシステイン (0.2 μ M) を添加することにより、受精率および胚盤胞への発生率が改善された。さらに、テオフィリン、アデノシンおよびシステインを添加した PGM (PGMtac) 中で受精させた卵子を化学的組成の明らかな発生培地 (豚接合子用培地, porcine zygote medium, PZM) を用いて培養して得られた胚盤胞の産子への発生能についても調べた。4頭のレシピエントへ1頭あたり20~25個の胚盤胞を外科的に移植した結果、すべてのレシピエントが妊娠して合計21頭の産子が得られた。

第2章 異なる由来・保存法の豚精子を用いた体外受精および体外培養

第1章で開発した体外受精用の化学的組成の明らかな培地 (テオフィリン、アデノシンおよびシステインを添加した PGMtac) の汎用性を検討するために、異なる方法で凍結保存した射出および精巢上体精子、ならびに液状保存した射出精子 (計17頭の雄由来) を用いて体外受精を行い、受精率およびその後の胚発生率 (PZM を用いて発生培養) を調べた。その結果、凍結保存精子については凍結方法により胚盤胞への発生率 (26~56%) が異なるものの、供試したすべての雄の射出および精巢上体精子から胚盤胞が作出できた (胚盤胞への発生率:14~75%)。また、液状保存精子 (1~14日間保存) については、保存期間が長くなると受精率が低下したが、1~10日間保存した精子を使用することによって体外受精胚の20~48%が胚盤胞へ発生することが分かった。

第3章 体外発生培地へのアミノ酸および BSA 添加が豚初期胚の体外発生に及ぼす影響

化学的組成の明らかな発生培養用培地 (PZM) を用いた体外受精由来胚の発生培養、とくに PZM へのグルタミン、ハイポタウリン、タウリンおよびアミノ酸溶液の至適添加濃度について検討するとともに、培地交換および BSA 添加の効果についても調べた。その結果、グルタミン、ハイポタウリン、タウリンおよびアミノ酸溶液の添加濃度を調整することにより体外受精胚の胚盤胞への発生能が改善されることが分かった。基礎培地 (PZM) 中の高分子物質 (ポリビニルアルコール) の代わりに BSA を添加しても胚盤胞への発生率には影響が

認められず、基礎培地としてPZMを利用すれば、高分子物質としてPVAを用いても、BSAを添加した場合と比較して遜色ない発生率が得られることが判明した。

また、培地交換（媒精72時間後）により胚盤胞への発生率は改善されず、むしろ胚盤胞の細胞数が減少することが分かった。さらに、グルタミン濃度を2mMに修正したPZMを用いた発生培養により得られた体外受精由来の胚盤胞を新たに開発した非外科的な移植技術を用いてレシピエントに移植して産子への発生能を有することが確認された。

第4章 体外発生培地へのグルタミンおよびハイポタウリンが豚胚の酸化ストレスに及ぼす影響

PZMに添加したグルタミンおよびハイポタウリンの胚発生改善効果について検討を加えた。すなわち、卵割期（媒精後48～72時間）におけるグルタミンとハイポタウリンの胚発生に及ぼす影響、ならびに卵割胚内の酸化還元状態やDNA損傷に及ぼす影響について検討した。その結果、卵割期におけるグルタミンおよびハイポ

タウリンの存在により胚細胞内 H_2O_2 量やDNA損傷の減少がみられた。しかし、媒精72時間後の卵割胚の細胞数と細胞内グルタチオン含量にはグルタミンおよびハイポタウリンの影響が認められなかった。このことからグルタミンおよびハイポタウリンが卵割胚の酸化ストレスを軽減し、その後の胚発生を促進することが示唆された。

以上のように、本研究により血清やBSAなどの動物由来製品を添加しない化学的組成の明らかな培地を用いた豚の体外生産技術、すなわち、豚卵子の体外受精および発生培養により胚盤胞を作出する技術を開発することができた。また、この技術により体外生産された胚盤胞を外科的あるいは非外科的にレシピエントに移植して産子への発生能を実証した。

北海道大学大学院獣医学研究科 獣医学博士
平成20年3月25日授与