

通し番号	4 3 3 1
------	---------

分類番号	19-57-22-06
------	-------------

(成果情報名) 血清、BSA不含発生培地にIGF-IまたはEGFを添加することで発生率が高まる
[要約] 血清、BSA不含発生培地 (SOFaa-PVA)を基礎培地としてインスリン様成長因子-I (IGF-I)及び上皮成長因子(EGF)を添加し、牛体外生産胚の発生成績への効果を検討した。と畜場由来の牛卵巣から得た卵丘細胞卵子複合体を20時間成熟培養し、6時間媒精後に卵丘細胞を剥離し、低酸素環境下で培養を行った。試験1では、SOFaa-PVAにIGF-I (0, 2, 10, 50, 100ng/ml) を添加し、試験2ではSOFaa-PVAにEGF (0, 1, 10, 100, 200ng/ml) を添加した。試験1では、IGF-I 50ng/ml添加区において、他の区と比較して有意に高い胚盤胞発生率(37.2%)を示し、呼吸量及び細胞数は、IGF-I濃度が高まるにつれて増加した。試験2では、EGF濃度が高まるにつれて胚盤胞発生率が高まった(48.3%)が、呼吸量及び細胞数においては差は認められなかった。
(実施機関・部名) 神奈川県畜産技術センター 畜産工学部 連絡先 046-238-4056

[背景・ねらい]

一般的に、牛胚体外培養は牛胎仔血清を添加するが、血清はそのロットにより胚盤胞発生率に違いがある。より安定した胚生産技術を目指すためには、無血清培地の検討が望ましいと考えられるが、血清添加培地と比較して胚盤胞発生率が低い。一方、成長因子を添加することで、無血清培地で胚盤胞発生率が向上したという報告がある。そこで、無血清培地に成長因子であるEGF, IGF-Iを添加し、胚盤胞発生に及ぼす影響を検討した。

[成果の内容・特徴]

- 1 血清、BSA不含発生培地 (SOFaa-PVA) にIGF-Iを、0, 2, 10, 50, 100ng/ml添加したところ、体外受精後8日目で50ng/ml添加区の胚盤胞発生率が37.2%と、2ng/ml添加区と比較して有意に高い値を示し(表1)、呼吸量及び細胞数は、IGF-I濃度が高まるにつれて増加し(表2)、IGF-Iの添加で胚の品質が向上する可能性が示唆された。
- 2 SOFaa-PVAにEGFを0, 1, 10, 100, 200ng/ml添加したところ、EGF濃度が高まるにつれて体外受精後8日目の胚盤胞発生率は高まったが(表3)、呼吸量、細胞数においては差は認められなかった。

[成果の活用面・留意点]

成長因子は、チューブ等に吸着されるため、保存には低吸着素材のものを使用する。

[具体的データ]

表1 発生培地へのIGF-Iの添加が発生成績に及ぼす効果

		供試回数 (供試卵数)	媒精48h後の 分割率 (%)	桑実胚率(%) Day5	胚盤胞発生率 (%)					
					Day6	Day7	Day8			
IGF-I	0添加区 (無添加区)	5(129)	80.3	31.8	3.8	a	11.4	a	22.0	ab
IGF-I	2ng/ml添加区	5(132)	81.5	30.8	5.4	ab	16.2	ac	20.8	a
IGF-I	10ng/ml添加区	5(131)	83.1	31.5	6.2	ab	21.5	bc	27.7	ab
IGF-I	50ng/ml添加区	5(113)	85.0	43.4	11.5	b	29.2	b	37.2	b
IGF-I	100ng/ml添加区	5(133)	83.5	38.3	8.3	ab	21.8	ab	27.1	ab

異符号間に有意差有り (P<0.05)

検定は、コンピューターソフトSPSSを用い、分散分析後にTukeyHSDにより多重検定を行い分析した。
なお、各率については角変換した後に検定に供した。

表2 発生培地へのIGF-Iが胚の直径、呼吸量や細胞数に及ぼす効果

		供試胚数	胚直径 (μm)	呼吸量 ($\times 10^{-14}\text{mol/s}$)	細胞数							
					計	内部細胞塊	栄養外胚葉					
IGF-I	0添加区 (無添加区)	15.0	157.0	a	0.493	a	83.9	a	26.1	a	57.8	a
IGF-I	2ng/ml添加区	16.0	171.6	ab	0.793	ab	94.5	a	24.8	a	69.7	ab
IGF-I	10ng/ml添加区	15.0	182.0	b	0.952	b	99.7	ab	27.1	a	78.7	b
IGF-I	50ng/ml添加区	22.0	178.2	ab	0.861	b	118.4	b	36.1	b	82.3	b
IGF-I	100ng/ml添加区	22.0	187.3	b	0.999	b	119.1	b	36.2	b	82.9	b

異符号間に有意差有り (P<0.05)

表3 発生培地へのEGFの添加が発生成績に及ぼす効果

		供試回数 (供試卵数)	媒精48h後の 分割率 (%)	桑実胚率(%) Day5	胚盤胞発生率 (%)					
					Day6	Day7	Day8			
EGF	0添加区 (無添加区)	5(117)	71.8	38.5	6.8		11.1	a	20.5	a
EGF	1ng/ml添加区	5(143)	78.2	42.3	12.0		14.1	a	21.1	a
EGF	10ng/ml添加区	5(142)	79.3	41.3	5.8		15.7	a	21.5	a
EGF	100ng/ml添加区	5(141)	77.7	33.1	14.4		23.7	ab	34.5	b
EGF	200ng/ml添加区	5(143)	79.0	41.3	16.1		32.2	b	48.3	c

異符号間に有意差有り (P<0.05)

なお、各率については角変換した後に検定に供した。

表4 発生培地へのEGFが胚の直径、呼吸量や細胞数に及ぼす効果

		供試胚数	胚直径 (μm)	呼吸量 ($\times 10^{-14}\text{mol/s}$)	細胞数		
					計	内部細胞塊	栄養外胚葉
EGF	0添加区 (無添加区)	7	180.0	0.748	108.0	26.0	82.0
EGF	1ng/ml添加区	6	170.0	0.854	103.3	29.7	73.7
EGF	10ng/ml添加区	5	164.0	0.618	95.0	24.5	70.5
EGF	100ng/ml添加区	15	191.3	0.737	116.4	27.2	89.2
EGF	200ng/ml添加区	16	190.0	0.734	114.0	28.2	85.8

[資料名] 平成19年度試験研究成績書(繁殖工学・乳牛・肉牛・飼料作物)

[研究課題名] 胚移植を活用した優良牛の造成

[研究期間] 平成19~21年度

[研究者担当名] 坂上信忠、秋山清