

牛の受精卵移植

(7) TCM199培地を利用した牛精子処理の検討

山城存 野中克治 渡久地政康

I 要 約

体外受精時の牛精子処理基礎培地に、市販のTCM199培地 (25mM HEPES buffer) を利用した処理方法について、現行の基礎培地BO液 (Bracktt&Oliphant液) での処理方法と比較検討した。

その結果、発生培養後供試卵の72時間目までの卵分割率はTCM199培地39.7% (139/350個)、BO液37.6% (124/330) であった。発生培養後10日目までに胚盤胞に発育した胚盤胞率はTCM199培地12.9% (45/350個)、BO液11.5% (38/330) であった。また胚盤胞への発生分布は両処理方法で同じ傾向を示した。

以上のことからTCM199培地は、牛精子処理時の基礎培地として、BO液とほぼ変わらない成績が得られた。

II 緒 言

現在、一般的に牛精子処理時の基礎培地はBO液が用いられ、Heparinあるいは前培養等で受精能を獲得させ媒精を行っている¹⁾。しかし、BO液はそれぞれの研究室等で作製されているのが現状であり、その作製方法は煩雑で、安定した培地を得るには多くの労力を必要とする。

最近浜脇ら²⁾は、TCM199培地で精子処理を試み、ロットの違いにより精子侵入率に差があったと報告した。当场でも体外受精技術の安定化を図るため、市販のTCM199培地を基礎培地とした精子処理方法について、追加試薬濃度がBO液処理と同じになるよう調製し、発生培養後の卵分割状況及び胚盤胞への発生状況等について検討したのでその結果を報告する。

III 材料及び方法

1. 試験場所及び試験期間

沖縄県畜産試験場。1993年11月から1994年1月

2. 供試卵

供試卵数は何れも6回の処理で、TCM199培地処理350個、BO液処理330個とした。

3. 調査項目

発生培養後72時間目までの卵分割状況、10日目までの胚盤胞への発生状況及び胚盤胞への発生分布について調査した。

4. 体外受精

1) 成熟培養

屠場から得た卵巣より未成熟卵子を採取し、5%子牛血清加TCM199培地で22時間培養した。

培養条件は試験期間中、2.5%CO₂、38.5℃とした。

2) 精子処理

同一種雄牛の凍結精液を用いて、同一ロットのTCM199培地とBO液とを基礎培地として、以下の方法で処理した精子を試験に供した。

(1) TCM199培地を基礎培地として、Glucose 1.5mg/ml、Pyruvic Acid Sodium Salt 0.138mg/ml

を加えたmTCM199培地に、5 mM Caffeine、Heparin $60\mu\text{g}/\text{ml}$ を加え精子洗浄液とした。洗浄液で5分間遠心洗浄を2回繰り返した後、mTCM199培地にBovine Albumin $10\text{mg}/\text{ml}$ 加えた等量希釈液で精子濃度が $15\times 10^6/\text{ml}$ になるよう調製した。

(2) BO液を基礎培地として(1)と同様に処理した。ただしGlucoseは、TCM199培地に含有する量を考慮し、mTCM199培地と同じ濃度となるよう $2.5\text{mg}/\text{ml}$ 加え調製した。

媒精時間は、両処理方法とも5時間とした。

3) 発生培養

1%子牛血清、1 mM Pyruvic Acid Sodium Salt 加TCM199培地で発生培養した。

IV 結果及び考察

発生培養後72時間目までの卵分割成績を表-1に示した。その結果、卵分割率はTCM199培地39.7% (139/350)、BO液37.6% (124/330)であり、両処理方法に有意な差は認められなかった。

発生培養後10日目までの胚盤胞への発生成績を表-2に示した。その結果、胚盤胞率はTCM199培地12.9% (45/350)、BO液11.5% (38/330)であり、両処理方法に有意な差は認められなかった。

胚盤胞への発生分布について図-1に示した。その結果、7日目の発生率ではTCM199培地31.1%、BO液13.2%となりTCM199培地処理方法で高率に発生を示したが、全体としては同じ発生分布を示した。

以上の結果よりTCM199培地は牛精子処理時の基礎培地として、いずれの調査項目においても現行の基礎培地BO液とほぼ変わらない成績が得られた。

これまで牛体外受精の精子処理時に用いたBO液は、多くの試薬を調合するため安定した培地を得るには多くの労力を必要とした。しかし市販のTCM199培地が精子処理培地として利用できれば、省力的で安定した成績が得られる。今後は、TCM199培地のロットの違いによる成績についての検討が必要である。

表-1 卵分割成績 (72時間目までの成績)

基礎培地	処理	供試卵	分割卵 (%)
TCM199	6	350	139 (39.7)
BO液	6	330	124 (37.6)

表-2 胚盤胞への発生成績

基礎培地	供試卵	6	7	8	9	10 (日目)	Total (%)
TCM199	350	0	14	17	5	9	45 (12.9)
BO液	330	2	5	17	5	9	38 (11.5)

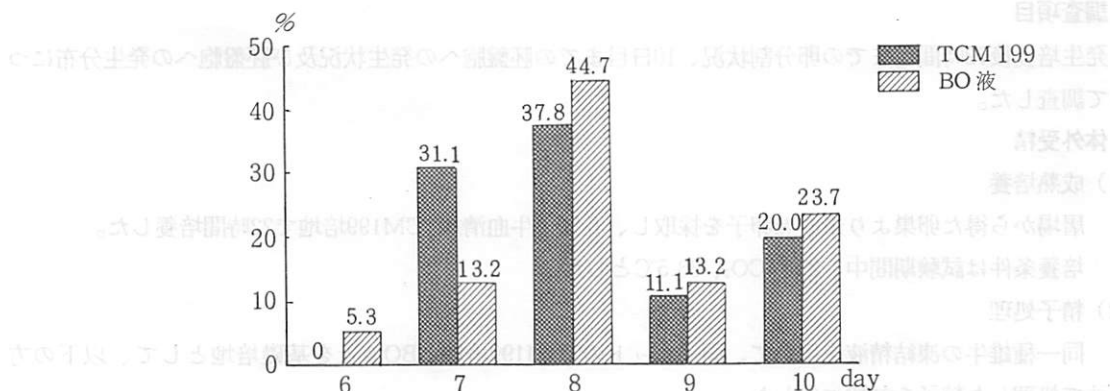


図-1 胚盤胞発生分布

V 引用文献

- 1) 緒方喜代子 外3名、1988、牛の体外受精技術確立試験（第1報告）、熊本県畜産試験場試験調査成績書、19～21
 - 2) 上村浩一・地脇準一、1988、牛の体外受精（第1報）、京都府畜産研究所試験研究成績、28、79～81
 - 3) 西貞夫 1990、家畜の繁殖と育種、168～183、農業図書
 - 4) 加治佐修 外5名、1992、肉用牛における体外受精技術の確立、鹿児島県畜産試験場研究報告、24、23～33
 - 5) 浜脇淳 外3名、1993、牛卵子の体外受精：とくにTCM199培地を用いた精子処理、第8回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会、47
-