

受卵牛の受胎率向上に関する研究 (第2報)

菅原 徹^{※1}・渡辺晃行・戸塚 豊・戸谷孝治^{※2}

要 約

体外受精し移植した胚と体内受精胚を回収し、得られた伸張期胚盤胞を細切し、断片を短時間培養することで栄養膜小胞を作出することができた。また、作出された栄養膜小胞をエチレングリコールを使用した凍結保存液とともに受精卵移植用ストロー内に吸引し、緩慢冷却後ダイレクト法で凍結し融解した結果、93.1%(27/29)の栄養膜が小胞を再形成した。

キーワード：伸張期胚盤胞，栄養膜小胞

結 言

受精卵移植技術を活用し効率的に子畜を生産するためには受胎率の向上が必要である。近年、移植胚と母体間の妊娠認識に関わる物質や機構の研究が行われており、特に着床期胚の栄養膜細胞が産出するインターフェロンは、胚と母体間の妊娠認識や黄体退行阻止による妊娠維持に関与している可能性が示唆されている。また栄養膜細胞を細切後、短時間培養して形成される栄養膜小胞 (Trophoblastic vesicle, TBV) を胚と共移植することにより、受胎性向上の可能性も報告されている。

そこで本研究では、移植適期受卵牛作成や胎児着床操作などの能動的人為的な方法による受胎率向上の方法について検討することとし、特に胎児着床操作手法に関して、栄養膜小胞と胚との共移植による受胎率向上の可能性を検討する。

前報では栄養膜細胞が培養可能であり、移植用ストロー内で38.5℃で24時間保存できることを報告した。今年度は、体内受精及び体外受精由来ウシ栄養膜細胞を培養し、操作性のよい小胞の作出を試み、さらに移植用ストロー内の凍結融解後の生存性について検討した。

材料および方法

1. 材料

1) 体内受精由来胚

過剰排卵処置後人工授精し、14日目に回収した伸長期の胚盤胞

2) 体外受精由来胚

と畜場由来の卵巣から採取した卵子を用いて体外受精によって作出した胚の後期桑実胚～拡張期胚盤胞

2. 方法

1) 体内受精由来胚

(1) 体内受精

4頭の供試牛に卵胞刺激ホルモン (アントリンR, デンカ製薬) の漸減投与による過剰排卵処置後人工授精を行った。

(2) 14日目胚の回収

胚回収は人工授精後14日目に、0.3%BSA加修正PBS500mlを灌流液として使用し、5～10回子宮を直径3.5mmのかん流孔を開けた2孔式バルーンカテーテルでかん流して行った。

2) 体外受精由来胚

(1) 体外受精胚の作出

と畜場由来の卵巣より、卵子吸引法により卵子を採取し、10%FCS加HPM-199を用いて、22～24時間成熟培養後、体外受精を行い、その後10%FCS加HPM-199にて発生培養を行った。なおこれらの培養は全て、38.5℃、5%CO₂、95%空気の気相条件下で行った。

※1 現 茨城県農林水産部畜産課

※2 現 茨城県農業総合センター農業大学校

(2) 体外受精胚の移植

体外受精胚は受精後7日目に、ホルモン処理で同期化させた供試牛3頭に移植した。

(3) 子宮内培養後の胚回収

胚の子宮内培養は7~9日間(胚の受精日を0日とすると14~16日齢胚)行い、体内受精由来胚と同様の方法で移植側子宮をかん流した。

3) 伸張期胚盤胞の切断及び培養

回収した伸張期胚盤胞を20%CS加PBSで洗浄し、同液内で外科手術用メスを用いて、胚盤の両端部を周辺細胞とともに座滅するように切除し、次に残った栄養膜を1~1.5mm幅に同様に細切した。細切した栄養膜の断片を100 μ M β ME(β メルカプトエタノール)+20%FCS加RPMI1640培養液に投入し、38.5 $^{\circ}$ C、5%CO₂、95%空気の気相条件下で12時間培養した。培養後小胞の形成がみられた栄養膜を栄養膜小胞とした。

4) TBVの凍結・融解

TBVは、ダイレクト法で凍結した。すなわち、TBVを0.1Mトレハロース(Tre)+1.8Mエチレングリコール(EG)+20%CS加PBSに投入し、受精卵移植用の0.25ml容量のプラスチックミニチュアストローに吸引封入した後、プログラムフリーザーを用いて、植氷温度を-7 $^{\circ}$ Cとし、-0.3 $^{\circ}$ C/分の緩慢冷却により-32 $^{\circ}$ C到達後、液体窒素に投入した。融解は凍結ストローを室温下で空気中に6秒間保持後30 $^{\circ}$ Cの温湯に投入して行った。融解したTBVは、20%CS加TCM199培養液に移して、5%CO₂、95%空気、38.5 $^{\circ}$ Cの気相条件下で培養し、培養開始後24時間及び48時間目に、小胞の再形成の観察により生存性を確認した。

結果および考察

1. 14日目胚の回収

体内受精では、供試牛4頭から28個の伸張期胚盤胞が回収された。これらの胚のうち、メスで切断可能な3mm以上に発育した胚は20個であった。

一方体外受精では、作出された26個の胚を3頭の牛に移植し、7個の伸張期胚盤胞が回

収された。これらの胚のうち、メスで切断可能な3mm以上に発育した胚は4個であった。

2. 伸張期胚盤胞の切断及び培養

体内受精由来の20個の胚及び、体外受精由来の4個の胚を細切し、それぞれ193個、12個の栄養膜が得られた。また、これらの栄養膜を培養した結果、それぞれ164個、9個が小胞を形成し、最終的にそれぞれ164個、9個のTBVが得られた。

3. TBVの凍結・融解

作出されたTBVのうち29個のTBVを凍結・融解後培養した結果、培養開始24時間後では、24個の生存が確認され、48時間後では、27個(93.1%)の生存が確認された。

なお48時間後の方が生存数が多かったが、これは24時間後の観察時に生存が確認できなかったものも培養を継続したところ、48時間後に新たに3個の生存が確認されたためである。

したがって凍結融解後48時間で90%以上の生存率が得られたことから、生体から採取した胚由来のTBVは胚と同一の緩慢冷却凍結が可能であり、胚と一緒に移植する共移植に使用可能であることが示された。

そこで生存を確認したTBVについては、受胎に関する調査を行うため、胚との共移植を行った。共移植はTBV3個と受精後7日目胚1個を1本の移植用ストローに詰めたものを、1頭につき1本ずつ計5頭に移植して行った。これについては今後受胎の確認を行う予定である。

4. TBVに関する今後の検討

今回材料とした体内受精由来胚は、供卵牛に過剰排卵処理を行い人工授精後、通常7日目に行う胚回収をせずに、14日目に胚回収を行うことで、伸張期の胚盤胞まで発生が進んでいる。

現在、通常は人工授精後7日目に胚回収を行い、Aランク胚のみ凍結保存を行っており、その他のB-Cランク胚については新鮮卵移植でのみ使用している。したがってこうしたB-Cランク胚を利用してTBVを作出できれば、効率よく比較的簡易にTBVを作出で

きる可能性がある。

今後は、TBVと胚の共移植による受胎性調査と、過剰排卵処理を行い人工授精後7日目で回収したB-Cランク胚を再度子宮内に戻す方法によるTBV作出試験、及びTBVが卵巣機能に及ぼす影響について検討する。

引用文献

- 1) 太田ら, 茨城畜試研報第30号 (2000) :51-52
- 2) 菅原ら, 東日本家畜受精卵移植技術研究会報 17号 (2001) :52-53