

## 受卵牛の受胎率向上に関する研究（第4報）

### —栄養膜小胞の効率的な作出のための回収時期の検討および受胎率の向上—

渡辺晃行・根本聰実・山口大輔・蘿澤圭二郎<sup>1</sup>

Effect of elongated blastcyst recovery time on the productivity of trophoblastic vesicle in cattle and improvement of conception rate

Akiyuki Watanabe, Satomi Nemoto, Daisuke Yamaguchi, Keijiro Nirasawa

### 要 約

これまで栄養膜小胞を作出するため、体外受精し移植した胚と体内受精胚を14日目、17日目で回収したところ、17日目回収で伸長期胚盤胞1個当たり作出できた栄養膜小胞は増加した。さらに効率的に栄養膜小胞を作出するために回収時期を15日目および16日目で検討した結果、最も効率的に作出できる方法及び時期は体内受精胚で16日目回収であった。また、作出されたTBVと胚を同時凍結し融解後移植を行なった結果、若干の受胎率の向上が見られた。

キーワード：伸張期胚盤胞、栄養膜小胞

### 緒 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ものと考えられている。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)を胚と共に移植することにより、受胎率向上の可能性も報告されている。

そこで本研究では、生体由来の妊娠認識に関わる物質による受胎率向上の方法について検討することとし、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。

前報第30号<sup>1)</sup>では体内受精及び体外受精由来ウシ栄養膜細胞を培養し、栄養膜小胞の作出が可能であり、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も48時間後に90%以上の生存性が確認さ

れた。前報ではより効率的に栄養膜小胞の作出のために17日目で回収を行なった。今年度は、そこでより効率的な栄養膜小胞の作出のために受精後15日目および16日目の成績について調査した。また、栄養膜小胞と胚を同時にダイレクト凍結し融解後、移植を行ない受胎率を調査した。

### 材料および方法

#### 1. 材料

##### 1) 体内受精由来胚 (SOV-AI)

過剰排卵処置後人工授精し、15日目、16日に回収した伸長期の胚盤胞

##### 2) 体外受精由来胚 (IVF)

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～拡張期胚盤胞を発情後7日に移植を行ない、15日に回収した伸張期の胚盤胞

#### 2. 方法

##### 1) 体内受精由来胚

###### (1) 体内受精

1 現(独)農業技術研究機構 畜産草地研究所

それぞれ 1 頭づつ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) 15, 16 日目胚の回収

胚回収は人工授精後 15, 16 日目に、0.3%BSA 加修正 PBS を片側子宮に 500ml を灌流液として使用し、直径 3.5mm の還流孔を開けた 2 孔式バルーンカテーテルで 5~10 回還流し回収した。

#### 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吸引液(OCM 機能性ペプチド研)で卵子を採取し、10%FCS 加 TCM-199 を用いて、22~24 時間成熟培養後、体外受精を行い、その後 IVD-101 (機能性ペプチド研) にて発生培養を行った。なお成熟培養、媒精は 38.5°C, 5%CO<sub>2</sub>, 95%空気で、発生培養は 38.5°C, 5%CO<sub>2</sub>, 5%O<sub>2</sub>, 90%空気の気相条件下で行った。

##### (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 5 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 8 日間（胚の受精日を 0 日とする 15 日齢胚）を行い、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 幅に同様にして細切した。細切した栄養膜の断片を 100 μM β メルカプトエタノール (β ME) + 20%FCS 加 TCM-199 培養液に投入し、38.5°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 空気の気相条件下で 12 時間培養した。培養後小胞を形成したものを栄養膜小胞とした。

#### 4) 栄養膜小胞と胚の共移植試験

作出された栄養膜小胞 3 個と胚 1 個を 1.8MEG + 0.1MTre に投入し 0.25ml のストローに吸引封入後緩慢冷却法により凍結し、融解後移植を行なった。なお同一時期に凍結融解した胚のみを移植したものと対照区とした。

## 結果および考察

### 1. 15, 16 日目胚の回収(表1)

体内受精では、供試牛 2 頭からそれぞれ 5 個、9 個の伸張期胚盤胞が回収された。これらの胚のうち、メスで切斷可能な 3mm 以上に発育した胚は 4 個、7 個であった。

一方体外受精では、作出了 31 個の胚を 5 頭の牛に移植し、15 日目回収で 1 個の伸張期胚盤胞が回収

された。これらの胚のうち、メスで切斷可能な 3mm 以上に発育した胚は 1 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 4 個、7 個の胚を細切し、27 個、74 個の栄養膜片が得られ、これらの栄養膜片を培養した結果、27 個、71 個の TBV が得られた。

#### 3. TBV の回収時期

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、15 日目および 16 日目に胚回収を行なっており、回収された胚はほとんど伸張期の胚盤胞まで発生が進んでいた。

1 個の受精胚から作出される栄養膜小胞は、14 日目回収では平均 7.2 個<sup>2)</sup>、17 日目では平均 4.7 個<sup>3)</sup>であった。今回 15 日目および 16 日目で回収した結果、受精胚 1 個当たり平均でそれぞれ 6.2 個、10.1 個であった。

表 1 14 日目から 17 日目回収時期の比較

回収日	由来	採取頭数	回収総個数	切斷可能個数	切斷片個数	小胞形成数
14.11.11	IVF	3	7	4	12	9
	SOV-AI	5	29	20	193	164
15.11.11	IVF	5	1	1	7	4
	SOV-AI	1	5	4	27	27
16.11.11	IVF	0				
	SOV-AI	1	9	7	74	71
17.11.11	IVF	2	4	0	0	0
	SOV-AI	10	26	16	139	75

これまで回収時期に注目して授精後 14 日目から 17 日目の 4 日間の回収で比較検討を行なった結果は、16 日目回収のほうが他の 3 日間に比べ 1 個あたりの作出数は多く、また切斷可能胚の割合も最も高かった。授精後 14 日目の回収は 1 個当たりの作出数が 7.2 個と良かったが、3mm 以下の切斷不能な小さな伸張期胚盤胞が多く観察され、また授精後 17 日目で回収した場合は長くなりすぎて途中で切れていったり、伸張期胚盤胞同士が絡まりあって処理できなかったりした胚が多く観察された。

この結果から、より効率的な栄養膜小胞の作出には、授精後 16 日目の胚が適していると考えられた。

#### 2. 栄養膜小胞共移植結果(表2)

栄養膜小胞共移植では 24 頭に移植を行い、受胎が 9 頭(受胎率 37.5%)、対照区では 20 頭に移植を行い 4 頭が受胎した(受胎率 20.0%)。

表2 栄養膜小胞共移植による受胎成績

	供試頭数	受胎頭数	受胎率
共移植区	24	9	37.5%
対照区	20	4	20.0%

受胚牛がすべて当センターで採卵用に飼養されている供卵牛のため、移植成績が低い傾向があるが栄養膜小胞と共に移植した結果、有意差は無いものの受胎率が高くなる傾向があった。

これまでの結果から、栄養膜小胞の作出および凍結融解については、ある程度手法を確立出来たので、今後は受精胚と栄養膜小胞の共移植による例数をさらに増やし、受胎への影響を検討するとともに、栄養膜小胞が卵巢機能に及ぼす影響について検討する。

### 謝　　辞

本試験をおこなうにあたり、卵巣材料提供に御協力いただいた茨城県中央食肉公社ならびに茨城県県北食肉衛生検査所職員諸氏に深謝します。

### 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
- 3) 渡辺ら、茨城県畜産センター研報33号(2002):51-52