

## 受卵牛の受胎率向上に関する研究

### —受胎率向上及び受胎牛評価法への栄養膜小胞の利用に関する実証試験—

渡辺晃行 足立憲隆 宮地利江<sup>1)</sup> 藤井陽一<sup>2)</sup> 谷口雅律<sup>3)</sup> 浦田博文<sup>4)</sup>  
橋谷田豊<sup>5)</sup> 高橋ひとみ<sup>6)</sup>

Examination of the use of Trophoblastic Vesicle on improvement for conception rate  
and an evaluation of recipient cow.

Akiyuki Watanabe, Noritaka Adachi, Rie Miyachi, Youichi Fujii, Masanori Taniguchi,  
Hirofumi Urata, Yutaka Hashiyada, Hitomi Takahashi

### 要 約

過剰排卵処理による生体由来胚あるいは発情後7日目に移植を行なった体外受精胚を受精後14日目から17日目で回収したところ、過剰排卵処理による生体由来胚の16日目回収において、栄養膜小胞(Trophoblastic vesicle, TBV)を作出するための伸長期胚盤胞が最も効率良く回収された。栄養膜小胞の凍結融解後の生存性は、エチレングリコールによるダイレクト法が最も高かった。栄養膜小胞の単移植による発情回帰は平均22日で、対照区と差が無かったが、血中プロジェステロン濃度の平均は量、期間ともに単移植を行なった方が多くなる傾向があった。また、栄養膜小胞の単移植により発情が遅延する個体があることが確認できた。栄養膜小胞と胚の同時凍結を行い融解後移植を行なった結果、胚のみの移植に比べ受胎率が高くなる傾向があった。栄養膜小胞が作出できる伸長期胚盤胞が回収できた試験牛のその後の繁殖成績は、作出可能な伸長期胚盤胞が回収されなかった試験牛に比べ良好であった。なお、この試験は平成12年度受精卵移植普及定着化事業として行なわれた。

キーワード：伸長期胚盤胞、栄養膜小胞、胚移植、受胎率

### 緒 言

牛受精卵移植技術は改良効果に優れ、畜産物生産の向上に有効な繁殖手段として普及定着が図られてきた。しかしながら受胎率は50%前後で推移しており受胎率向上が大きな課題となっている。近年、栄養膜細胞が産生するインターフェロン $\alpha$ が妊娠認識因子に関与することが明らかとなってきた<sup>1)</sup>。また、栄養膜細胞を細切し短時間培養後形成される栄養膜小胞を胚と共移植することにより受胎率が向上する可能性があるという報告もある<sup>2)</sup>。

そこで、本試験においては、効率的な栄養膜小胞の作出方法、栄養膜小胞の凍結融解技術の確立、栄養膜小胞が卵巣機能に及ぼす影響、栄

養膜小胞と胚との共移植が受胎率に及ぼす影響について調査するとともに、受胎率の向上の可能性について検討を行なった。

### 材料および方法

#### 1 栄養膜小胞の作出

##### 1) 体内受精由来胚の回収 (SOV-AI区)

過剰排卵処理は供試牛に卵胞刺激ホルモン(FSH)を1日2回、3日間合計14AU(4, 4, 2, 2, 1, 1), 20AU(5, 5, 3, 3, 2, 2), 24AU(5, 5, 4, 4, 3, 3)の筋肉内投与をおこない3日目の朝に750 $\mu$ gのクロプロステノールまたは3日目の朝20mgタ15mgのジノプロストを筋肉内投与し、発情誘起後人工授精を行なった。胚回収は人工授精日を0日とし、14日目から17日目に直径約1cm $\times$ 0.5cmの灌流孔を開けて加工したバルーンカテーテルを用いて子宮灌流を行い回収した。

##### 2) 体外受精由来胚の回収 (IVF胚移植区)

と畜場由来の卵巣より、卵子回収法により卵

1 現福井県家畜保健衛生所

2 現山口県畜産試験場

3 現熊本県農業研究センター畜産研究所

4 現独立行政法人家畜改良センター奥羽牧場

5 現独立行政法人畜産草地研究所

胞液ごと卵子を吸引採取した。回収された卵子は 38.5℃, 5%CO<sub>2</sub>, 95%空気の気相条件で 22 ~ 24 時間成熟培養後, 体外受精をおこない 38.5℃, 5%CO<sub>2</sub>, 5%O<sub>2</sub>, 90%空気の気相条件で発生培養を行なった。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 1 頭当たり黄体側子宮に 10 個または両側子宮に 5 個ずつ移植した。胚の子宮内培養は 7 日から 10 日間 (胚の受精日を 0 日とすると 14 日から 17 日齢胚) 行ない, 生体由来胚と同様の方法で移植側子宮を灌流した。

### 3) 伸長期胚盤胞の切断及び培養

切断可能な長さまで伸長しており破れやちぎれがなく胚盤が明瞭な伸長期胚盤胞を 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, 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は 100 μMβメルカプトエタノール (βME), 20%FCS 加 TCM199 培養液を用いて, 38.5℃, 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。

### 2 栄養膜小胞の凍結・融解方法

栄養膜小胞の凍結は, 1.8M エチレングリコール (EG) を基本とし, それに 0.1M トレハロース (Tre), 0.1M シュクロース (Suc), 0.2Msuc を添加したダイレクト法, 1.8M グリセリン (Gly) によるステップワイズ法あるいは 1.8MGly に Suc を添加したワンステップ法で行なった。作出した栄養膜小胞を凍結液に投入し, 受精卵移植用の 0.25ml のプラスチックストローに吸引封入しプログラムフリーザーを用いて -7℃ で植氷, -0.3℃/分で -30℃ まで下げ液体窒素中に投入した。融解は凍結ストローを液体窒素から取り出し室温に 10 秒保持後, 30℃ から 35℃ の温水に 30 秒間浸漬して行なった。融解した栄養膜小胞は, 100 μMβME, 20%FCS 加 TCM199 培養液を用いて, 38.5℃, 5%CO<sub>2</sub>, 95%空気の気相条件下で 24 時間および 48 時間培養した。培養後小胞の形成により生存性を確認した。

### 3 栄養膜小胞単移植

凍結融解後 24 時間培養し形態的な異常を認めない栄養膜小胞 3 個を 20%CS 加 PBS で移植用プラスチックストローに吸引封入し, 発情後 7 日目の試験牛に移植を行なった。採血は発情日を 0 日として移植当日 (7 日目), 10 日目, 11 日目, 12 日目, 13 日目, 14 日目, 15 日目, 16

日目, 19 日目, 22 日目とし発情が見られない場合は発情徴候が見られるまで 3 日毎に行なった。途中で発情が現れたら次の採血をおこない中止した。必要な血漿量 (ヘリン加) は 1ml で採血後直ちに氷冷した。採血から分離までは 30 分で行なった。遠心分離は 3000rpm, 15 分で行い, -20℃ から -30℃ で凍結保存した。対照牛は発情後 7 日目に 20%CS+PBS のみの移植用プラスチックストローで移植用操作を行い, 同様に採血日に準じ採血を行なった。その後同じ牛を使って栄養膜小胞の単移植試験を行なった。プロジェステロンの測定は RIA により行なった。

### 4 栄養膜小胞と胚の共移植

栄養膜小胞と胚の共移植が受胎率に及ぼす影響を検討するため, 次の試験区を設定した。融解後共移植区

ダイレクト法 (耐凍剤に 1.8M エチレングリコールのみのもものと 0.1M トレハロースを添加したもの) で凍結された胚を融解後, 100 μMβME, 20%FCS 加 TCM199 培養液を用いて, 38.5℃, 5%CO<sub>2</sub>, 95%空気の気相条件下で 3~5 時間培養し, 形態的に異常を認めない胚と凍結融解した栄養膜小胞 3 個を 20%CS 加 PBS にて一緒に吸引封入したものを移植した。

### ダイレクト凍結共移植区

胚 1 個と栄養膜小胞 3 個を受精卵移植用ストローと一緒に吸引封入し, ダイレクト法 (耐凍剤に 1.8M エチレングリコールのみのもものと 0.1M トレハロースを添加したもの) により凍結をおこない融解したものを移植した。

### 対照区

同一時期に凍結融解した胚のみを移植したものを対照区とした。

### 5 繁殖状況調査

伸長期胚盤胞の回収後人工授精または受精卵移植を行なった 12 頭について栄養膜小胞の回収成績と受胎成績との関連について調査した。

## 結果および考察

### 1 栄養膜小胞作出試験 (表 1)

伸長期胚盤胞の回収および栄養膜小胞の作出状況を検討した結果, SOV-AI 区の 16 日目回収が最も効率良く TBV を作出できた。1 頭あたりの TBV 作出数では SOV-AI 区の 16 日目が最も良く, 次いで SOV-AI 区の 15 日目であった。切断可能数あたりの TBV 作出個数では IVF 胚移植区の 17 日目が最も多かった。次いで SOV-AI 区の

16日目回収であった。1頭からのTBV作出数が両試験区で17日目が少ないのは、17日目では完全体が回収できるとTBVの作出個数も増えるが伸長の結果、絡まったり千切れてしまうものが多くなり栄養膜小胞の作出が効率的でなくなることによるものである。品種毎による影響はなく、15日目もしくは16日目回収で良い結果が得られた。またIVF区による作出についても効率若干下がるものの回収可能であり、TBV作出のための方法としては十分に利用可能であった。

## 2 栄養膜小胞凍結試験

栄養膜小胞の凍結融解後の生存性を表2に示した。エチレングリコール(EG)によるダイレクト凍結法で83%以上の生存性が確認された。ステップワイズ法(1.8MGly)とワンステップ法(1.8MGly+Suc)では、それぞれ38.5%、5.6%と低率であった。これにより栄養膜小胞の凍結にグリセリンは不向きであり、栄養膜小胞の凍結が現行のダイレクト凍結保存法で可能であることが明らかとなった。

## 3 栄養膜小胞単移植試験

栄養膜小胞単移植による黄体遅延作用および体内ホルモン動態(血中プロジェステロン濃度)を図1、2に示した。発情回帰日数では試験区および対照区ともに約22日で差がなかったが、24日以上周期になったものが試験区で7頭、対照区で1頭。これにより栄養膜小胞の移植により発情が遅延する個体があることが確認できた。また血中プロジェステロン濃度においては試験区が量、期間ともに多くなる傾向があった。これにより栄養膜小胞が黄体退行に少なからず影響を及ぼしていることが示唆された。

## 4 栄養膜小胞と胚との共移植試験

栄養膜小胞と胚の共移植の結果を表3に示した。融解後共移植区では凍結液に0.1Mトレハロースを添加したもので11頭中2頭受胎し、受胎率は18.2%であった。1.8Mエチレングリコールのみの凍結液では7頭中4頭受胎し受胎率は57.1%であった。対照区では0.1Mトレハロースを添加したもので、11頭中4頭受胎し受胎率は36.4%、1.8Mエチレングリコールで凍結した胚では10頭中4頭で受胎率は40.0%であった。ダイレクト凍結共移植区では凍結液に0.1

Mトレハロースを添加したものは31頭移植を行い17頭が受胎し受胎率は54.8%であった。凍結液にトレハロースを添加していないものは32頭に移植を行ない22頭が受胎し受胎率は68.8%であった。対照区では0.1Mトレハロースを添加したもので43頭に移植を行ない17頭が受胎、受胎率は39.5%であった。トレハロースを添加していないものは32頭に移植を行ない16頭が受胎、受胎率は50.0%であった。栄養膜小胞共移植区全体では81頭に移植を行い受胎した頭数は45頭、受胎率は55.6%、対照区全体では96頭に移植を行い41頭が受胎し、受胎率は42.7%であった。この結果、栄養膜小胞と胚との共移植により受胎率を向上させる可能性が示唆された。

## 5 胚回収後の繁殖状況

胚回収試験を行なった試験牛の繁殖状況調査を表4に示した。栄養膜小胞が作出可能な伸長期胚盤胞が回収された試験牛のうち、回収後人工授精または受精卵移植を行なった6頭全頭が1回目で受胎した(妊娠率100%)。一方、栄養膜小胞が作出できなかった試験牛のうち試験後人工授精または受精卵移植をおこなった6頭では1回目で受胎したものが3頭(妊娠率50%)であった。例数は少ないが栄養膜小胞作出可能な伸長期胚盤胞が回収された牛ではその後の繁殖成績も良い傾向がうかがわれたことから、栄養膜小胞の作出成績が受胎牛の評価法として利用できる可能性が示唆された。

## 参考文献

- 1) 今川ら、1997. 反芻動物の妊娠認識とインターフェロン Journal of Repro.43:j91-j98
- 2) 橋谷田ら、平成9年度家畜改良センター年報 Vol6, 103

表1 栄養膜小胞の作出結果

区別	回収時期	頭数	回収した伸長期胚盤胞の			培養前の切断個数	培養後小胞形成個数	1頭あたりのTBV作出数	切断可能数あたりのTBV作出個数
			総個数	切断可能数	切断不可能数				
IVF 胚移植区	14	22	77	34	29	271	223	10.1	6.6
	15	3	6	4	0	21	17	5.7	4.3
	16	8	22	10	3	89	79	9.9	7.9
	17	9	47	4	43	70	70	7.8	17.5
SOV-AI 区	14	23	117	52	54	449	399	17.3	7.7
	15	14	93	51	39	439	423	30.2	8.3
	16	17	162	94	45	1118	975	57.4	10.4
	17	17	144	48	78	447	407	23.9	8.5

表2 栄養膜小胞凍結試験

凍結液組成	融解個数	融解後 24 時間培養での		融解後 48 時間培養での	
		生存数	生存率	生存数	生存率
1.8MEG	82	73	89.0%	68	82.9%
1.8MEG+0.1MTre	388	239	61.6%	339	87.4%
1.8MEG+0.1MSuc	89	57	64.0%	77	86.5%
1.8MEG+0.2MTre	88	73	83.0%	82	93.2%
1.8MGly (ステップ°ワイス°)	39	9	23.1%	15	38.5%
1.8MGly+Suc (ワンステップ°)	72	0	0.0%	4	5.6%

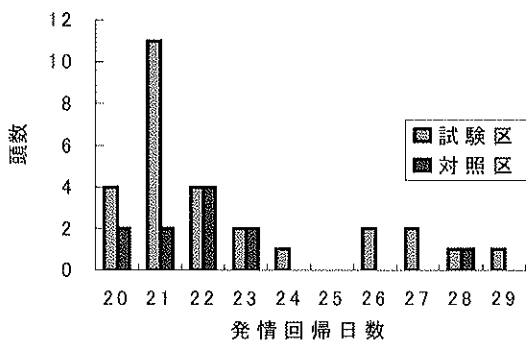


図1 TBV 単移植による発情回帰日数

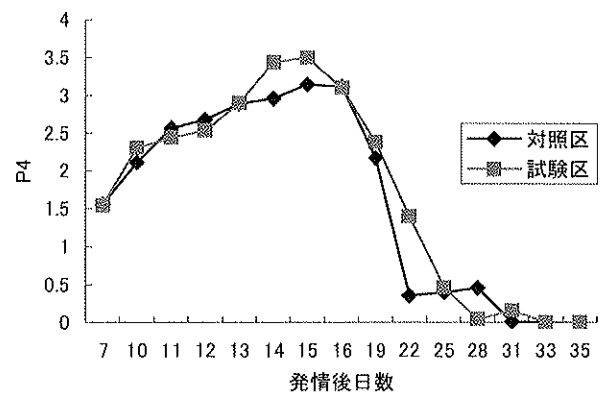


図2 TBV 単移植が血中プロジェステロンに及ぼす影響

表3 TBV と胚との共移植が受胎率に及ぼす影響

		頭数	受胎数	受胎率	頭数	受胎数	受胎率
TBV 供 移植区	融解後培養胚(1.8MEG+0.1MTre)+培養 TBV	11	2	18.2%	81	45	55.6%
	融解後培養胚(1.8MEG)+培養 TBV	7	4	57.1%			
	1.8MEG+0.1MTre(胚+TBV)がイレット凍結	31	17	54.8%			
	1.8MEG (胚+TBV)がイレット凍結	32	22	68.8%			
対照区	融解後培養胚(1.8MEG+0.1MTre)	11	4	36.4%	96	41	42.7%
	融解後培養胚(1.8MEG)	10	4	40.0%			
	1.8MEG+0.1MTre(胚)がイレット凍結	43	17	39.5%			
	1.8MEG (胚)がイレット凍結	32	16	50.0%			

表4 胚回収後の繁殖状況調査

	AI または ET した頭数	妊娠頭数	妊娠率
切断可能な伸長期胚盤胞が回収できた区	6	6	100.0%
切断可能な伸長期胚盤胞が回収できなかった区	6	3	50.0%