

受卵牛の受胎率向上に関する研究（第3報）

栄養膜小胞の効率的な作出のための回収時期の検討

渡辺晃行・戸塚 豊^{*1}・根本聰実・韋澤圭二郎

要 約

体外受精し移植した胚と体内受精胚を14日目に回収し、得られた伸張期胚盤胞を細切し、栄養膜小胞を作出することができた。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17日目までのばして作出了したところ伸張期胚盤胞1個当たり作出できた栄養膜小胞は増加した。

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）を胚と共に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¹⁾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。このため栄養膜小胞の凍結・融解は可能であることが示唆された。そこでより効率的な栄養膜小胞の作出のために著者らは回収時期の検討を行なっており、14日目受精について報告した。²⁾ 今年度は更に受精17日目の成績について調査した。

材料及び方法

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、17日目に回収した伸張期の胚盤胞

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了した胚の後期桑実胚～拡張期胚盤胞を発情後7日目に移植を行ない17日目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

10頭の供試牛に卵胞刺激ホルモン（アントリノ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) 17日目胚の回収

胚回収は人工授精後17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、直徑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。

*1 現 茨城県県北家畜保健衛生所

なお成熟培養、媒精は38.5°C, 5%CO₂, 95%空気で、発生培養は38.5°C, 5%CO₂, 5%O₂, 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2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10日間（胚の受精日を0日とすると17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%CO₂, 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。

結果および考察

1. 17日目胚の回収（表）

体内受精では、供試牛10頭から26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16個であった。

一方体外受精では、作出了36個の胚を2頭の牛に移植し、4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0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16個の胚を細切し、139個の栄養膜片が得られた。また、これらの栄養膜片を培養した結果、75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、17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。

受精後14日目の伸張期胚盤胞から作出了栄養膜細胞片は体内受精由来胚20個および体外受精由来胚4個の併せて24個の受精胚から205個作出され、栄養膜小胞は173個であった。²⁾

表 14日目および17日目回収時期の比較

回収日	由 来	採取回数			切 可能数	切 片個数	小胞形成数
		頭数	総個数	可能数			
14日目	IVF	3	7	4	12	9	
	SOV-AI	4	28	20	193	164	
17日目	IVF	2	4	0	0	0	
	SOV-AI	10	26	16	139	75	

また1個の受精胚から作出される栄養膜小胞は14日目回収では平均で7.2個であった。²⁾今回17日目で回収した結果、受精胚1個あたり平均4.7個であった。

今回は回収時期に注目して受精後14日目の回収と17日目の回収で比較検討を行なった結果は14日目回収のほうが17日目の回収に比べ1個あたりの作出数は多かった。しかし、受精後14日目の回収では3mm以下の小さな伸張期胚盤胞が多く観察され、また受精後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のためには、細切処理に適した伸張期胚盤胞の回収時期の検討をさらに行なう必要がある。

また、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しているので、今後は受精胚と栄養膜小胞の共移植による受胎への影響及び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