

# ウシ栄養膜小胞およびhCGの併用によるウシ凍結胚移植の 受胎率向上の検討

浦田 博文・億 正樹・青山 譲

## 要 約

ウシ凍結胚移植において、移植前にヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) を投与し移植時に栄養膜小胞 (Trophoblastic vesicle、以下TBV) を共移植することで、受胎率を向上することができるか検討した。hCG + TBV 共移植区の受胎率は45.0% (9/20)、対照区は48.3% (14/29) であった。またTBVの再凍結融解後の生存性について調査した。TBVは再凍結融解後も68.8%と高い生存性を示し、一度凍結保存したTBVを採胚に合わせて融解して胚と同一ストローに凍結保存することで、フィールドでも一般のダイレクト移植と同様に胚とTBVとの共移植ができることが示された。

## 緒 言

近年、胚とTBVとの共移植による妊娠認識因子の補強<sup>1) 2)</sup>や受胎牛へのhCG投与による黄体中期の主席卵胞の機能抑制や黄体機能亢進といった積極的な受胎率向上への試みが図られている。しかし、これらの技術が単一で改善されても他の要因が不十分であれば胚移植成功の十分条件とは成り得ず、受胎に不足している要因が改善され、受胎要因が可能な限り整った条件下ではじめて効果的な受胎率の向上を図ることが出来ると思われる。そこで今回胚側と受胎牛側双方からの受胎率向上の検討として、hCG投与およびTBVと胚の共移植を組み合わせた試験を行い、ウシ胚の受胎性に及ぼす効果について検討した。併せて、作出したTBVの効率的活用方法について検討した。

なお、本試験は共同試験5県（茨城、福井、山口、熊本、奈良）によるもので、奈良県で実施した成績を取りまとめたものである。

## 材料及び方法

### 1. hCG投与およびTBVと胚の共移植

#### 1) 共移植に用いたTBV

共移植に用いたTBVは、奈畜研報第29号<sup>3)</sup>の方法により作出した。これらTBV3個を胚と共に、またはTBV3個のみを0.25mlストローに吸引し、エチレングリコール (EG) によるダイレクト法により凍結を行った。

#### 2) hCG投与およびTBVの共移植

試験区では、発情後5日目または7日目の受胎牛にhCG1500IU（プベローゲン、三共）を筋肉内投与し、7日目にダイレクト法により共移植を行った。TBV3個のみで凍結したものを使用する時は、まず胚のみをダイレクト法により移植した後、同側子宮角にTBV3個をダイレクト法により移植した。対照区は、ダイレクト法による胚のみの移植とした。

### 2. TBVの再凍結融解後の生存性

TBV 3 個を 0.25ml ストローに吸引し、EG によるダイレクト法により凍結、融解後は 100 $\mu$ M  $\beta$ ME + 5% CS-TCM199 培養液 (TBV 3 個/750 $\mu$ l/well) で 24 時間培養し、再形成した TBV を再度 EG により凍結、融解後 24 時間培養して TBV の再形成を確認した。

また培養液中のインターフェロン $\tau$  (IFN $\tau$ ) を測定するため、培養後 TBV を除いた培養液をエッペンチューブに移し、フラッシング後、上清 500 $\mu$ l にアスピリン 1% 添加し、-20 $^{\circ}$ C で保存した。TBV の入っていない培養液のみで同様の操作をしたものを対照とした。

## 結 果

### 1. HCG 投与および TBV と胚の共移植

試験区の受胎率 45.0%、対照区の受胎率 48.3% で、両区の間には差は無かった (表 1)。移植胚の品質別および受胎牛の黄体ランク別に受胎率を比較してみたが、両区の間には差は無かった (表 2、表 3)。

表 1 試験区および対照区の受胎成績

区 分	移植頭数	受胎頭数	受胎率 (%)
試験区	20	9	45.0
対照区	29	14	48.3

表 2 試験区および対照区の胚品質ランク別受胎成績

品 質 ランク	試験区			対照区		
	移植頭数	受胎頭数	受胎率 (%)	移植頭数	受胎頭数	受胎率 (%)
Very Good	9	5	55.6	15	9	60.0
Good	10	4	40.0	13	5	38.5
fair	1	0	0.0	1	0	0.0

表 3 試験区および対照区の黄体ランク別受胎成績

黄 体 ランク	試験区			対照区		
	移植頭数	受胎頭数	受胎率 (%)	移植頭数	受胎頭数	受胎率 (%)
A	5	3	60.0	18	10	55.6
B	11	5	45.5	9	4	44.4
C	4	1	25.0	2	0	0.0

### 2. TBV の再凍結融解後の生存性

合計 36 個の TBV を融解した結果 32 個が生存 (生存率 88.9%)、この生存した 32 個を再度凍結、融解した結果 20 個が生存 (68.8%) であった (表 4)。

融解後の TBV 培養液について、IFN $\tau$  を測定する予定であったが、まだ実施できていない。

表4 TBV 再凍結融解後の生存性

TBV ロット	1回目	1回目融解 24 時間培養		2回目	2回目融解 24 時間培養	
	融解個数	生存個数	生存率(%)	融解個数	生存個数	生存率(%)
SOV14-8	12	12	100.0	12	11	91.7
IVF 5-1	12	10	83.3	10	3	30.0
SOV14-6	12	10	83.3	10	8	80.0
合計	36	32	88.9	32	22	68.8

## 考 察

平成 13、14 年度に実施した TBV と胚の共移植試験では、期待していた受胎率の向上がみられなかった（試験区 33.3%、対照区 30.8%）。胚移植の受胎率には胚の状態や受胎牛の状態など様々な要因が関与するため、TBV の共移植による妊娠認識因子の補強という胚側からの受胎率向上策だけでは十分な効果が出なかったものと思われる。受胎牛側からの受胎率向上策としては、黄体中期の主席卵胞の機能抑制や黄体機能亢進を目的とした hCG の投与が試みられている。そこで今回、hCG 投与した受胎牛への TBV と胚の共移植試験を行った結果、試験区 45.0%、対照区 48.3% で受胎率に差は無く、hCG+TBV 共移植による受胎率向上はみられなかった。しかし共同試験参加 5 県の成績を集計すると、試験区 56.9%、対照区 45.5% となり、試験区で受胎率が高くなる傾向が窺えた ( $P < 0.1$ )。本県でも、もう少し例数を増やして調査することが必要である。

TBV と胚の共移植を広くフィールドで実施するためには、TBV と胚を同一ストローに吸引し、ダイレクト法で凍結しておくことが必要であるが、そのためには採胚日と TBV 作出日の同調等スケジュール調整が大変であった。また採胚個数に対し TBV 作出個数が多いときには、余った TBV は単独で凍結保存しなければならなかった。今回、TBV の再凍結融解試験により、一度凍結保存した TBV でも融解後に生存を確認できたものについては、再度凍結融解しても約 70% と高い確率で生存することが示された。このことにより採胚状況に合わせて必要な個数だけ TBV を融解し、同一ストローで凍結保存することが可能となった。

凍結融解後、または再凍結融解後の TBV がどれくらいの IFN $\tau$  を産生しているかを調査する目的で、TBV 培養液を採取保存したが、測定は未実施である。今後測定結果をもとに共移植に使用する TBV の個数を再検討することも必要と思われる。

## 参考文献

- 1) 橋爪一善：妊娠認識 畜産先進技術最新研究情報・特別号 II：P44-48、(2001)
- 2) 橋谷田豊ら：ウシ栄養膜小胞との共移植によるウシ切断二分離胚および凍結胚の受胎性向上の検討 第 4 回日本胚移植研究大会講演要旨集：P38、(1997)
- 3) 浦田博文ら：ウシ栄養膜小胞の効率的な作出のための伸長期胚盤胞回収時期の検討 奈畜研報 29 P1 - 3、(2003)