

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

浦田 博文・億 正樹・大西 圭史・青山 譲

要 約

胚と共移植することを目的とした栄養膜小胞 (Trophoblastic vesicle、以下 TBV) を効率的に作出するための伸長期胚盤胞の最適な回収時期について検討した。過剰排卵処理—人工授精後 13 日目から 17 日目に子宮灌流を行い伸長期胚盤胞を回収し、TBV を作出した。供試牛 1 頭当たりの伸長期胚 (完全体) 回収個数および TBV 作出個数はそれぞれ 13 日目で 0 個、0 個、14 日目で 3.5 個、54 個、15 日目で 0.3 個、20 個、16 日目で 1 個、45 個、17 日目で 0 個、0 個であった。また TBV と胚の共移植の受胎率は 33.3% (8/24) で対照区 30.8% (8/26) と差はなかった。

緒 言

牛胚操作技術の目覚ましい発展により、体外受精胚、雌雄判別胚、分割胚、クローン胚等、様々な価値を付与された胚の生産が容易になってきている。しかしながらそれらの胚も含めた受精卵移植技術の普及定着化には、受胎率の高位安定化が必要不可欠である。これまでの研究の結果、移植胚の培養あるいは凍結手法の改善や、受胎牛への適切な処置、選定などにより受胎率向上が図られてきた。近年、着床期の伸長期胚の栄養膜細胞が産生するインターフェロン τ が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との報告があり¹⁾、さらに栄養膜細胞を細切し、短時間培養後に形成される TBV を胚と共移植することにより受胎率向上の可能性が報告されている^{2) 3)}。

平成 12 年度より TBV を利用した受胎率向上の実用化をめざし、TBV の作出および凍結方法の検討を行ってきた。今回は TBV 作出に用いる伸長期胚盤胞の最適な回収時期について検討した。

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. TBV 作出

1) 伸長期胚盤胞の生産

供試牛には伝染性疾患履歴のない健康な黒毛和種を用いた。回収時期として過剰排卵処理—人工授精後 13 日目から 17 日目の 5 日間を設定し、ウシ胚回収用に加工した 2 孔式バルーンカテーテルを用い、子宮灌流により回収した。

2) 回収伸長期胚盤胞の評価と TBV の作出

回収伸長期胚盤胞は、肉眼および顕微鏡下で観察し、伸長期の胚盤胞で栄養膜に破れやちぎれのないものを完全体とし、3mm以下の小さいものや破れて内部細胞塊が確認できないものは切断不能胚とした。TBV の作出には、約 3mm以上の完全体を供試した。この完全体を 1~1.5mmに細切し、100 μ M- β メカプト

エナール、20%CS加TCM199培養液で、5%CO₂、95%空気、38.5°Cの条件下で約18時間培養後、小胞の形成が認められたものをTBVとした。

2. TBVと胚の共移植

TBVと胚の共移植は、凍結融解後24時間から48時間培養して小胞の形成されたTBV3個と凍結融解した胚1個を同一ストローに再吸引して移植、またはTBV3個と胚1個を同一ストローに吸引して凍結し、融解後ダイル外法で移植した。なお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。

結 果

1. TBV作出

伸長期胚盤胞の回収およびTBVの作出状況を表1に示した。回収日を13～17日目に設定した時の1頭当たりの完全体回収個数は0個、3.5個、0.3個、1個、0個で、14日目で最も多く、13日目、17日目では完全体は得られなかった。回収総数に占める完全体の割合は0%、70%、12.5%、18.8%、0%となり、14日目が高かった。13日目で切断不能であったものは全て3mm以下であった。14日目～17日目で切断不能であったものは全てちぎれたもので、3mm以下のものはなかった。13～17日目で1個の完全体から得られるTBV数は0個、15.4個、60個、45個、0個で、14日目に比べ15、16日目で多かった。その結果13～17日目で1頭当たりのTBVの作出は0個、54個、20個、45個、0個であった。

表1 回収時期の違いによるTBV作出成績

回収日	頭数 (頭)	回収伸長期胚盤胞			TBV作出数			
		回収数 (個)	完全体 (個)	(割合) (%)	切断不能 (個)	作出総数 (個)	1頭 あたり	完全体 あたり
13	1	6	0	(0)	6	0	0	0
14	2	10	7	(70.0)	3	108	54	5.4
15	3	8	1	(12.5)	7	60	20	60.0
16	3	16	3	(18.8)	13	125	45	45.0
17	1	11	0	(0)	11	0	0	0

2. TBVと胚の共移植

TBVと胚の共移植の受胎率は33.3%で対照区30.8%と差はなかったが、共移植区では不受胎牛の発情回帰日数が26.4日と対照区の22.8日より長くなる傾向がみられた。(表2)

表2 移植成績

区	移植頭数(頭)	受胎頭数(頭)	受胎率(%)	不受胎牛の	
				発情回帰日数(日)	黄体遺残(頭)
TBV共移植	24	8	33.3	26.4	2
対 照	26	8	30.8	22.8	1

考 察

前報では、TBVの作出方法および凍結融解後の生存性について報告した。今回は効率的にTBVを作出するためにより長く伸長した胚盤胞を得ようと、回収日を13～17日に設定し、最適な回収時期について検討した。13日の回収は1頭であったが、回収胚6個全てが3mm以下で伸長が不十分で切断できなかった。14日以降では、胚日齢が進むほど回収数に占める完全体の割合が減少し切断不能胚が増加した。これは長く伸びた胚が回収の際に絡まったり破れたりしたためであった。得られた完全体1個あたりのTBV作出数は14日に比べ15、16日で多かったが、完全体は14日が一番多く得られているので、1頭あたりのTBV作出数は14日が一番多く、14日目最適であった。共同で試験している5県の成績では、16日が完全体の割合、完全体あたり作出数及び1頭あたり作出数ともに多く、16日目最適であった。本県では14日では3mm以下の胚は回収されなかったが、他県では14日でも3mm以下の胚が回収され、15、16日の方が長く伸長した完全体が得られているようである。飼養環境や個体差により子宮内での胚の発育速度に差があるのではないかと思われる。5県とも13日、17日ではTBV作出数は極端に低下しているため、14～16日の間で各場所の試験環境により臨機応変に対応するのが良いと思われる。今後胚とTBVの共移植を簡易に行うには、胚とTBVを同一ストローに凍結しておくことが必要であると思われる。胚とTBVを同時に凍結するのであれば、過剰排卵処理—人工授精等の作業上、14日目の回収が最適と考えられる。

今回の共移植試験では、受胎率については対照区との間に差は認められなかったが、不受胎牛の発情回帰日数は長くなる傾向がみられた。これはTBVが影響した可能性もあり、今後もう少し移植頭数を増やして調査、検討を行ってきたい。

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：44-48、(2001)
- 2) 小岩井農牧(株)技術研究センター、(社)北海道家畜改良事業団 核移植卵の移植方法の研究 畜産バリエーション実用化技術開発促進事業・平成7年度開発報告書：99-120
- 3) 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：38 (1997)