

ウシ体内および体外受精胚を用いた栄養膜小胞の作出 および凍結融解後の生存性

浦田 博文・小財 千明*・億 正樹・上村 佳代・青山 譲
*奈良県家畜保健衛生所 業務第一課

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) の効率的な作出方法および凍結融解後の生存性について検討した。過剰排卵処理—人工授精後 14 日目 (SOV 区) および体外受精胚を複数個移植後 7 日目 (IVF 区) の黒毛和種より子宮灌流を行い伸張期胚を回収し、栄養膜細胞を細切して TBV を作出し、両区の TBV 作出効率を比較した。供試牛 1 頭当たりの伸張期胚回収個数および TBV 作出個数はそれぞれ SOV 区で 2 個、41 個、IVF 区で 3.4 個、35.6 個であった。また、耐凍剤としてグリセリン (Gly) およびエチングリコール (EG) を用いて TBV を凍結し、融解—培養後 48 時間の生存率は Gly 区 43.3%、EG 区 94.7%であり、EG 区の方が高く、TBV は EG を用いれば胚と同様の凍結方法で保存が可能であることが示された。

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、着床期の伸張期胚の栄養膜細胞が産生するインターフェロン α 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)}。

そこで今回、胚と共移植することを目的とした TBV の効率的な作出方法および凍結融解後の生存性について検討した。

材料及び方法

1. TBV 作出試験

1) 伸張期胚の回収

供試牛として伝染性疾患履歴のない健康な黒毛和種を用い、以下の 2 種類の方法で伸張期胚の回収を行った。

①SOV 区：過剰排卵処理により発情を誘起し、人工授精後 14 日目に 18Fr 2 孔式バルーンカテーテルを用いて子宮灌流を行った。

②IVF 区：体外受精後 7 日目胚 (新鮮胚および凍結胚) を複数個、発情周期 7 日目の供試牛の子宮に移植し、周期 14 日目に 18F 2 孔式バルーンカテーテルを用いて子宮灌流を行った。

2) TBV の作出

灌流液からの胚の検索は、肉眼および鏡検下で行い、回収した伸張期胚を 90 mm プラスチックシャーレ中の 20%CS 加 PBS に投入。外科手術用メスを用いて、伸張期胚の内部細胞塊をその周辺細胞とともに座滅するように押し切り切除し、同様に栄養膜を 1~1.5 mm 幅に細切した。細切した栄養膜は 20%CS、100 μ M- β メルカプトエタノール添加 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 凍結融解試験

試験 1) で作出した TBV を、凍結媒液として 20%CS 加 PBS (+) 溶液に 1.8M-グリセリンを添加したもの (Gly 区)、1.5M-エチレングリコールと 0.2M-ショクロースを添加したもの (EG 区) を用い、0.25ml のプラスチックストローに各 3~10 個吸引封入し、10 分間平衡させた。凍結はプログラムフリーザーを用い、-7°C で植氷、-0.3°C/分の緩慢冷却により -30°C に到達後、液体窒素に投入した。融解は凍結ストローを室温下で 10 秒間保持した後、30°C の温湯に入れて行った。融解後の耐凍剤除去については Gly 区はショクロースを用いた 3 段階希釈で、EG 区はダイレクトで行った。その後、20%CS、100 μ M- β メルカプトエタノール添加 TCM199 培養液中で、5%CO₂、95%空気、38.5°C の条件下で培養し、24 および 48 時間後に、小胞の再形成の観察により生存性を確認した。

結 果

1. TBV 作出試験

SOV 区には 1 頭を供試した。回収された伸張期胚は 2 個 (32 mm、55 mm) で、合計 41 個に切断し、培養の結果 41 個全てが TBV を形成した (TBV 形成率 100%)。即ち伸張期胚 1 個から 20.5 個、供試牛 1 頭当たり 41 個の TBV が得られた。IVF 区には 5 頭を供試した。合計 79 個の体外受精胚を移植し、うち 17 個が伸張期胚として回収され (1~45 mm、回収率 21.5%、平均 3.4 個/頭)、合計 201 個に切断し、培養の結果 178 個が TBV を形成した (TBV 形成率 88.6%)。即ち伸張期胚 1 個から 10.5 個、供試牛 1 頭当たり 35.6 個の TBV が得られた (表-1)。また移植胚数に対する胚回収率は新鮮胚で 24%、凍結胚で 16% と、新鮮胚の方が高かった。

表-1 TBV 作出成績

区分	Lot NO	IVF 胚 区分	IVF 胚 移植数	伸張期胚 回収個数	平均胚長 mm	切断後 個数	TBV 個数
SOV	SOV-1	—	—	2	43.5	41	41
IVF	IVF-1	新鮮	14	2	7.5	11	11
	IVF-2	新鮮	20	4	29.0	128	110
	IVF-3	新鮮	20	7	9.0	50	45
	IVF-4	凍結	20	3	3.7	10	10
	IVF-5	凍結	5	1	2.0	2	2
	平均	—	15.8	3.4	12.2	43.6	35.6

回収された伸張期胚の長さ (平均胚長) は IVF 区で 12.2 mm (新鮮胚: 14.9 mm、凍結胚: 3.3 mm)、SOV 区で 43.5 mm と SOV 区で長かった。

2. TBV 凍結融解試験

Gly 区 30 個、EG 区 38 個について凍結融解を行った。培養後小胞の再形成が認められたのは、24 時間後で Gly 区 7 個 (23.3%)、EG 区 34 個 (89.5%)、48 時間後の継続観察を加えると Gly 区 13 個 (43.3%)、EG 区 36 個 (94.7%) であり、明らかに EG 区の方が生存率が高かった (表-2)。

表-2 TBV 凍結融解後の生存成績

凍結区	融解 TBV 個数	24 時間後生存数 (率)	48 時間後生存数 (率)
Gly 区	30	7 ^a (23.3%)	13 ^a (43.3%)
EG 区	38	34 ^b (89.5%)	36 ^b (94.7%)

a-b: 有意差有り、 $P < 0.01$ (χ^2 test)

考 察

我々は今回、胚と共移植することを目的とした TBV の効率的な作出方法および凍結融解後の生存性について検討を行った。その結果、供試牛 1 頭当たりの伸張期胚の回収個数は IVF 区が SOV 区を上回ったが、TBV の作出効率では SOV 区の方が若干上回った。しかし両区間に大差はなく、TBV の作出方法として、各場所の試験環境により臨機応変な対応が可能であることが示された。体外受精胚が比較的得られやすい本県では、過剰排卵処理の労力および牛のダメージ等を考慮すると、IVF 区での TBV 作出法の方が容易であると思われる。今後、TBV 生産の安定化のためには、伸張期胚の回収時期や IVF の移植個数、シングルフラッシュによる伸張期胚の回収などについても例数を増やして検討していく必要があると考える。また凍結融解後の生存率については Gly 区に比べ EG 区の方が明らかに高かった。これは細胞毒性は強いが細胞透過性のより優れた EG が容易に TBV の深部まで浸透したためと考えられる。EG 区では融解後 24 および 48 時間培養で TBV の生存率は 90% 前後と高かったことから、TBV は EG を凍結保護剤とした胚と同様な緩慢冷却凍結法により凍結保存が可能であり、胚との共移植にも使用可能であることが示された。今後、生産した TBV と胚との共移植を行い、TBV 付加による受胎支援効果について検討を行っていききたい。

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 畜産バテク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)