

ウシ栄養膜小胞の作出と凍結方法の検討

宮地利江・横田昌己・近藤守人

The examination to make cow Trophoblast vesicle, and freeze preservation.

Rie MIYACHI, Masami YOKOTA, Morito KONDOU

要 約

受胎に関与すると報告されている栄養膜小胞 (Trophoblast Vesicle 以下 TBV) を胚と同時に移植 (共移植) することで、受胎率を向上させることが可能であるかを検討した。試験は共移植に用いる TBV の体内受精胚からの作出効率化を目的として胚日令 7 日以上を経過した伸張期胚盤胞の回収日の検討を行った。また、胚と同一の凍結保存の検討および移植試験を実施した。TBV 作出は、経産黒毛和種のベ 7 頭を用いて過剰排卵処置を行い、回収日令を 14, 15, 16, 17 日に設定し、伸張期胚盤胞を回収後切断分離して TBV を作出しその効率を検討した。また、作出された TBV を 2 種類の凍結溶媒を用いてダイレクト法にて凍結し、融解後の生存性を検討した。移植試験は作出した TBV を 3 個と、胚 1 個を同一ストローに詰め共移植した。その結果、伸張期胚盤胞回収および TBV 作出には、16 日目回収が適している可能性が示唆された。凍結保存は胚と同一の保存が可能であることが示唆された。移植は TBV との共移植区では受胎率が 20% であった。

緒 言

現在、ウシの受精卵移植は広く普及している。この技術を活用し効率的に仔ウシを生産するためには受胎率の向上が必要である。作出に使用される体外培養系では、近年着床期胚 (伸張期胚盤胞) を細切し、短時間培養後に形成される栄養膜小胞 (Trophoblastic vesicle 以下 TBV) を共培養することで、TBV から分泌される物質 (インターフェロン τ) が胚の成長を助長するなどの報告がされており、TBV および TBV から分泌されるインターフェロン τ の役割が注目されている。また、インターフェロン τ は、胚と母胎間の妊娠認識や、黄体退行阻止により妊娠維持に関与しているとの報告があり⁴⁾、TBV と胚を共移植することで、TBV から分泌されたインターフェロン τ が受胎に関与し、受胎率が向上するとの報告もみられる。しかし、共移植に使用する場合、食肉処理センターから得た血統の不明な TBV を用いるより、胚と同一な血統の TBV を用いた方が、野外応

用の観点から有用であると考えられる。しかし、TBV 作出の手法は体外受精胚からのものが多く、体内受精胚から作出する報告は少ない^{1)・2)・3)}。

そこで、受胎率向上を目的として移植試験を行うにあたり、まず体内受精胚からの TBV 作出の効率化を目的として、過剰排卵処理からの作出における回収日の違いによる作出効率の検討を実施した。また、TBV の移植用ストローにおける胚と同一手法による凍結保存、その生存性について検討し、TBV と胚の共移植試験を実施した。

試験方法

1 TBV 作出

移植に使用する TBV は胚と同じ由来のものを用いることとした。つまり、同一の供胚牛および種雄牛の精液を用いた。供胚牛は当场繫養経産黒毛和種のベ 7 頭を用いた。

過剰排卵処置は自然発情確認後、黄体の形成を確認して、9 または 10 日目から卵胞刺激ホルモン (アントリン、デンカ製薬)、20AU を 3 日

間漸減投与して行った。投与開始48時間目にプロスタグランジン F2 α (エストラメイト、住友製薬) を750 μ g投与し、発情誘起を行った。

採胚は人工授精日を0日として14から17日目の4通りで実施した。また、灌流液は0.1%仔牛血清(CS)加乳酸リンゲルを用い、バルーンカテーテルは直径3.5mmの灌流孔を開けた2孔式バルーンカテーテルを使用した。

得られた伸長期胚盤胞は、20%CS加リン酸緩衝液(PBS)で洗浄後、形態の観察を行い、長さを測定した。形態の観察は実体顕微鏡下で行い、破損のないものを完全体とし、破損が確認されたものを不完全体と分類した。その後、切断に供せる3mm以上の大きさで胚盤を判別できた伸長期胚盤胞をTBV作出に供した。胚盤の両端を外科用メスを用いて座滅切断し、その後、1から1.5mm幅で同様に細切した。細切した栄養膜の断片を100 μ M β -ME(β -メルカプトエタノール)+20%CS加PBS液にて38.5 $^{\circ}$ C,5%CO₂,95%空気の気相条件下で12時間培養後、小胞の形成がみられた栄養膜を栄養膜小胞とした。

2 凍結融解

TBVの凍結は、ダイレクト法で行った。凍結溶媒は以下の2種類を用いた。

Su区:0.1Mスクロース(Su)+1.8Mエチレングリコール(EG)+20%CSPBS

Tre区:トレハロース(Tre)+1.8Mエチレングリコール(EG)+20%CSPBS

TBVは2個から10個を胚移植用の0.25ml容のプラスチックミニチュアストローに封入後、プログラムフリーザーを用い-7 $^{\circ}$ Cで2分保持後、植氷を行い、-0.3 $^{\circ}$ C/分の緩慢冷却にて-30 $^{\circ}$ Cに到達後、液体窒素に投入した。

TBVの融解は、液体窒素からストローを取り出して空気中に6秒保持後、30 $^{\circ}$ Cの温湯中にて融解した。20%CSPBSによる20分間の平衡後100 μ M β -ME(β -メルカプトエタノール)+20%CS加PBS液に投入し、38.5 $^{\circ}$ C,5%CO₂,95%空気の気相条件下で培養開始後24時間および48時間目に、小胞の再形成の観察により生存性を確認した。

3 移植試験

試験に供した胚は、凍結融解後20時間培養して生存性を確認した胚盤胞1個および、同様に生存

性を確認したTBV3個を20%CS加PBS液を用いて移植用ストローに詰めて実施した。また、対照区は胚盤胞1個のみを受胎牛に移植した。

結果

1 TBV 作出

過剰排卵処理後の伸長期胚盤胞の回収は14~17日の4通りで実施した。14日目は3回実施し、15、16日目はおのおの1回、17日目は2回実施した。1回あたりの伸長期胚盤胞の回収数は、それぞれ22.7個、10.0個、20.0個、15.5個であった(表1)。平均の長さはそれぞれ0.8cm、0.8cm、2.7cm、1.9cmであった(表2)。回収された伸長期胚盤胞のうち、完全体であったものは14日目が68個中13個(19.1%)で、15日目は10個中5個(50.0%)となり、16日目は20個中1個(5.0%)で、17日目は37個中0個(0.0%)であった(表3)。

作出されたTBV数は14日目が205個、15日目が32個であり、16日目は183個となり、17日目は86個であった(表4)。一回あたりではそれぞれ68.3個、32.0個、183.0個、38.5個と16日目が高い傾向が見られた。また、回収された伸長期胚盤胞一個あたりの作出TBV数は、それぞれ3.0個、3.2個、9.2個、2.1個と、16日目が多く作出できる傾向がみられた。

2 凍結融解後の生存性

Su区では融解数37個のうち、24時間後に生存していたのが29個(78.4%)で、48時間後に生存していたのは31個(83.8%)であった(表5)。

Tre区では、融解数6個の内、24時間後に生存していたのが4個(66.7%)で48時間後に生存していたのが5個(83.3%)であった。

3 移植成績

受胎の有無は直腸検査により移植実施後50日以降に行った。試験区では10頭中2頭の受胎が確認された。対照区では7頭中3頭受胎した(表6)。

表1 伸張期胚盤胞

胚の回収日令	14	15	16	17
平均回収数	22.7	10.0	20.0	15.5

表2 伸張期胚盤胞の長さ (cm)

胚の回収日令	14	15	16	17
平均長さ	0.8	0.8	2.7	1.9

表3 完全体数

胚の回収日令	14	15	16	17
回収個数	68	10	20	37
完全体数	13	5	1	0

表4 作出 TBV 数

胚の回収日令	14	15	16	17
TBV 数	205	32	183	86

表5 凍結融解後の生存性

試験区分	融解数	生存数	
		24 時間後	48 時間後
Su 区	37	29 (78.4%)	31 (83.8%)
Tre 区	6	4 (66.7%)	5 (83.3%)

表6 移植成績

試験区分	移植数	受胎数
試験区	10	2 (20.0%)

対照区	7	3 (42.9%)
-----	---	-----------

IV 考察

1 TBV 作出

伸張期胚盤胞の作出は、14 日目回収では、完全体の回収は多かったものの、伸張が不十分であったため、1 ~ 1.5cm 幅での切断分離が出来ず、回収された伸張期胚盤胞の数に比べて TBV の作出数は少なかった。15 日目回収、16 日目回収は、実施回数が少なかったことより一概にはいえないものの、14 日目回収より TBV 作出効率が高い可能性が示された。しかし、14、15 日目回収と比較して、16、17 日目回収では伸張期胚盤胞の完全体の割合が低下した。特に 17 日目回収時では 2 回実施したうちの 1 回は、回収されたすべての伸張期胚盤胞が破損し、円筒状を保っていなかったことより TBV 作出に供することができなかった。残りの 1 回も、円筒状かつ、胚盤を確認できる伸張期胚盤胞が回収できたことより、TBV を作出できたものの、完全体の回収はできなかった。この原因としては、回収時に長く伸張して絡まった伸張期胚盤胞および粘液がバルーンカテーテルの目詰まりを起こしたことによると考えられた。また、長く伸張した伸張期胚盤胞が回収時の灌流液の流れによって絡まることで破損する可能性も考えられた。結果として、過剰排卵処置にて TBV を作出する場合は、17 日目回収は不相当である可能性が示唆された。また、14 日目回収では 15、16 日目回収と比較した場合、TBV 作出効率は劣ると考えられ、TBV 作出効率が勝るのは 15 日目または 16 日目回収である可能性が示された。今後はシングルフラッシュでの 17 日目回収および過剰排卵処置を用いた 15、16 日目回収の検討をおこなう予定である。

2 凍結保存

48 時間後の生存率で、Su 区が 83.8%、Tre 区が 83.3%であったことより、作出した TBV は胚と同一手法であるダイレクト法による保存が可能であると思われる。また凍結溶媒もエチレングリコールを用いた場合は胚と同様に Su または Tre による生存性の差はないことが示され、胚と同一ストローに TBV を封入して凍結するこ

とが可能であることが示唆された。今後は TBV の融解後の再凍結の可能性を探り、同一の血統を持った胚と TBV の同時保存を検討する予定である。

3 移植試験

今回の試験では対照区の受胎率が 42.9%、試験区が 20%と対照区が成績が高い傾向がみられた。しかし、移植数が少ないことから今後、移植数を増やすことによって、正確な傾向がつかめると考えられた。

また、現在 TBV の受胎牛へ及ぼす影響を検討するため、TBV のみを移植し、発情遅延状態や、血中のプロジェステロン値測定を実施中である。

参考文献

1) 菅原徹・近藤守人・小財千明・藤井満貴・谷口雅律・橋谷田豊・高橋昌志.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：東日本家畜受精卵移植技術研究会報,16:52-53.2000

2) 菅原徹・渡辺晃行・戸塚豊・戸谷孝治.受

卵牛の受胎率向上に関する研究(第2報).茨城県畜試研報,31:21-22.2001.

太田土美・菅原徹・宇田三男.受卵牛の受胎率向上に関する研究(第1報).茨城県畜試研報,30:51-52.2000.

3) 渡辺晃行・葦澤圭二郎・戸塚豊・根本聡美・宮地利江・浦田博文・藤井陽一・谷口雅律・橋谷田豊・高橋ひとみ.ウシ栄養膜小胞の効率的作出のための胚盤胞回収時期および凍結方法：東日本家畜受精卵移植技術研究会報,17:34-35.2001

4) 下司雅也・志水学・高橋ひとみ・高橋昌史・渡邊聡子・犬丸茂樹・横溝祐一.組み替えウシインターフェロントウの子宮内への連続投与が黄体機能に及ぼす影響：東日本家畜受精卵移植技術研究会報,17:32-33.2001

The examination to make cow Trophoblast vesicle, and freeze preservation.

Rie MIYACHI, Masami YOKOTA, Morito KONDOU

The conception influence from cow trophoblast vesicle (TBV).

The aim of this report is to increase pregnancy rate by embryo transfer with TBV. But the data about TBV is a few. So, we examined about make TBV.

TBV made from superovulation. We examined the day of embryo collection. And we examined freeze preservation about TBV.

We executed embryo collection, the day is 14, 15, 16, 17 after artificial insemination.

The examination about freeze preservation. It used 2 liquids, one is 0.1M Tre+1.8MEG+20% CSPBS, the other is 0.1MSu+1.8MEG+20% CSPBS.

About pregnancy, we executed embryo transfer with embryo and TBV.

The result indicated that best embryo collection day is 16. And freeze preservation about TBV survival rate is good either 2 liquids.

