

# 牛の受精卵移植技術簡易化試験

## (5) 栄養膜小胞の作成および凍結保存

山城存 比嘉直志 千葉好夫

### I 要 約

牛胚の受胎率向上を目的として、伸張期胚盤胞の採取、栄養膜小胞(TBV:Trophoblastic vesicle)の作成、凍結保存性および再凍結保存性について検討した。その結果は、以下のとおりであった。

1. 供胚牛へ過剰排卵処置後人工授精して、その後14日目に採胚することで2本の生存伸張期胚盤胞を得ることができた。受胚牛へ体内受精胚7個を移植後、7日目に採胚することで2本の生存伸張期胚盤胞を得ることができた。体外受精胚7個を移植後、7日目に採胚することで1本の生存伸張期胚盤胞を得ることができた。
2. 5本の伸張期胚盤胞を細切後培養することで、132個のTBVを作出することができた。
3. 伸張期胚盤胞を細切後4時間または20時間培養したTBVを、エチレングリコール(EG)を用いたダイレクト凍結保存した結果、融解後の生存率はそれぞれ92.1%および91.7%であった。
4. 再凍結前4時間または20時間培養したTBVの再凍結融解後の生存率は、それぞれ87.0%および0%であった。

以上の結果よりTBVは、凍結前4時間培養で、EGを用いたダイレクト凍結保存が可能であることが示唆された。さらに、再凍結も凍結前短時間培養で高い生存率が得られた。

### II 結 言

受精卵移植技術を用いて効率よく優良子牛を生産するためには、受胎率の向上が求められる。近年、受胎に関して胚と母体間の妊娠認識に関わる物質やその機構が解明され、特に伸張期胚盤胞の栄養膜細胞が産出するインターフェロン $\tau$ は、母体の子宮内膜上皮に作用してプロスタグランジン $F2\alpha$ の産生を抑制することで黄体退行を阻止し、妊娠黄体を維持させることが報告されている<sup>1)</sup>。

さらにこの機構を利用して胚の受胎率を向上させるために、伸張期胚盤胞を細切培養後形成されるTBVを牛の子宮内へ移植することで、機能的黄体の持続時間を延長させる事や<sup>2)</sup>、TBVを牛胚と共に移植することで、受胎率が向上すると報告されている<sup>3, 4)</sup>。しかしTBVの凍結保存に関する報告はいまだ少ない。そこで今回、TBVを簡易に凍結保存する目的で、伸張期胚盤胞を細切後、短時間培養(4時間)した場合と長時間培養(20時間)した後の凍結保存性について検討した。さらに今後、胚と同一のストローへTBVを詰めて凍結保存した後受胚牛へダイレクト移植するために、あらかじめ凍結保存したTBVを採胚日に融解して、胚と共に再凍結しなければならない場合が想定される。そこで、TBVの再凍結前培養時間が再凍結保存性に及ぼす影響についても検討したので報告する。

### III 材料および方法

#### 1. 試験期間および試験場所

試験は、2002年4月から2003年1月に沖縄県畜産試験場で実施した。

#### 2. 伸張期胚盤胞の採取とTBVの作成

##### 1) 過剰排卵処置による伸張期胚盤胞の採取

供胚牛へ過剰排卵処置後人工授精して、その後14日目にバルーンカテーテルを用いて子宮灌流を行い伸張期胚盤胞(写真1)を採取した。

採取に用いたバルーンカテーテルは、従来採卵に使用しているバルーンカテーテルの灌流孔と孔の間をカミソリで切断し縦2mm、横10mmの孔に加工して使用した。(図1)

子宮灌流液は、1%子牛血清および0.1%塩化ナトリウム加乳酸リンゲル液を用いた。

##### 2) 体内受精胚の移植による伸張期胚盤胞の採取

凍結保存した体内受精胚 7 個を融解後 1 頭の受胚牛へ移植して、その後 7 日目に 1) と同様に子宮灌流し伸張期胚盤胞を採取した。

### 3) 体外受精胚の移植による伸張期胚盤胞の採取

凍結保存した体外受精胚 7 個を融解後 1 頭の受胚牛へ移植して、その後 7 日目に 1) と同様に子宮灌流し伸張期胚盤胞を採取した。

### 4) TBV の作成

得られた伸張期胚盤胞をシャーレ内の子宮灌流液に浮遊させ、実体顕微鏡下で外科手術用のメスを用いて約 1mm の幅に細切した。その断片を 10% 牛血清および 0.1M $\beta$ -メルカプトエタノールを加えた TCM199 培養液 (TCM199 液) を用いて培養し TBV を作成した。培養条件は CO<sub>2</sub> インキュベータを用いて、38.5°C、5%CO<sub>2</sub> および 95% 空気の気相条件下で行なった。以下、試験における培養条件は、同一とした。

## 3. TBV の凍結保存および再凍結保存

### 1) 凍結保存および融解培養

伸張期胚盤胞を細切して 4 時間および 20 時間培養後の TBV を、それぞれ EG を用いたダイレクト凍結保存液で凍結した。ダイレクト凍結保存液の調整は、調整リン酸緩衝液を基礎液として、20% 牛胎児血清、1.8MEG、0.1M スクロース および 0.4% 牛アルブミンに調整した。

凍結条件は、0.25ml のストローへ詰めた TBV を、-7°C に保持したプログラムフリーザーへセットして植氷を行ない、10 分経過後 -30°C まで毎分 0.3°C の速度で冷却した。その後、-30°C で 10 分間保持した後液体窒素へ浸漬保存した。

TBV の融解は、液体窒素からストローを取り出し 5 秒間空気中に保持後、約 35°C の水中で融解した。

TBV の培養は、融解後のストローをカットしてシャーレ内に取り出し、凍結保存液とほぼ同量の培養液を加え 2 分間静置した後、TCM199 液で培養した。

### 2) 再凍結保存および融解培養

伸張期胚盤胞を細切後、4 時間培養して凍結融解した TBV を供試材料とした。

再凍結前 4 時間および 20 時間培養後、形態を維持または腔胞形成している TBV を再度 1) と同様に凍結保存した。その後、融解し TCM199 液で培養した。

## 4. 調査項目

伸張期胚盤胞の採取、TBV の作成状況、TBV の培養時間別凍結融解後の生存率、および TBV の培養時間別再凍結融解後の生存率について調査した。

## 5. TBV 生存判定

TBV の凍結融解後の生存判定は、培養 20 時間目に腔胞形成を確認した TBV を生存とした。(写真 2)

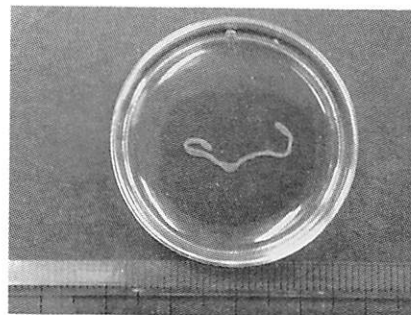


写真 1 伸張期胚盤胞

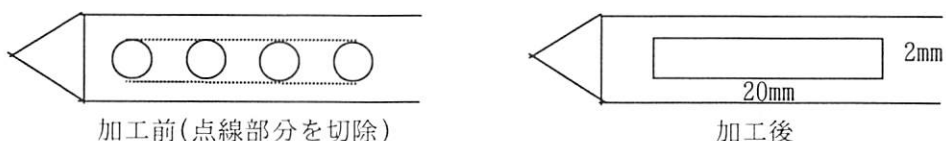


図 1 バルーンカテーテルの灌流孔の加工

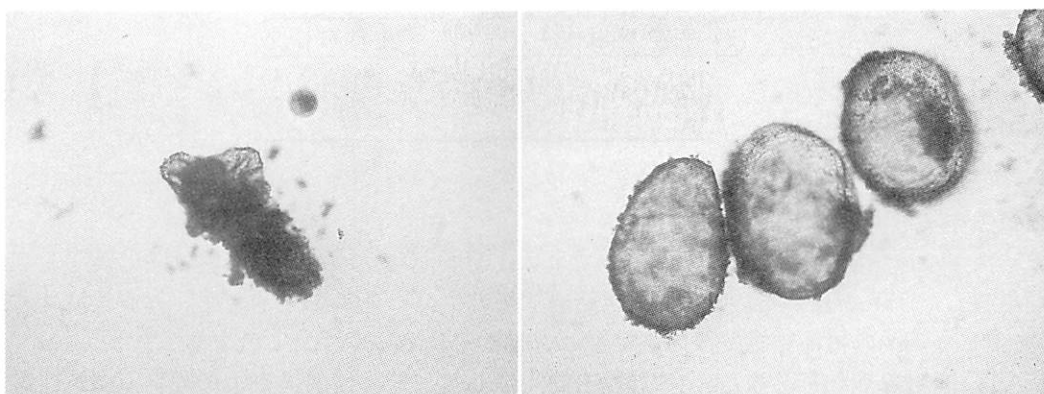


写真2 融解直後のTBV(左)と融解培養後20時間目のTBV(右)

#### IV 結果および考察

##### 1. 伸張期胚盤胞の採取とTBVの作成

伸張期胚盤胞の採取成績を表1に示した。過剰排卵処置後による採取では、約4cmおよび2cmの2本の伸張期胚盤胞が得られた。体内受精胚の移植による作成では約5cm, 3cmおよび2cmの3本が得られた。体外受精胚の移植による作成では約3cmおよび2cmの2本が得られた。

しかし、体内受精胚移植および体外受精胚移植でそれぞれ1本ずつ、全体が黒色で嚢胞形成が悪く生存していない伸張期胚盤胞が得られた。

このことは、過剰排卵処置および体外受精胚の移植による伸張期胚盤胞採取については、いずれの方法でも採取が可能であると報告した菅原ら<sup>5)</sup>の成績と同じであった。

以上の結果より、伸張期胚盤胞の採取はいずれの方法でも可能であると考えられた。また、生存していた伸張期胚盤胞5本を細切した結果、132個の切断片が得られた。

表1 伸張期胚盤胞の採取

処置方法	採取個数	サイズ(cm)	性状・生存
過剰排卵処置	2	4	白色嚢胞形成良・生存
		3	白色嚢胞形成良・生存
体内受精胚移植	3	5	黒色嚢胞形成悪・死
		3	白色嚢胞形成良・生存
		2	白色嚢胞形成良・生存
体外受精胚移植	2	3	白色嚢胞形成良・生存
		2	黒色嚢胞形成悪・死

##### 2. TBVの凍結融解後の生存率

###### 1)凍結保存後の生存率

TBVの凍結融解後の生存率を表2に示した。伸張期胚盤胞を細切後4時間および20時間培養したTBVの凍結融解後の生存率は、それぞれ92.1%および91.7%と共に高くほとんど差はなかった。

このことは、凍結前20時間培養した谷口ら<sup>4)</sup>の成績91.8%、凍結前12時間培養した菅原ら<sup>5)</sup>の成績93.1%とほぼ同じであった。

細切後短時間培養したTBVは、まだ切断面の回復や空胞形成が完全ではないが凍結能については長時間培養後凍結した場合とほとんど差がないことが示唆された。

表2 培養時間別, 凍結・融解後生存率 単位:hr, %

培養時間	TBV 個数	融解後生存個数	生存率
4	38	35	92.1
20	48	44	91.7

## 2)再凍結後の生存率

1)の試験結果より凍結前培養時間は, 短時間でよいこと判明したので, 再凍結試験に供する TBV は凍結前 4 時間培養した TBV を用いた。TBV の再凍結融解後の生存率を表 3 に示した。再凍結前 4 時間および 20 時間培養した TBV の再凍結融解後の生存率は, それぞれ 87.0%および 0%であった。

再凍結前 20 時間培養した TBV は, 完全に腔胞を再形成して形態上は凍結による細胞損傷を回復しているように考えられた。しかし, それらの再凍結保存後の生存は認められなかった。

以上のことから, 長時間培養による TBV の形態的回復は凍結保存性の向上につながらず, 再凍結前培養時間は, むしろ短時間でよいことが分かった。

表3 培養時間別, 再凍結・融解後生存率 単位:hr, %

培養時間	TBV 個数	融解後生存個数	生存率
4	23	20	87.0
20	20	0	0

今回の試験結果から TBV の凍結保存については, 凍結前短時間培養で凍結保存および再凍結保存いずれも高い生存率が得られ, TBV 凍結保存の簡易化が図られた。さらに, TBV は EG を耐凍剤としたダイレクト凍結保存方法により再凍結保存が可能であると判明したので, 今後牛胚とのダイレクト共移植を容易にすると考えられる。

今後, 再凍結融解後の TBV が, 正常にインターフェロントを産生し, 移植胚の受胎率を向上させるか検討する必要がある。

## V 引用文献

- 1)今川和彦・山口浩史・勝村桃子・相田尋樹・R. K. Christenson・酒井仙吉, 1999, 着床過程における受胎認識, 産科と婦人科, 66(5), 665-672
- 2)森美幸・笠正次郎・原田美奈子・上田修二, 2002, 栄養膜小胞との共移植による凍結牛体外受精胚の受胎率向上, 九州沖縄農業研究成果情報, 17, 193-194
- 3)橘谷田豊・岡田真人・阿部英明・相川芳雄・今井敬・山内健治・柳谷和人, 1997, 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, 家畜改良センター年報, 6, 103
- 4)谷口雅律・児島久昭・松本道夫, 2001, 受胎率向上への栄養膜小胞の利用に関する実証試験(第2報), 熊本県農業研究センター畜産研究所(平成13年度), 115-116
- 5)菅原徹・渡辺晃行・戸塚豊・戸谷孝治, 2001, 受卵牛の受胎率向上に関する研究(第2報), 茨城県畜産センター研究報告, 31, 21-23