

低ランク牛胚の有効活用技術の検討

紀川将之・新居康生

要 約

過剰排卵処理により採取した牛体内胚のうち、従来、廃棄されているCランク胚を移植可能胚にまで回復させるため、マウス胎仔線維芽細胞(MEF)を用いた共培養に供した。MEF共培養72時間後までのCランク胚の回復率は50.5%(342/677)、回復胚を新鮮胚で移植した場合の受胎率は26.3%(10/38)、ガラス化保存後移植した場合の受胎率は54.2%(13/24)であった。また、回復胚を性判別に供した場合の生存率は78.4%(29/37)、ガラス化保存後の生存率は100%(16/16)であった。性判別胚を新鮮胚で移植した場合の受胎率は66.7%(2/3)ガラス化保存後移植した場合の受胎率は50.0%(3/6)であった。以上の結果から、一定期間のMEF共培養を経ることにより、Cランク胚が高い割合で有効活用でき、性判別が必要な乳牛の胚移植にも応用可能であることが示唆された。

目 的

当所では、家畜改良総合対策推進事業に基づき、家畜保健衛生所および民間移植師と連携を取りながら、牛胚移植技術の普及推進に取り組んでおり、本技術を経営の主軸とする農家が年々増加し、優良胚の需要も大きく膨らんでいる。

一方で、回収した体内胚は、品質の良いものからA、B、Cの3ランクに分類され、このうち、約4割を占めるB、Cランクの胚は、総じて低ランク胚と呼ばれ、なかでも、品質が最も悪いCランク胚は、受胎の見込みが低く、大半が廃棄処分されている現状がある。

そこで今回、貴重な体内胚の有効利用と移植可能胚数の増加を目的に、Cランク胚を受胎が見込まれる胚にまで回復させる手段として、マウス胎仔線維芽細胞(MEF)を用いた共培養技術について検討するとともに、回復した胚を、本来、Aランク胚のみを用いるガラス化保存技術や性判別技術に供した場合の生存性について検討し、有効活用の可能性について検証した。

材料及び方法

材料には、当所及び農家繋養牛から、当所慣行の過剰排卵処理により回収した体内胚のうち、発育不良や変性部位が30%以上のCランク胚を供試した。

回復培養は、基礎培地に10%CS+0.1mM β -ME加TCM199を用いたMEFとの共培養で行い、培養後72時間目までの生存胚のうち、胚盤胞期以降の発育ステージで発育し、明瞭な内細胞塊が認められる胚を、受胎が見込まれる移植可能胚とした。なお、培養の気相条件は、38.5°C、5%CO₂、95%airとした。

回復胚のガラス化保存及び融解は、笠井ら¹⁾の報告に従い、平衡液に10%EG+10%DMSO+20%CS加TCM199、ガラス化液に20%EG+20%DMSO+0.6MSucrose+20%CS加TCM199を用いたストローカット法により行った。

ガラス化保存胚は、液体窒素ボンベで保管し、融解後、10%CS+0.1mM β -ME加TCM199で2~3時間培養した後、生存性を確認した。

性判別は、当所の常法に基づき、移植側と遺伝子診断用サンプル側が8:2程度になるよう

に胚を切断分離して行い、移植側を10%CS+0.1mM β -ME加TCM199で2~3時間培養した後の形態観察により、生存性を確認した。

移植試験の受胎牛には、ホルスタイン種育成牛、経産牛及び黒毛和種経産牛を用い、発情後7~9日目の黄体側子宮角に、1個/頭の胚を移植した。

結果

Cランク胚677個をMEFで共培養した結果、342個が移植可能胚まで回復し、回復率は50.5%であった(表1)。

回復胚38個を新鮮胚で移植した結果、10個が受胎し、受胎率は26.3%であった(表2)。

また、回復胚24個をガラス化保存し、融解後の生存性について検討した結果、生存率は100%、これらを用いた移植試験では、13個が受胎し、受胎率は54.2%であった(表3, 4)。

さらに、回復胚37個を性判別に供した結果、29個が生存し、生存率は78.4%、このうちの3個について移植試験を実施した結果、2頭が受胎し、受胎率は66.7%であった(表5, 6)。

また、性判別後の生存胚16個をガラス化保存した結果、融解後の生存率は100%、このうち、6個について移植試験を実施した結果、3頭が受胎し、受胎率は50.0%であった(表7, 8)。

なお、性判別胚で受胎した新鮮胚由来の2頭及びガラス化保存胚由来の3頭については、いずれも正常産子の分娩を確認した。

表1. MEF共培養による回復成績

培養胚数	回復胚数	回復率
677	342	50.5%

表2. 回復胚の移植成績(新鮮胚)

移植胚数	受胎頭数	受胎率
38	10	26.3%

表3. 回復胚のガラス化保存後の生存性

ガラス化保存胚数	融解後生存胚数	生存率
24	24	100%

表4. 回復胚の移植成績(ガラス化胚)

移植胚数	受胎頭数	受胎率
24	13	54.2%

表5. 回復胚の性判別後の生存性

性判別胚数	生存胚数	生存率
37	29	78.4%

表6. 性判別後の移植成績(新鮮胚)

移植胚数	受胎頭数	受胎率
3	2	66.7%

表7. ガラス化保存した性判別胚の生存性

ガラス化保存胚数	融解後生存胚数	生存率
16	16	100%

表 8. 性判別後の移植成績 (ガラス化胚)

移植胚数	受胎頭数	受胎率
6	3	50.0%

考 察

過剰排卵処理により採取される体内胚のうち、凍結保存が困難な低ランク胚は約4割を占め、なかでもCランク胚は、新鮮胚移植でも受胎の見込みが低く、大半が廃棄処分されている現状があり、これらの有効利用を図るための研究が過去にも報告されている^{2,3)}。

当所では、以前、牛体細胞クローン作出技術に関する研究に取り組み、牛クローン胚の発生培養法としてMEFを用いた共培養を検討し、一定の成果を得た^{4,5)}。

そこで今回、MEF共培養が、Cランク胚の回復培養技術としても応用出来ないかと考え、検討を加えた。

その結果、一定期間のMEF共培養を経ることにより、半数以上の胚が、受胎が見込まれる移植可能胚にまで回復し、有効活用出来る可能性が示唆された。

また、回復胚は、ガラス化保存しても、安定した生存性が確保され、長期保存も可能であることが示唆された。同時に、移植試験では、新鮮胚、ガラス化保存胚ともに受胎性が確認された。

しかしながら、今回の移植試験では、新鮮胚がガラス化保存胚よりも受胎率が低い結果となった。この原因として、新鮮胚では、「①採胚当日の段階で、状態の良い受胎牛に、品質の良い胚が優先的に移植され、受胎牛に最適な条件が整わなかったこと」、「②培養時間の分、移植適期から若干外れてしまったこと。」の2点が考えられた。

また、今回、生産現場へのニーズに対応する上で、雌の胚であることが要求される乳牛の胚移植への活用が、回復後のCランク胚を用いた場合でも可能か検討するため、通常、Aランク胚で実施する性判別技術について、性判別後の生存性および受胎性を検証した。

その結果、性判別後も78.4%の生存率が得られ、性判別胚として供給する際にも、回復胚が利用可能であることが示唆された。

また、性判別後の胚をガラス化保存した場合も、安定した生存性が確保され、性判別胚としてAランク胚と同等に長期保存が可能であることが示唆された。

さらに、移植試験では、移植例数が少ないものの、新鮮胚、ガラス化保存胚ともに、受胎性及び正常産子の分娩を確認した。

今後、移植例数の集積に努め、受胎率や正常分娩率について、更に検証を重ねる必要があるとともに、高い回復率が得られる、より簡易な培養技術について、検討を加えていきたい。

参考文献

- 1) 笠井裕明ら；ストローカット法による牛性判別胚のガラス化保存及び融解移植後の受胎性. 徳島畜研報 No.3, 1-4 (2003)
- 2) 大山真二ら；低ランク胚の有効利用技術実用化試験. 宮崎県畜試研報 No.14, 183-188 (2001)
- 3) 小林政樹ら；牛の過剰排卵処理によって得られる低ランク胚の有効利用法. 東北農業研究 55, 135-136 (2002)
- 4) 笠井裕明ら；培養ガス分圧の違いと共培養細胞の有無が牛初期胚の発生率に及ぼす影響. 徳島県畜試研報 No.38, 1-3 (1997)
- 5) 笠井裕明ら；乳牛における体細胞をドナー核に用いた核移植産子の生産. 徳島県畜試研報 No.40, 1-4 (1999)