

簡易胚操作器具を用いたウシ低ランク胚の処理が 発育および凍結移植後の受胎に及ぼす影響

笠正二郎・上田修二・磯崎良寛・平嶋善典・森 美幸
(畜産研究所)

過排卵処理により採取したウシ胚のうち、胚細胞の30%~50%が変性または遊離した胚(低ランク胚)が約20%採取される。低ランク胚は凍結により害を受けやすいため、主に新鮮移植されている。そこで簡易胚操作器具を試作開発し、これを用い透明帯を切開し変性部除去することが胚の発育と凍結後移植の受胎性に及ぼす効果について調査した。その結果、胚操作を行い20時間~24時間培養すると胚は発育し、内細胞塊と栄養膜細胞の区分が明瞭となり、凍結後移植すると50%受胎した。

[キーワード: ウシ, 低ランク胚, 操作器具, 透明帯切開, 変性部, 受胎]

Effect of Manipulation with Simple Manipulator before Cryopreservation on Development and Pregnancy of Poor-Quality Transferred Frozen Bovine Embryos KASA Shojiro, Shuji UEDA, Yoshihiro ISOZAKI, Yoshinori HIRASHIMA and Miyuki MORI (Fukuoka Agricultural Research Center, Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan) *Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent.* 19: 98-100 (2000)

Of bovine embryos that were obtained by superovulation about twenty percent of them had 30% to 50% of degenerate embryonal cells (poor-quality embryos). Since the poor-quality embryos are susceptible to injury in the process of cryopreservation, most of them are transferred fresh. We developed a simple hand-made manipulator for dissecting the zona pellucida and removing the degenerate part before cryopreservation in order to investigate its effect on the development and pregnancy of transferred manipulated embryos. The poor-quality embryos that were manipulated by the simple hand-made manipulator and cultured for 20-24h before freezing made clear difference in the inner cell mass and trophoblast, with a pregnancy rate of 50%.

[Key words: bovine, poor-quality embryos, manipulator, dissecting the zona pellucida, degenerate part, pregnancy]

結 言

胚移植技術を活用して、優良雌牛からの体内受精由来胚の採取が多くの臨床現場で実施されている。採取された胚には正常に発育する良質な胚のみではなく、発育が遅延したり、一部細胞が遊離変性した部分が胚細胞の30%以上の割合を占める胚^{1,3)}(低ランク胚)が2割程度ある。低ランク胚は変性部割合の増加に伴い凍結融解時の熱感作を受け生存性が著しく損なわれるとともに、耐凍性も低下する³⁾。このため、発情周期を同期化した受胎牛が存在しない場合、凍結できずに廃棄処分せざるを得ない現状であり、耐凍性改善による低ランク胚の有効活用技術の確立が求められている。

低ランク胚を有効利用するため、Otoiら⁵⁾は採取した低ランク胚を凍結保存前に24時間培養すると、融解培養後の胚の透明帯脱出率が向上したと報告し、安部¹⁾は同様に採取後24時間培養することにより凍結保存を可能にし凍結後移植による受胎を確認したと報告している。しかし、この受胎率は変性部の30%未満の普通ランク胚の受胎率までには至っていない。また、Baguisiら²⁾はウシ胚の凍結による透明帯変性が、胚の脱出を妨害するため、凍結融解後に透明帯の一部を薄切する脱出補助を施すと、透明帯脱出率の向上がみられたと報告し

ている。このほか透明帯切開などの脱出補助が胚の発育や透明帯脱出有効である報告^{4,6,7)}がある。しかし、透明帯切開に必要な倒立顕微鏡やマイクロマニピュレータなどの器具類は高価で利便性が悪いため、透明帯切開などの脱出補助技術を臨床の現場で利用することは困難である。

そこで、低ランク胚の透明帯からの脱出補助が胚の発育および受胎率に及ぼす影響を検討するにあたり、現場の採胚機関での利用が可能な簡易な胚操作器具を試作開発しその利用法を考案した。次いで、簡易胚操作器具類を用い透明帯を切開し変性部を除去後短期間培養して発育性を調査した後、凍結後移植して受胎率を調査した。

材料および方法

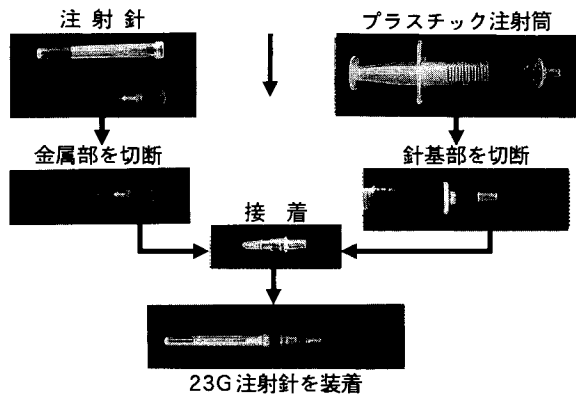
供試胚

当場で飼養する黒毛和種繁殖雌牛に卵胞刺激ホルモンの漸減投与による過剰排卵処理を施し、発情後7日目に胚をバルーンカテーテル法で灌流採取した。桑実胚期以降に発育した採取胚を20%子ウシ血清(CS, GIBCO)を添加した修正PBS(mPBS, GIBCO)で数回洗浄し、胚をランク別³⁾に区分した。すなわち、形態的に胚細胞中遊離細胞を含む変性部の割合が10%未満をAランク胚、10%以上30%未満をBランク胚、30%以上50%

未満をCランク胚、および50%以上存在する胚をDランク胚とし、Cランク胚を低ランク胚として試験に供した。

簡易胚操作器具の開発

簡易胚操作器具(第1図)を試作開発した。作製法は使い捨て注射針および注射筒をそれぞれを針基部から切断し、接着後、使い捨て23ゲージ針とその針カバーを装着した。



第1図 簡易胚操作器具の作製

簡易胚操作器具による透明帯切開、変性部除去および培養法

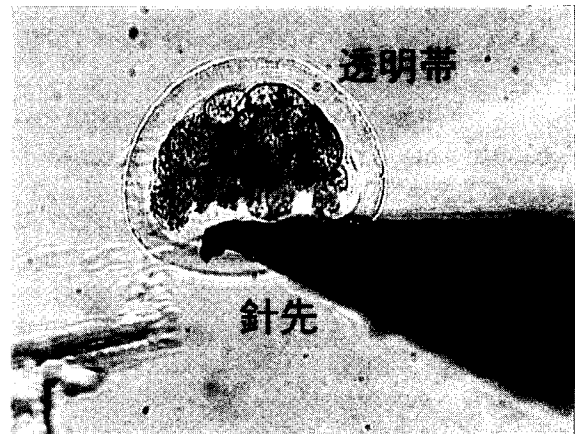
低ランク胚の透明帯切開、変性部除去およびその後の培養は以下の方法で行った。0.2M シュクロース(SIGMA)を添加したPBS(GIBCO, 金属不含有)で低ランク胚を数回洗浄した後、胚を60mm プラスチックシャーレ(FALCON)中央の0.2M シュクロース添加PBS液の100 μ l小滴中の底面中央にパストツールピペットを使い吹き付けて固定した。

実体顕微鏡(40倍程度)下で透明帯切開および変性部除去を行った。透明帯切開には2本の簡易胚操作器具を用い、片方の器具の針先を胚に添え残り片方の針先で低ランク胚の変性部と正常細胞部の間を正常細胞部を傷付けないように透明帯の一部と共に切断した(第2図)。透明帯切開後、先端の孔を胚直径の1/2~1/4程度に細く加工したパストツールピペットを使い、切開部から変性部を吸引除去した。

透明帯切開後変性部を除去した胚は透明帯とともに20%ウシ胎血清(FCS, BIOWHITTAKER)添加25mM HEPES緩衝TCM199(GIBCO)に100 μ M β メルカプトエタノール(SIGMA)を添加した培養液(β ME液)100 μ lの小滴中で流動パラフィン(NACALAITESQUE)を重ね層培養を行った。気相条件は5%CO₂, 95%空気, 38.5°Cで20~24時間培養した。

低ランク胚の透明帯切開および変性部除去が发育および受胎率に及ぼす影響

透明帯切開等の胚操作後に培養した低ランク胚の发育



第2図 簡易胚操作器具による透明帯切開

性を検討するために、发育の有無および形態的に内細胞塊と栄養膜細胞の区別できるもの(区分明瞭)について調査した。

培養後の低ランク胚の凍結は、凍結液に8%または10%エチレングリコール(SIGMA)を添加した20%CSmPBSの凍結液を用い、-6.6°Cまたは-7.0°Cで植水後、-30°Cまで0.3°C/分で冷却し液体窒素中で凍結保存した。凍結胚の融解は胚を封入したストローを空气中10秒, 30°C温湯中10秒で行い、移植は発情7日目の受胎牛の黄体側子宮角内に行った。受胎確認は移植後40日前後に行った。対照に凍結前の培養のみで透明帯切開等を施さない無操作の低ランク胚を設けた。また、胚採取後培養せずに低ランク胚と同様な方法で凍結後同時期に移植したAランク胚の移植成績を参照とした。

結果および考察

簡易胚操作器具による低ランク胚の透明帯切開および変性部除去が发育および受胎率に及ぼす影響

胚には発生過程において、拡張胚盤胞期まで发育するが透明帯から脱出できずに退行する胚がみられる^{2,4,6)}。また、低ランク胚の変性退行する胚細胞は細胞崩壊に伴い正常な胚細胞の发育に悪影響を及ぼすことが考えられる。また、凍害により透明帯および胚細胞の変性がみられ、透明帯脱出に支障が生じる危険性がある²⁾。そこで、試作した簡易胚操作器具を用いて低ランク胚の透明帯切開および変性部除去を行い、これは胚操作が操作後の胚の发育および凍結移植後の受胎率に及ぼす影響を調査した。

透明帯切開等の胚操作の有無が低ランク胚の胚发育に及ぼす調査では、发育率では胚操作区が91%(10/11)、無操作区が78%(7/9)であり、内細胞塊と栄養膜細胞の区別が明瞭なものの割合はそれぞれ82%(9/11)および56%(5/9)であった。このことから、胚操作による低ランク胚の发育性の改善傾向が見られた。また、发育課程において胚操作し培養すると、通常みられる透明帯の菲薄化は認められず、发育良好なもの多くは、培養後に透明帯切開部より脱出した(第1表, 第3図)。

報告^{2,4,6,7)}では透明帯脱出補助の方法として透明帯を

第1表 胚操作が低ランク胚の発育性に及ぼす影響

区	供試 胚数	発育性	
		発育数(%)	区分明瞭数 ¹⁾ (%)
操作	11	10 (90.9)	9 (81.8)
無操作	9	7 (77.8)	5 (55.6)

1) 区分明瞭数：内細胞塊と栄養膜細胞の区別が明瞭な胚数



第3図 胚操作後培養し発育した低ランク胚

マイクロマニピュレータで部分切開、針やレーザーパルスによる開穴、薄切、薬品または酵素処理等による菲薄化などがあり、これらの操作により、培養後の生存性や脱出率の向上が認められている。本試験では簡易胚操作器具を用い透明帯を切開、変性部除去後培養した。その結果、操作胚は無操作胚と比較して良好に発育し、このことから、これら報告と同様に胚操作が低ランク胚の発育改善に良好に作用したものと思われた。

胚操作の有無が受胎率に及ぼす調査では、操作区および無操作区の低ランク胚の凍結移植後の受胎率はそれぞれ50% (4/8) および32% (8/25) であった(第2表)。

第2表 胚操作が低ランク胚の受胎率に及ぼす影響

区	胚操作	凍結前培養	移植数	受胎数(%)
操作	+	+	8	4 (50.0)
無操作	-	+	25	8 (32.0)
参照 ¹⁾	-	-	75	34 (45.3)

1) 参照はAランク胚

このことから、低ランク胚への胚操作の有無が培養後凍結移植の受胎率に及ぼす影響では、移植例数が少なく有意な差はみられないものの向上傾向がみられた。また、同時期に移植した参照区のAランク胚の受胎率45% (34/75) と胚操作した低ランク胚間に有意な差がないことから、胚操作を施した低ランク胚はAランク胚程度の受胎率が望めるものと思われた。

今回、低ランク胚の胚操作により良好な胚発育がみられ、移植により高い受胎率を示した。これら向上傾向が認められた要因として、①透明帯切開により胚の発育および脱出を補助し、②変性部除去により変性部が正常細胞へ及ぼす悪影響を抑えたことの2点が考えられた。

以上の結果から、一般の胚処理機関で低ランク胚を有効活用するには、簡易胚操作器具により胚の透明帯を切開し変性部を除去後βME液で培養してダイレクト移植用に凍結することにより、Aランク胚と同程度の受胎率を得ることが期待できると思われた。

なお、今回試作開発した簡易胚操作器具を利用すれば、高価なマイクロマニピュレータを使用せずに、比較的簡単に透明帯切開を行うことができる。また、胚操作後の培養は比較的簡単な方法であり、その上、ダイレクト移植が可能であることから、一般に実施されている胚移植技術にも利用することができる。

引用文献

- 1) 安部茂樹(1998) 牛の過排卵処理時に採取される低ランク胚の有効利用法の検討. 畜産技術.522:31-33.
- 2) BAGUISI, A, J.F.ROCHE and M.P.BOLAND (1998) Assisted Hatching of Cryopreserved Bovine Embryos. Theriogenology,(Abstr.) 49.1: 161.
- 3) 日本家畜人工授精師協会(1996) 家畜人工授精講習会テキスト. 家畜受精卵移植編.
- 4) NIMURA, S. and M. FUJII (1997) A Morphological Study of Blastocyst Hatching in the Mouse and Rat.J.Reprod.Dev.43.4: 295-302.
- 5) OTOI,T., N.KOYAMA, K.YAMAMOTO, N.HORIKITA, S.TACHIKAWA and T.SUZUKI (1999) Effect of β-Mercaptoethanol on Developmental Competence of Fair-Quality Bovine Embryos Following Culture and Freezing. Theriogenology,(Abstr.) 51.1: 251.
- 6) SCHMOLL, F., H.SCHNEIDER, M.MONTAG, K.WIMMERS, E.THOLEN, S.PONSUKSILII, H.VAN DER VEN and K.SCHELLANDER (1999) Laser Assisted Hatching in Bovine In Vitro Produced Blastocysts. Theriogenology,(Abstr.) 51.1: 253.
- 7) YAZAWA, H., K.HOSHI, K.YANAGIDA and K.SUZUKI (1996) Basic Study of Assisted Hatching Using Mouse Embryos. J.Mamm.Ova Res.13: 30-38.