

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

小林政樹・沼田 恵・千田惣浩・西宮 弘*・相澤健一・小西潤一

(秋田県畜産試験場・*秋田県北部家畜保健衛生所)

Utilization of Poor-Quality Embryos Produced by Superovulation in Cattle

Masaki Kobayashi, Megumi Numata, Mitihiko Tida, Hiroshi Nishinomiya, Kenzi Aizawa and Zyuniti Konishi

Akita Prefectural Livestock Experiment Station・

*Akita Prefectural Hokubu Livestock Hygiene Service Center

1 はじめに

本県では、県有供胚牛を導入して牛胚の安定採取を図ると共に農家にその供給を行い牛群の改良・増殖に利用されている。しかし、このとき採取される胚は、正常な発育をした良質の胚のみではなく、発育遅延や変性細胞が多数存在する低ランク胚も採取される。低ランク胚は、新鮮胚移植では、受胎率が20%前後と低く、凍結保存では、凍結から融解の過程で胚の品質が著しく低下し保存が困難であることから、そのまま廃棄されるか、一部、新鮮胚移植、培養後移植等に用いられている。しかし、低ランク胚の中でも受胎性の高い胚の選択条件や培養技術などは十分検討されていないのが現状である。そこで、今後低ランク胚を有効に利用するため、培養した低ランク胚の生存性及び脱出胚盤胞率を指標とした培養液の検討ならびに培養低ランク胚の移植試験を行った。

2 試験方法

(1) 培養液の検討

1) 供試胚

過剰排卵処理し人工授精した黒毛和種から採取したCランク、変性部分30%以上と判定された胚

2) 培養液

①10%ウシ胎仔血清加25mM Hepes緩衝TCM-199培地(以下TCM-199) ②100 μ M β -メルカプトエタノール加 10%FCS+25mM Hepes緩衝TCM-199培地(以下 β -ME+TCM199) ③10%FCS+25mM Hepes緩衝TCM-199培地にウシ卵丘細胞を単層形成させた共培養(以下卵丘細胞の共培養) ④10%FCS加高性能改良199培地(以下HP-M199)

3) 培養方法

培養液1mlに胚を1個導入し、5%CO₂/95%空気、38.5℃の条件で72時間培養し、生存率、脱出胚盤胞率を観察した。

(2) 移植試験

1) 移植胚の選定

24時間培養した胚の形態を観察して、初期胚盤胞に発育した胚については、変性部分が30%以下の胚を移植胚とした。また、胚盤胞～拡張胚盤胞に発育した胚では、変性部分が15%以下で内細胞塊が明瞭な胚を移植胚として選定した。

2) 移 植

移植胚として選定された低ランク培養胚を10%FCS加HP-M199で3回洗浄後、移植器にセットして県内の受精卵移植師に依頼し移植を実施した。なお、対象区は、採卵時低ランクと判定された胚を培養せず新鮮胚として移植を行った。

3 試験結果及び考察

(1) 培養液の検討

培養液の違いによって発育の差が認められた。今回体外培養に使用した、HP-M199培養液及び β -ME+TCM199培養液の生存率および脱出胚盤胞率が培養液に比べ有意に高く低ランク胚への発育促進効果および透明体からの脱出を促進する効果が認められた(表1)。24時間培養後の低ランクのステージの変化は、採卵時、後期桑実胚の場合は β -ME+TCM-199及びHP-M199では90%以上が胚盤胞から拡張胚盤胞に発育したが、TCM-199では発育が遅く24時間後でも初期胚盤胞のものが20.4%見られた。また、採卵時、初期胚盤胞の胚は、 β -ME+TCM-199及びHP-M199では、それぞれ66.6%及び60.0%が拡張胚盤胞まで発育したが、TCM-199及び卵丘細胞の共培養では、それぞれ41.6%、36.4%であり、培養液の違いにより発育速度に違いが見られた(表2)。また、胚の内細胞塊が明瞭なものと不明瞭なものがあり、後者は、発育速度の遅い胚やTCM-199で培養した胚に多く見られた。このことから、低ランク胚を移植する場合、培養後の発育速度、内細胞塊の明瞭さなどを基準に胚を選定する必要があると考えられた。

(2) 移植試験

1) 低ランク培養胚の選定

低ランク胚を24時間培養後、移植胚として選定した結果、58個中26個(44.8%)が選定された(表3)。また、選定された胚を培養前の変性部位の量によって区分したところ、変性部分30～50%未満では57.1%、変性部位50%以上の胚は26.1%が選定された。培養前の形態観察で変性部位が少ない胚ほど培養後の内部細胞塊が明瞭な胚が選別される傾向があった。

2) 移植成績

未培養低ランク胚と24時間培養低ランク胚の移植成績は、培養低ランク胚は、9頭が受胎し受胎率は40.9%、未培養低ランク胚は5頭受胎し受胎率は23.8%で培養胚の受胎率が有意に高かった(表4)。

培養前の変性部位の量と受胎率の関係は、変性部位30

～50%未満では培養胚は41.1%、未培養胚は31.3%であった(表5)。また、変性部位50%以上では、培養胚は40.0%、未培養胚は、0%であった。採卵直後、胚の品質評価が同程度と判断し、その後培養してみると発育速度が低下したり、途中で変性してしまう場合があり、対照である未培養胚は、無作為に選んで移植したため、培養胚に比べて胚の変質評価が甘く、受胎率が低かったと考えられる。今回、低ランク胚の培養を行うことにより体外培養の発育を評価に加えることにより、培養後に約半分の胚が選定され移植に利用されたが、このことは、受胎率向上に寄与していると思われる。

培養後の発育ステージ別の受胎率は、初期胚盤胞0%、胚盤胞54.5%、拡張胚盤胞37.5%であった(表6)。24時間培養後に初期胚盤胞の胚は、他のステージの胚に比べて発育速度が遅延しており、細胞数が著しく少なく

他のステージに比べ受胎率が低いと考えられた。そのため、発育が進んだ胚を移植した方が良い結果が得られると考えられる。

4 ま と め

低ランク胚を新鮮移植する場合①培養前の変性細胞割合が50%以内であること②24時間培養後の発育ステージが胚盤胞以上であること、そして③培養後の内細胞塊の形態が明瞭な胚であることを条件として選定することによって受胎率が向上する。今回の移植試験では、24時間培養低ランク胚は9頭(9/22)が受胎し受胎率は40.9%であり、未培養低ランク胚の23.8%と比較して受胎率の向上が認められた。

表1 低ランク胚の培養成績

培養液	供試胚数	生存数 (%)			7 2時間後 Hed-B数 (%)
		2 4時間後	4 8時間後	7 2時間後	
TCM-199	66	57(86.4)	36(54.5) ^a	21(31.8) ^a	15(22.7) ^a
β -ME+TCM-199	36	34(94.4)	32(88.8) ^b	31(86.1) ^b	28(77.7) ^b
卵丘細胞の共培養	28	28(100)	24(85.7) ^b	21(75.0) ^{b, A}	16(57.1) ^{b, A}
HP-M199	52	52(100)	49(94.2) ^b	48(92.3) ^{b, B}	41(78.8) ^{b, B}
合 計	182	171(94.0)	141(77.5)	121(66.5)	100(54.9)

同列異符号間に有意差あり：a-b(P<0.05)、A-B(P<0.05)

Hed-B：脱出胚盤胞

表2 2 4時間培養後のステージ変化

ステージ	培養方法	2 4時間後のステージ					
		供試胚数	E B	B	E X B	H B	変性
C M	TCM-199	54	11(20.4)	20(37.0)	14(25.9)	2(3.7)	7(13.0)
	β -ME+TCM-199	30	1(3.3)	14(46.7)	14(46.7)	0(0.0)	1(3.3)
	卵丘細胞の共培養	17	2(11.8)	9(52.9)	5(29.4)	1(5.9)	0(0.0)
	HP-M199	47	3(6.4)	24(51.1)	19(40.4)	1(2.1)	0(0.0)
E B	TCM-199	12	2(16.7)	3(25.0)	5(41.6)	0(0.0)	2(16.7)
	β -ME+TCM-199	6	0(0.0)	0(0.0)	4(66.6)	1(16.6)	1(16.6)
	卵丘細胞の共培養	11	2(18.2)	4(36.4)	4(36.4)	1(16.6)	0(0.0)
	HP-M199	5	0(0.0)	1(20.0)	3(60.0)	1(20.0)	0(0.0)

注) C M：後期桑実胚 E B：初期胚盤胞 H B：脱出胚盤胞 B：胚盤胞 E X B：拡張胚盤胞

表3 低ランク培養胚の選定

変性部位 (%)	培養胚数	移植選定胚数
30～50未満	35	20(57.1)
50以上	23	6(26.1)
計	58	26(44.8)

表5 変性部位と移植成績

変性部位 (%)	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
30～50未満	17	7	41.1
培養胚 50以上	5	2	40.0
30～50未満	16	5	31.3
未培養胚 50以上	5	0	0

表4 移 植 成 績

	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
培養低ランク胚	22	9	40.9 ^a
未培養低ランク胚	21	5	23.8 ^b

同列異符号間に有意差あり：a-b(P<0.05)

表6 培養後の発育ステージ別移植成績

ステージ	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
初期胚盤胞	3	0	0
胚盤胞	11	6	54.5
拡張胚盤胞	8	3	37.5
計	22	9	40.9