

## ウシ栄養膜細胞の培養条件が耐凍性に及ぼす影響の検討

藤原裕士・中原 仁・小田 亘\*・小田頼政

## Examination of the influence that the culture condition of a bovine trophoblast vesicles gives to freezing tolerance

Hiroshi FUJIWARA, Hitoshi NAKAHARA, Wataru ODA and Yorimasa ODA

## 要 約

牛では、伸張期胚盤胞から妊娠維持物質であるインターフェロン $\tau$ （以下 IFN  $\tau$ ）の放出が確認されていることから、本報告では、胚と栄養膜小胞の共移植により受胎率向上を目的に、前段階として栄養膜小胞の凍結融解後の生存性の高い培養条件について検討した。

- 1 過剰排卵処理を施された2頭の供試牛から授精後14日目に伸張期胚盤胞を回収し、細切が可能な破損していない完全体が17個（最大40mm、最小1mm、平均17.5mm）回収された。
  - 2 伸張期胚盤胞の完全体は眼科手術用メスで細切し、伸張期胚盤胞の細切細胞を310個を作成した。血清添加区では88.1%（141/160個）、無血清区では80.0%（120/150個）の栄養膜小胞が得られた。
  - 3 各区の凍結融解後の生存率は、血清添加区で90.5%（114/126個）、無血清区で71.7%（86/120個）であった。
- 以上のことから、栄養膜小胞の凍結融解後の生存性の高い培養条件として、血清添加培地を用いた培養が有効であることが示唆された。

キーワード：伸張期胚盤胞、栄養膜小胞、培養液、凍結保存

## 緒 言

近年、授精後14～16日目の伸張期胚盤胞から妊娠維持物質とされるインターフェロン $\tau$ （以下 IFN  $\tau$ ）が放出されていることが確認されて以来、胚移植時に IFN  $\tau$  を補うことで受胎率向上につながる可能性が報告されている。一般的には、胚は凍結時に凍結障害を受けることにより、栄養膜細胞からの IFN  $\tau$  の放出が弱くなり、凍結胚の受胎率低下が予想される。そこで、本報告では凍結胚との効率的な栄養膜小胞との共移植を行うため、授精後14日目の伸張期胚盤胞を回収し、細切することにより栄養膜小胞を作出し、その培養条件が培養後の耐凍性に及ぼす影響について検討した。

## 材料及び方法

## 1 供試牛

供試牛は、当センター繋養の黒毛和種2頭を用いた。

## 2 試験方法

## (1) 伸張期胚盤胞の回収

供試牛に発情後11日目から常法の過剰排卵処理（FSH20AUを3日間漸減投与）を行い、その後の発情時に人工授精を2回行った。人工授精後14日目に、伸張期胚盤胞が通過できるように先端部を加工した20Frの2孔式バルーンカテーテルを用い、回収を行った。

## (2) 栄養膜小胞の作出

## ア 伸張期胚盤胞の細切

伸張期胚盤胞は20%牛胎仔血清（以下 FCS）加 TCM199 液中で眼科手術用メス（FEATHER）を用い、約1mm間隔で栄養膜の両端が封じられるように押し切った。ただし、胎児細胞（TCM）を含む部分は削除した。また、伸張期胚盤胞の栄養膜の破損が認められたものは、細切不能と判断し試験には使用しなかった。

## イ 栄養膜小胞の修復培養

細切した伸張期胚盤胞の培養は、20%FCS 加 TCM199 液を用いた血清添加区と IVMD101 液（パプルト研究所）を用いた無血清区で行った。培養

シャーレは、4wellDish (NUNC 製) を用い、両区ともに 750ml の培養液に細切した約 1 mm の伸張期胚盤胞を 20 個程度入れ、5%CO<sub>2</sub>、95%air、38.5 °C 条件下で 24 ~ 72 時間修復培養後、膨張してきたものを栄養膜小胞とした。

### (3) 栄養膜小胞の凍結及び融解

#### ア 凍結方法

耐凍剤には 1.8M (8.3%) エチレングリコール + 0.1M トレハロース + 20%FCS 加 PBS 液を用い、栄養膜小胞はストロー内に 1 ~ 5 個封入後、ET-1 (FHK 製) で凍結を行った。凍結方法は、-6.2 °C で 2 分間保持後、植氷を行い、その後 10 分間 -6.2 °C を保持し、-30 °C まで -0.3 °C/分 で冷却した。冷却後は、直ちに液体窒素に投入し保存した。

#### イ 融解方法

液体窒素からストローを取り出し、空気中で 10 秒間保持後、30 °C の微温湯に 20 秒間投入して、直ちに血清添加及び無血清培養液で洗卵後、洗浄液と同様液で培養した。

#### ウ 融解後の培養方法

血清添加区及び無血清区ともに、修復培養時と同一条件で 24 ~ 72 時間培養し、凍結した栄養膜小胞が膨張してきたものを生存と判定した。

## 結果及び考察

### 1 伸張期胚盤胞の回収成績

過剰排卵処理を施された 2 頭の供試牛から授精後 14 日目に伸張期胚盤胞を回収し、細切が可能な完全体が 17 個 (最大 40mm、最小 1mm、平均 17.5mm) と細切不能な伸張期胚盤胞が 6 個回収された。(表 1)

### 2 栄養膜小胞作出成績

完全体の伸張期胚盤胞 17 個から 310 個の細切細胞を作成した。このうち、血清添加区で 160 個無血清区で 150 個を修復培養した結果、栄養膜小胞作出率は血清添加区が 88.1% (141/160 個) であり、無血清区で 80.0% (120/150 個) であった。細切後の培養条件では、両区に差が認められなかった。(表 2)

### 3 栄養膜小胞の凍結融解成績

栄養膜小胞の凍結融解後の生存率は、血清添加区で 90.5% (114/126 個) であり、無血清区で 71.7% (86/120 個) であり、血清添加区の生存性が有意差はないものの、高い生存性が得られた。(表 3)

以上のことから、細切した伸張期胚盤胞から栄養膜小胞を作出させ、凍結融解後の生存性を高める培養条件として、血清添加培養液を用いることが有効と考えられた。

表 1 伸張期胚盤胞の回収成績

区分	回収日齢	回収実施頭数	回収成功頭数	回収個数	完全体数 (総数)	切断不能個数 (総数)		完全体の長さ (mm)		
						3mm>	断片	Max	Min	平均
SOV区	14	2	2	23	17	3	3	40	1	17.5

表 2 栄養膜小胞作出成績

区分	完全体		培養後の形成個数				再形成率 %
	供試個数	細切個数	24h	48h	72h	計	
sov区	17	310					
無血清	8	150	110	7	3	120	80.0
血清	9	160	119	12	10	141	88.1

表 3 栄養膜小胞凍結融解成績

凍結区分	凍結個数	融解個数	培養後の再形成個数				生存率 %
			24h	48h	72h	計	
無血清	120	120	78	8	0	86	71.7
血清	141	126	109	5	0	114	90.5

## 引用文献

- 1) 藤井陽一・小川芳雄・田頭明子・藤井満貴 (2004) : ウシ栄養膜小胞の作出および栄養膜小胞と凍結胚の共移植による受胎性向上に関する試験. 山口県畜産試験場報告, 第 19 号.
- 2) 奥田潔 (1998) : ウシ生殖機能に及ぼすインターフェロンの影響. 平成 9 年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, Vol. 16.
- 3) 谷口雅律・佐藤敬明・小邦明子・守田智・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. 平成 12 年度熊本県農業研究センター畜産研究所試験成績所, 122 ~ 123.
- 4) 谷口雅律・児島久昭・松本道夫 (2002) : 栄養膜小胞の利用に関する実証試験 (第 2 報). 平成 13 年度熊本県農業研究センター畜産研究所試験成績所, 115 ~ 116.
- 5) 谷口雅律・児島久昭・松本道夫 (2003) : 平成 14 年度熊本県農業研究センター畜産研究所試験成績所, 126 ~ 127.
- 6) 下司雅也・志水学・高橋ひとみ・高橋昌志・渡邊聡子・犬丸茂樹・横溝祐一 (2002) : 組換えウシインターフェロンの子宮内への連続投与が黄体機能の及ぼす影響. 第 17 回東日本受精卵移植研究会講演要旨集, 32.
- 7) 市野清博・藤井陽一・田頭明子 (2004) : ウシ性判別胚のダイレクト移植用凍結保存における耐凍剤の検討. 山口県畜産試験場報告, 第 19 号.

