

## 1 緒言

生体由来胚は、採胚直後にその品質を形態学的に観察し、ランク付けを行い、その後の用途を決定している。そのうち、発育の遅延した胚や変性細胞が多数存在する胚は、一般的な凍結保存技術では、高い生存性を維持する事が困難であり、低ランク胚と位置づけられている。

本県においては、正常回収胚数に占める低ランク胚 (fair 及び poor ランク胚) の割合が、20%前後で推移しており、これら低ランク胚は培養後凍結保存し、移植に供することもあるが受胎率が低い傾向にあるため、廃棄されることが多い。そこで、体内受精卵生産コストの低減を図るために、低ランク胚の有効活用技術の確立が必須の課題となっている。

近年、低ランク胚の受胎率向上を目的とした研究の一つとして、低ランク胚の透明帯を切開することにより、受胎率が向上したとの報告がある<sup>1)</sup>。しかしながら、この報告は、新鮮胚移植による結果であり、透明帯切開後に凍結保存を行った報告は見当たらない。新鮮胚移植を行うためには、採胚時に同期発情の受胎牛が必要になるが、野外移植においては同時期に多くの受胎牛を準備することが困難であり、新鮮胚移植は実用性に乏しい。そこで、野外移植に適した低ランク胚の有効活用法の開発を目的とし、透明帯切開を施した低ランク胚を 24 時間培養後に凍結保存を行い、その後の受胎性に及ぼす影響について検討した。

## 2 材料および方法

### 1) 供試胚

当场繋養の黒毛和種繁殖牛を用いて過剰胚卵処理後に人工授精を施し、その後 7 日目に非外科的に回収した胚の内、実体顕微鏡下の形態学的観察により、品質が fair および poor ランクと判定した胚を用いた。

### 2) 透明帯切開法

D-PBS100  $\mu$ l 小滴中に浸漬した供試胚は、倒立顕微鏡下においてマイクロマニピレーターに装着したマイクロブレードを用い、変性細胞が多く見られる細胞近くの透明帯の一部を切開した。その際、マイクロブレードは、約 15 度の角度をつけて固定し、刃先端で切開を加えた。

### 3) 培養方法

20% FBS 加 TCM199 培地に 100  $\mu$ M -ME を加えた 100  $\mu$ l 小滴中に浸漬した供試胚は、38.5、5% CO<sub>2</sub>、95% air、湿度飽和気相条件下で 24 時間培養を行った。

### 4) 凍結保存法

24 時間培養後の供試胚は、20%FBS 加 D-PBS で 3 回洗浄後、耐凍剤 (1.8M エチレングリコール + 0.1M トレハロース) を含む 20%FBS 加 D-PBS に直接浸漬し、10 分間平衡後 0.25ml ストロー内に 1 胚ずつ封入し、プログラムフリーザー (ET-1, 富士平工業 KK) を用い緩慢凍結保存に供した。凍結プログラムは、当场の生体由来胚の凍結方法に準じ、0 ~ -7 までは、毎分 1 の速度で冷却し、-7 で人為的に植氷操作を行った。植氷後 15 分間同温度を保持し、その後、毎分 0.3 の速度で -30 まで冷却し、10 分間保持した後に液体窒素中 (-196) に浸漬した。

### 5) 移植

移植直前に、ストローを液体窒素容器から取り出し、10 秒間空気中で保持した後、30 の微温水中に浸漬

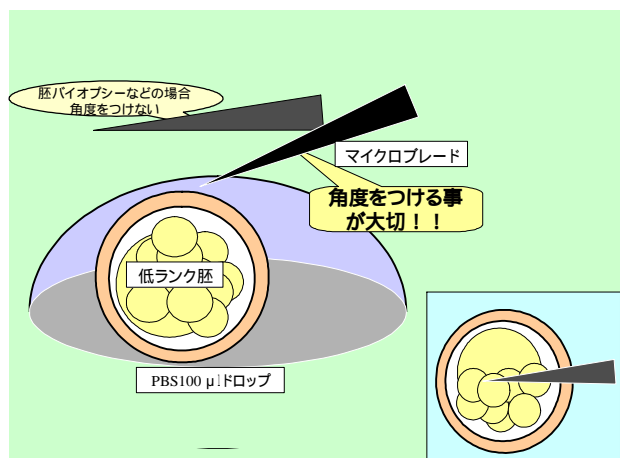


図 1. マイクロブレードによる透明帯切開模式図

することにより融解し、受胎牛へ直接移植した。また、対照区として Excellent 及び Good ランクに透明帯切開を施さず、試験区と同様の方法で凍結保存及び移植を行った。なお、移植者は、熟練した移植者 2 名とした。

#### 6) 統計処理

統計処理は、フィッシャー検定を用いた。

### 3 結果および考察

透明帯切開・24 時間培養後の供試胚の生存率は 100% (10/10) であった (表 1)。一般的な胚に対するバイオ

ステージ	供試胚数	生存胚数	生存率 (%)
CM	7	7	100
E-BL	3	3	100
計	10	10	100

プシーでは、マイクロブレードの刃とシャーレ面を平行に固定するが、今回は、意図的にシャーレ面に対し約 15 度の角度をつけてマイクロブレードを固定することにより、刃の先端で透明帯の一部だけを切開することを可能とし、さらに、変性細胞が多く見られる部位を切開することで、正常な細胞にダメージ

を与えることなく、胚に対する負担が軽減された結果と考えられた。

また、凍結保存後の受胎率及び産子生産率は、各々試験区 40% (4/10)、75% (3/4)、対照区 50% (3/6)、100% (3/3) であり、試験区と対照区との間に有意な差は認められなかった (表 2)。なお、試験区の受胎確認牛 1 頭

表 2 凍結保存後の受胎率および出生率

区分	ステージ *	移植頭数	受胎頭数	受胎率 (%)	出生頭数	出生率 (%)
試験区	CM	7	2	28.6	1	50.0
	E-BL	3	2	66.7	2	100.0
	計	10	4	40.0	3	75.0
対照区	CM	3	2	66.6	2	100.0
	E-BL	2	1	50.0	1	100.0
	BL	1	0	0.0	-	-
計	6	3	50.0	3	100.0	

が産子生産に至らなかった理由は、流死産ではなく、受胎牛が事故死したためであることから、マイクロブレードを用いた透明帯切開法は、緩慢凍結保存後の受胎性及び産子への発育能に影響を及ぼさないものと考えられた。

以上、低ランク胚は、マイクロブレードの角度および切開部位に注意し透明帯に切開を施し

採胚直後のステージ。試験区では採胚後培養を行っているため、凍結時には Expanded Blastocyst まで発育している。

24 時間培養することにより、緩慢凍結保存後の受胎性が向上し、Excellent 及び Good ランク胚と同等の受胎性となる可能性が示唆されたことから、本法は、野外移植に適した低ランク胚の有効活用法であると考えられた。

### 4 参考文献

- 1) 谷山敦、渡辺康孝、西野要治、井上哲郎、井上昭芳：透明帯切開によるウシ低ランク胚の新鮮胚移植における受胎率向上への取り組み、日本胚移植学雑誌、27、118-122 (2005)