

ウシ単為発生胚の共移植による胚移植成績向上試験

笹木教隆・田中 健・竹内隆泰

The Examination to improve the Pregnancy Rate by the Co-transfer of Embryo with Parthenogenetic Activation Embryos

Kiyotaka SASAKI, Ken TANAKA and Takayasu TAKEUCHI

要 約

妊娠認識シグナル(インターフェロン τ)を分泌する単為発生胚(PA胚)の共移植により胚移植成績を向上させるため、共移植する単為発生胚の有効胚数、受胎牛への影響および移植成績について検討した。

その結果、PA胚を1.8Mエチレングリコール(EG)、1.8MEG+0.1Mトレハロース(Tre)を耐凍剤として凍結保存し、融解後の生存性を比較したところ、耐凍剤別の生存率で差はみられなかったものの、体外受精胚の生存率に比べ低かった。Day7の受胎牛にPA胚を1、2、10胚移植後、Day16に回収を行い、PA胚の発育状況を調査したところ、1胚区からは回収されず、2胚区、10胚区から1~15mmのPA胚が回収された。受胎牛にPA胚を1、2胚移植し発情回帰の状況を調査したところ、発情回帰が延長した受胎牛は1胚移植区50.0%(4/8)、2胚移植区87.5%(7/8)で2胚移植区が高い傾向にあったものの、延長した発情回帰日数も2胚移植区が30.6日と長かった。胚移植成績はPA胚と胚の共移植区40.0%(8/20)、胚のみ移植区38.5%(10/26)で受胎率に差はみられなかった。

以上のことから、PA胚2胚を移植することにより黄体退行抑制効果がみられたが、今回の移植試験では受胎率に差はみられなかった。

I 緒 言

牛の胚移植頭数は年々増加傾向にあるものの、平成17年度農林水産省の調査では新鮮胚移植の受胎率が51%、凍結胚移植が45%と人工授精に比べ20~30%程度低く、このことが胚移植技術を普及させるうえで大きな妨げになっている。これまでに当該において胚移植成績の向上を図るため栄養膜小胞と胚を共移植する試験を実施したところ、胚のみの移植に比べ受胎率が5~10%程高くなる成績が得られた¹⁾。この栄養膜小胞については妊娠認識シグナル(イン

ターフェロン τ)を分泌し受胎率を向上させることが明らかになっている²⁾が、栄養膜小胞は、効率的な作成が困難であるという問題がある³⁾。インターフェロン τ を分泌する細胞としては、他に単為発生胚(PA胚)があり、PA胚は子宮内で産子とならず死滅することが報告されている^{4) 5)}ことから、PA胚の共移植により胚移植成績の向上が期待される。しかし、PA胚の共移植については解明すべき点も多く、これら問題点について検討を行い、共移植により胚移植成績が向上するかどうかについて検討した。

II 材料および方法

1 PA 胚の作出方法

PA 胚はと場由来卵子を供試し、5%CS加199培地により24時間成熟培養を行った後、卵丘細胞を除去し、カルシウムイオノホア A23187 と6-ジメチルアミノプリンを用いた複合活性化処理を行った⁶⁾。その後、IVD101培地により7～8日間発生培養を行い Good ランク以上となった拡張胚盤胞期に到達したものをを用いた。

2 供試胚

過剰排卵処理した黒毛和種より回収し、10%エチレングリコール(EG)⁷⁾、10%エチレングリコール+0.1Mトレハロース(EG+Tre)⁸⁾を耐凍剤として緩慢凍結した胚を用いた。

3 試験1. PA 胚の耐凍性調査

PA 胚を EG、EG+Tre を耐凍剤として凍結・融解し、融解後20%血清加199培地で培養を行い⁹⁾、生存性を体外受精(IVF)胚(対照区)と比較した。調査項目は、24時間、48時間目の生存率、72時間目の脱出胚盤胞率である。

4 試験2. 受胚牛に移植した PA 胚の回収後の発育状況

新鮮または凍結・融解後生存を確認した PA 胚を1胚区、2胚区、10胚区に分け受胚牛へ発情後7日目に移植し、16日目に回収後発育状況を調査した。供試牛は黒毛和種経産牛または未經産牛を用いた。

5 試験3. PA 胚移植後の発情回帰日数

発情後7日目の受胚牛に新鮮 PA 胚を1胚又は2胚移植し、移植後の発情回帰日数を調査した。受胚牛はホルスタイン種、黒毛和種、褐毛和種経産牛または未經産牛を用いた。

6 試験4. PA 卵共移植による胚移植成績

胚と PA 胚を共移植し、移植成績を胚のみを移植した対照区と比較した。共移植については、発情後7日目に胚を黄体側にダイレクト移植し、反対側には凍結・融解後生存性を確認した

PA 胚2胚を移植し、対照区では黄体側に胚のみダイレクト移植した。供試した PA 胚の凍結については EG、EG+Tre を耐凍剤として緩慢凍結した。なお、供試牛については発情または出血を確認し、黄体を確認したホルスタイン種、黒毛和種、褐毛和種経産牛または未經産牛の受胚牛を用いた。

7 統計処理

統計処理は χ^2 検定により行った。

III 結果および考察

試験1 PA 胚の耐凍性については、EG、EG+Tre の耐凍剤別で生存性に差は見られなかったものの、IVF 胚に比べ低かった(表1)。

これらの結果により、PA 胚を凍結保存し融解後ダイレクト移植を行う場合、PA 胚が少なくとも1胚以上生存している必要があることから、共移植には2胚以上必要と思われた。

表1 PA胚における凍結融解後の生存率

凍結方法	供試卵数	生存率(%)		72hr後脱出胚盤胞率(%)	備考
		24hr	48hr		
10%EG	182	45.6 ^{a*}	40.7 ^a	18.7 ^{**}	
10%EG+Tre	92	41.3 ^a	41.3	22.8	
対照区 10%EG	24	79.1 ^b	62.5 ^b	20.8	IVF胚

*: 生存率(生存胚数/供試卵数)

** : 脱出胚盤胞率(脱出胚盤胞数/供試卵数)

^{a,b}: 異符号間で有意差あり(p<0.05)

試験2 1胚移植区では PA 胚が回収されず0%(0/2)、2胚移植区、10胚移植区ではそれぞれ33.3%(2/6)、100%(2/2)の回収率で、1～15mmのPA胚が回収された(表2、図1)。

これらの結果により、PA 胚は受胚牛へ移植後、子宮内で通常のウシ胚と同様に発育することが明らかになった。

表2 PA胚の移植回収成績

移植胚数	移植頭数 (頭)	回収成績 (%)	回収胚 (胚数、長径: mm)
1(新鮮胚)	2	0/2(0)	
1(凍結胚)	1	0/1(0)	
2(新鮮胚)	6	2/6(33.3)	(2胚: 2mm, 1mm) (2胚: 3mm, 1mm)
10(新鮮胚)	1	1/1(100)	(3胚: 15mm, 4mm, 1mm)
10(凍結胚)	1	1/1(100)	(1胚: 2mm)

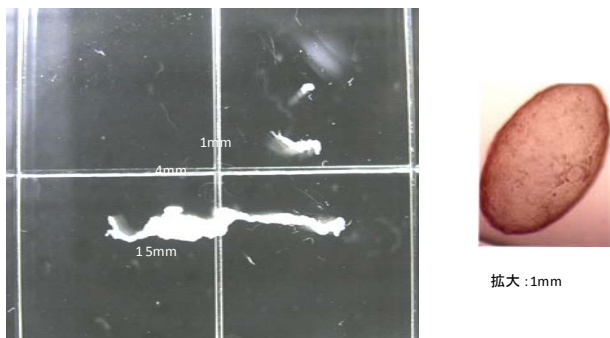


図1 回収されたPA胚

試験3 受胎牛へ PA 胚を 1 胚、2 胚移植した後、受胎牛の発情回帰状況を調査した。

発情回帰が性周期よりも延長した割合は、1 胚移植：50.0% (4/8)、2 胚移植：87.5%(7/8) で、2 胚移植区は 1 胚移植区に比べ発情回帰が延長した受胎牛が多かった。しかし、同様に発情回帰が延長し受胎率向上効果がみられた栄養膜小胞の移植を行った受胎牛では、延長期間は 3.5 日であったのに対し、PA 胚 2 胚移植では 30.6 日と 40 日以上延長する牛もみられた (表 3)。

表3 PA胚移植による受胎牛の発情回帰延長日数

移植	移植頭数	発情回帰 延長牛	延長した発情日数(日)		
			最短	最長	平均*
PA胚1	8	4	1	36	14.8±15.7
PA胚2	8	7	2	51	30.6±21.4
栄養膜 小胞**	11	6	1	7	3.5±2.2

*: 平均±SD

** : 参考(平成16年度研究成果情報より)

試験4 試験1～3の結果をもとに、生存を確認した PA 胚 2 胚を胚と共移植したところ、移植成績は、共移植区：40.0%(8/20)、対照区：38.5%(10/26)で、移植成績に差はみられず共移植による受胎率向上効果は確認できなかった (表 4)。

これまでの報告ではインターフェロンτを分泌する栄養膜小胞の共移植により受胎率が向上しており、同じインターフェロンτを分泌する PA 胚の共移植による受胎率の向上が期待されたものの、今回の移植試験では効果はみられなかった。

今回の移植試験では、共移植区と対照区の移植方法が異なったことから、共移植区では受胎牛に余分な刺激が加わり移植成績が低下した可能性もある。

表4 移植成績

移植区分	凍結方法	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
共移植区	EG	18	7	38.9
	EG+Tre	2	1	50.0
対照区	EG	19	8	42.1
	EG+Tre	7	2	28.6

その他に受胎率が向上しなかった要因として、生存を確認した PA 胚の移植により 2 胚の PA 胚が生存したため、胚に影響を与えている可能性も否定できない。これまでの PA 胚 2 胚移植試験では、発情周期が 35～67 日に延長したとの報告もあり^{10) 11)}、今回の試験でも PA 胚 2 胚移植では発情周期延長率が高かったものの 40 日以上延長した受胎牛も多いことから、死滅した PA 胚が受胎牛内に残存し胚へ影響を与えた可能性もある。

一方、今回の移植試験では共移植成績と胚移植成績ではほとんど差がみられなかったことから、PA 胚を非黄体側に移植したことにより、PA 胚の黄体退行延長作用が受胎牛に作用しなかった可能性も考えられる。

以上のことから、移植試験については再度検討する必要があり、黄体側への胚と生存 PA 胚 1 胚共移植または、1 ストロー内へ胚と PA 胚

2 胚を入れ凍結しダイレクト移植する方法による移植試験が必要と思われる。

参考文献

- 1)橋谷田豊・谷口雅律・藤井陽一・宮地利江・渡辺晃行・小財千明・高橋ひとみ・岡田真人・菅原 徹・藤井満貴・横田昌己・浦田博文・高橋昌志・今井 敬. 凍結-融解したウシ栄養膜小胞の子宮内投与が発情周期および移植胚の受胎率に及ぼす影響. *Jpn.J.Embryo Transfer.*, 29(3):114-124.2007.
- 2)下司雅也・高橋昌志・高橋ひとみ・岡野 彰・高橋広志・松原和衛・高橋寿太郎・永井 卓. ウシ体外受精胚由来栄養膜小胞の子宮内投与が発情周期および血清中早期妊娠因子活性に及ぼす影響. *Jpn.J.Embryo Transfer.*,26(1) : 1-6, 2004.
- 3)宮地利江・横田昌己・近藤守人. ウシ栄養膜小胞の作出と凍結方法の検討. *福井畜試報.*, 16:27-31. 2002.
- 4)Kubisch HM, Rasmussen TA, Johnson KM. Interferon-tau in bovine blasto Cysts following parthenogenetic activation of oocytes: pattern of secretion and polymorphism in expressed mRNA sequences. *Mol eprod Dev.* Jan;64(1):79-85. 2003.
- 5) Kaufman MH, Barton SC, Surani MA. Normal postimplantation development of mouse parthenogenetic embryos to the forelimb bud stage. *Nature.*, Jan 6;265(5589):53-5,1977.
- 6)松川和嗣・赤木悟史・金田正弘・渡辺伸也・永井 卓. ウシ雄性発生胚の作出と体外生.*Jpn.J.EmbryoTransfer.*,30(3)127-133,2008.
- 7)Dochi,O., Imai,K. and Takakura,H. Birth of calves after direct transfer of thawed bovine embryos stored frozen in ethylene glycol. *Anim.Reprod.Sci.*,38:179-185, 1995.
- 8)須崎哲也・永田健一・溝辺敬美・長友隆典・永住浩治・坂元和樹. エチレングリコールとトレハロースを用いて凍結した牛胚の直接移植. *東日本E T研報.*,11:64-65.1998.
- 9)的場理子・成田真知・田川真人・斎藤則夫・今井 敬. 凍結媒液への平衡時間がウシ IVP 胚の凍結融解後の生存性に及ぼす影響. *東日本E T研報.*,21:52-53,2006.
- 10)Fukui Y, Sawai K, Furudate M, Sato N,Iwazumi Y,Ohsaki K. Parthenogenetic development of bovine oocytes treated with ethanol and cytochala-sin B after in vitro maturation. *Mol Reprod Dev.*, Nov;33(3):357-62,1992.
- 11) Boediono A, Saha S, Sumantri C, Suzuki T. Development in vitro and in vivo of aggregated parthenogenetic bovine embryos. *Reprod Fertil Dev.* ;7(5):1073-9.1995.

The Examination to improve the Pregnancy Rate by the Co-transfer of Embryo with Parthenogenetic Activation Embryos

Kiyotaka SASAKI, Ken TANAKA and Takayasu TAKEUCHI

The aim of this study was to improve the pregnancy rate by the co-transfer of embryo with parthenogenetic activation embryo (PA embryo) to secrete a pregnancy signal (interferon τ). Therefore we examined the number of co-transferred PA embryo, the effect of recipient by co-transferred PA embryo and the pregnancy rate of embryo with co-transferred PA embryo. There was no difference between survival rate of the PA embryo frozen with 1.8M ethyleneglycol (EG) and 1.8MEG+0.1M trehalose as cryoprotectant and the survival rate of the PA embryo was significantly lower than that of invitro fertilization embryo. We collected it on Day16 after one, two, ten PA embryos transferred at Day7 and investigated the growth situation of the PA embryo, it was not collected from a PA embryo transferred recipients. But PA embryo of 1-15mm was collected from two PA embryos transferred recipients and ten PA embryos transferred recipients. The return of estrus on one, two PA embryos transferred recipients was investigated, the rate of a PA embryo transferred recipient extended estrus is 50.0% (4/8), that of two PA embryos transferred recipient extended estrus is 87.5% (7/8). Extended estrus cycle in recipients two PA embryos transferred was longer than 30.6 days. The pregnancy rate in recipient of embryo with a co-transferred PA embryos was 40.0% (8/20) and that of embryo transferred was 38.5% (10/26) and there was no difference between the former and the latter. On the basis of the results given above, the effect to control corpus luteum degradation was confirmed by PA embryos transfer, but this examination showed there was no difference between the pregnancy rate in recipient of co-transferred embryo with PA embryos and that in recipient embryo transferred.