

4. 体外受精由来ウシ初期胚の凍結保存技術の開発

ウシの受精卵クローン胚の作製には、16～64細胞期胚がドナー割球として用いられているが、ドナー割球を安定的に確保するためには、凍結した初期胚の利用が欠かせない。しかし、この時期のウシ胚は細胞内脂肪が多く、凍結後に生存胚を得ることは非常に難しい。

そこで発生率を向上させるために、胚の細胞内脂肪を局在化処理として、種々の発育ステージでの遠心を試みた結果、2細胞期での遠心処理は細胞内脂肪が大部分除去された16細胞期胚を高率に得ることができ、それらの胚は、融解後の胚盤胞への発生率が著しく高いことを明らかにした。

内 容

ウシ体外受精由来16細胞期胚を用いて、1細胞期、2細胞期及び8細胞期胚で15.500 g 7分間の遠心による細胞内脂肪の局在化処理の効果を検討した(表紙写真)。CRIaa液にリノール酸アルブミンを添加した培養液を用い、4日目の16細胞期胚を細胞内脂肪の除去程度から2群に分類した。堂地ら(1991)のダイレクト法に準じてストローへ胚を入れ、-6℃で植氷して、-30℃まで0.3℃/分で冷却し、液体窒素に浸漬して凍結した。

10秒間エアソーイング後、30℃温湯で融解した。調査項目として、16細胞期、7日目胚盤胞への発生率を測定し、総細胞数、栄養膜細胞数および内部細胞塊細胞を別々に計測して、内部細胞塊比率を算出した。その結果、16細胞期胚への発生率は1細胞期での遠心処理が他の2区に比べて低かった(1細胞期35.9%、2細胞期89.3%、8細胞期100%、 $P < 0.01$)。また、脂肪が大部分除去された胚に分類された16細胞期胚が得られた割合は8細胞期100%、

2細胞期75.6%、1細胞期51.0%の順となり、8細胞期での遠心処理が他の2区に比べて高かった($P < 0.01$)。さらに、凍結した16細胞期胚の胚盤胞への発生率は2細胞期胚での遠心処理より細胞内脂肪が大部分除去された場合には、遠心しない胚より高く(2細胞期遠心-凍結-脂肪大部分除去区79.3% VS 無遠心凍結区48.9% $P < 0.01$)、細胞数や細胞構成では新鮮胚と差がみられなかった。

今後の方針

経膈採卵で得られた体外受精胚を用いて遠心処理を行い、凍結保存した初期胚を核移植する。

富永敬一郎(中央農技・生物工学研究所)

表 16細胞期胚の細胞内脂肪除去程度と融解後の胚盤胞への発生率との関係

遠心処理した胚の発育ステージ	脂肪除去	供試胚数	胚盤胞率
1細胞期	大部分	25	56.7 ± 35.3 ^a
	少量	28	32.5 ± 28.2 ^b
2細胞期	大部分	47	79.3 ± 13.4 ^{ab}
	少量	28	58.0 ± 26.6 ^{ab}
8細胞期	大部分	36	54.4 ± 28.8 ^{ab}
	無遠心凍結	39	48.9 ± 8.6 ^{ab}
	無遠心新鮮	37	74.4 ± 21.4 ^a

ab,xy: 異符号間に有意差(ab, $P < 0.05$ と xy, $P < 0.10$)。