

7 体外受精由来ドナー胚のガラス化日齢が融解後の核移植に及ぼす影響

ねらいと成果

受精卵核移植において、経膈採卵一体外受精由来初期胚をドナー胚に用いることにより、血統の分かった同一遺伝子を持つ複数胚を作成でき、優良牛の増殖に大きなメリットがある。また、初期胚を保存すれば、ドナー胚が随時確保できることになり、計画的な核移植が実施できる。

体外受精由来初期胚の凍結保存はこれまで困難視されてきたが、1997年に Vajita らによって発表された超急速ガラス化法では、従来のストローよりも内径が細い Open Pulled Straw (OPS) を用いるため、冷却速度が飛躍的に速まり、初期胚の融解後の生存性も向上している。

そこで、体外受精4日目および5日目の初期胚を OPS 法にて保存し、ドナー胚のガラス化日齢が融解後の核移植の発生率に及ぼす影響を調べたところ、4日目胚のガラス化が高い発生率であった。また、経膈採卵由来4日目胚を OPS 法でガラス化保存後融解して行った核移植から子牛が得られた。

内容

(1) 体外受精-体外培養法

食肉センター由来卵巣から採取した卵子を約22時間体外成熟培養後、精子を BO 液で処理し、体外受精を行った。CRLaa 液を用いて体外培養を行い、受精4日目または5日目の胚をガラス化保存した。

(2) 経膈採卵法

超音波画像診断装置に吸引針をつけ、牛の膈壁を

介して卵巣に針を刺し、卵子を採取した。採取卵子を体外受精し、受精4日目胚をガラス化保存した。

(3) 超急速ガラス化法

体外受精4日目または5日目胚を平衡溶液中で2分間平衡し、0.6M Sucrose+20% Ethylene glycol +20% Dimethyl sulfoxideを含む20% CS加 TCM 199 (ガラス化溶液) へ胚を移した後、少量の液とともに胚を OPS に吸引し、30秒保持後に OPS 毎直接液体窒素へ浸漬した。融解方法は37℃に加熱した0.3M Sucrose を含む33% CS加 TCM199に胚を含む OPS を浸漬することでいき、段階希釈後培養液に移し変えた。融解後4日目ガラス化胚は1日間、5日目ガラス化胚は短時間培養し、どちらも5日目胚をドナー胚として核移植を行った。

核移植後の発生率を比較した結果、融合率 (74.0% vs 69.4%) には差がなく、分割率 (71.5% vs 59.9% : $P < 0.05$) と胚盤胞率 (39.7% vs 25.7% : $P < 0.01$) において、4日目ガラス化胚が有意に高かった。

また、経膈採卵由来胚を4日目にガラス化後行った核移植において、発生した3個の胚盤胞を3頭の受胎牛へ移植し、1頭の子牛が得られた。

今後の方針

核移植後の再構築胚のガラス化保存法を検討する。また、未受精卵子のガラス化保存法を検討する。

表 ドナー胚のガラス化日齢と発生成績

ガラス化日齢	核移植数	融合数	融合率 (%)	発生		成績	
				分割数	分割率 (%)	胚盤胞数	胚盤胞率 (%)
	A	B	B/A	C	C/B	D	D/B
4日目	242	179	74.0	128	71.5 ^a	71	39.7 ^A
5日目	219	152	69.4	91	59.9 ^b	39	25.7 ^B

異符号間に有意差 (χ^2 検定 : A, B $P < 0.01$, a, b $P < 0.05$)

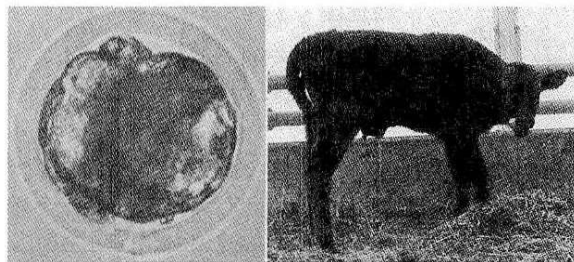


図 移植胚と生産された子牛

濱田 由佳子 (中央農技・生物工学研究所)