

4. ダイレクト法による凍結レシピエント卵子を用いた牛体細胞核移植

谷山 敦・廣川 順太・井上 哲郎・井上 昭芳
(大家畜科)

要 約

未成熟及び成熟卵子をダイレクト法で凍結保存し、レシピエント卵子として体細胞核移植に用いた結果、卵子の生存率は成熟卵子が有意に高く、また核移植による発生率は凍結を行わない卵子に比べ有意に低いが、移植可能な胚盤胞の作出は可能であった。

キーワード：レシピエント卵子、ダイレクト法、凍結保存、体細胞核移植

緒 言

牛核移植に用いるレシピエント卵子を確保するためにと畜場で卵巣を採材しているが、と畜場までの往復に長時間を要し、また雌のと畜頭数が少ない等、十分な卵巣を確保するのに制約がある。そこでレシピエント卵子の保存方法としてダイレクト凍結保存法を検討し、その生存性及び体細胞核移植による発生成績について検討した。

材料および方法

卵子を未成熟のまま凍結する未成熟区と22時間成熟培養後凍結する成熟区および新鮮卵子を凍結せずに用いる対照区を設定し、体細胞核移植の発生成績を比較した(図1)。凍結は、5%エチレングリコール、6%プロパンダイオール、0.1M シュークローズを耐凍剤として用い、20%FBSを添加したmPBSをベースとした凍結液により、卵丘細胞が付着した状態で0.25ml ストローに20個程度吸引し、緩慢冷却法により凍結保存した。

未成熟区	卵子採取	凍結保存	融解	成熟培養22時間	核移植
成熟区	卵子採取	成熟培養22時間	凍結保存	融解	核移植
対照区	卵子採取	成熟培養22時間	核移植		

図1 卵子採取から核移植までの過程

結果および考察

卵子の生存率は、未成熟区(51%)が他区に比べ有意に低く、また成熟区(67%)も対照区(96%)に比べ有意に低かった。成熟率は、未成熟区(50%)が対照区(56%)に比べ有意に低かった(表1)。

核移植成績は、除核率は成熟区(71%)が対照区(82%)に比べ有意に低く、融合率は未成熟区(52%)、成熟区(49%)とも対照区(68%)に比べ有意に低かった。移植可能な胚盤胞の発生率は、未成熟区(12%)、成熟区(11%)とも対照区(28%)に比べ有意に低かったが、胚盤胞の作出は可能であった(表2)。

表1 卵子の生存率および成熟率

試験区	卵子数	成熟数	未成熟数	死滅数	生存率	成熟率
未成熟区	863	219	221	423	51.0% ^A	49.8% ^a
成熟区	552	191	180	181	67.2% ^B	51.5% ^b
対照区	685	365	289	31	95.5% ^C	55.8% ^b

* 成熟数：融解、卵丘細胞除去後、第1極体を放出している卵子数
未成熟数：融解、卵丘細胞除去後、第1極体を放出していない卵子数
死滅数：融解、卵丘細胞除去後、細胞質形態を維持していない卵子数
生存率=(卵子数-死滅数)/卵子数
成熟率=成熟数/(成熟数+未成熟数)
同列異符号間に有意差(大文字:p<0.01、小文字:p<0.05)

表2 核移植成績

試験区	除核			細胞融合		胚盤胞発生		
	除核数	成功数	除核率	融合数	成功率	発生数	発生率	
未成熟区	140	104	74.3%	95	49	51.6% ^A	6	12.2% ^a
成熟区	139	98	70.5% ^A	94	46	48.9% ^A	5	10.9% ^a
対照区	166	136	81.9% ^B	159	108	67.9% ^B	30	27.8% ^b

* 除核率=除核成功数/除核卵子数
融合率=融合成功数/融合数
発生率=胚盤胞発生数/融合成功数
同列異符号間に有意差(大文字:p<0.01、小文字:p<0.05)

核移植や体外受精に用いられる卵子は、主に食肉処理場で採取した卵巣から吸引して用いているが、卵子を凍結保存することにより時間等の制約を軽減できると考えられる。

窪田ら¹⁾は卵子をダイレクト法で凍結保存し、融解後に体外受精、受精卵核移植に用いた試験を行った結果、卵子の生存率は未成熟凍結卵子区が成熟凍結卵子区、対照区に比べ有意に低いと報告しており、今回の試験においても同様の結果であった。また受精卵核移植における除核率では、成熟凍結卵子区が未成熟凍結卵子区、対照区に比べ有意に低いが、核移植による発生率については差が見られないと報告している。しかし今回の試験では、体細胞核移植による発生率は未成熟区、成熟区とも対照区に比べ低い結果であった。

最近、K.Papis²⁾らが生存率の高い未受精卵子の凍結保存方法としてマイクロドロップレット法を報告している。

今後さらに生存性が高く、融解後の体外受精、核移植による安定した胚の生産が可能な凍結保存方法の開発が望まれる。

謝 辞

本研究の実施に当たりご指導いただきました窪田力氏はじめ鹿児島県肉用牛改良研究所の皆様へ深謝いたします。

引用文献

- 1)窪田 力・轟木淳一・山口 浩・溝下和則・田原則雄, 牛卵子の凍結融解後の発生能, 鹿児島県肉用牛改良研究所研究報告, 3:10-16.1998.
- 2)K.Papis, M.Shimizu, Y.Izaike, Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified droplets, Theriogenology, 54:651-658.2000.