

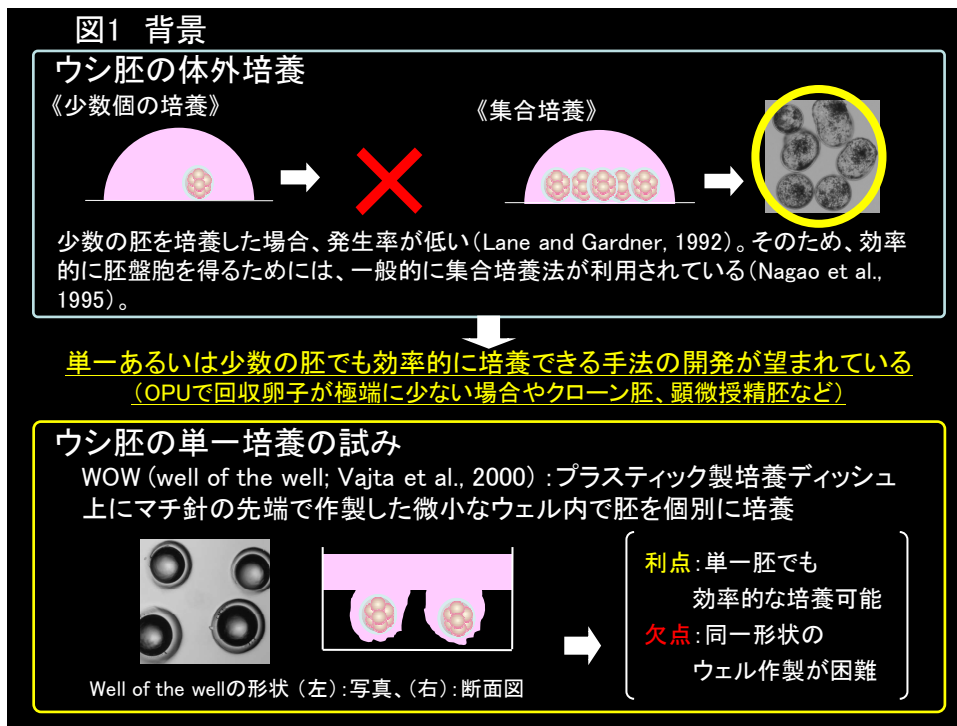
ポリジメチルシロキサン製マイクロウェルを用いて作製した ウシ体外受精胚の移植による受胎

谷口俊仁¹⁾、²⁾、福原順子¹⁾、³⁾、岩本太作²⁾、加藤暢宏²⁾、佐伯和弘²⁾

¹⁾ 和歌山県農技セ畜試、²⁾ 近大生物理工、³⁾ 現 和歌山県動愛セ

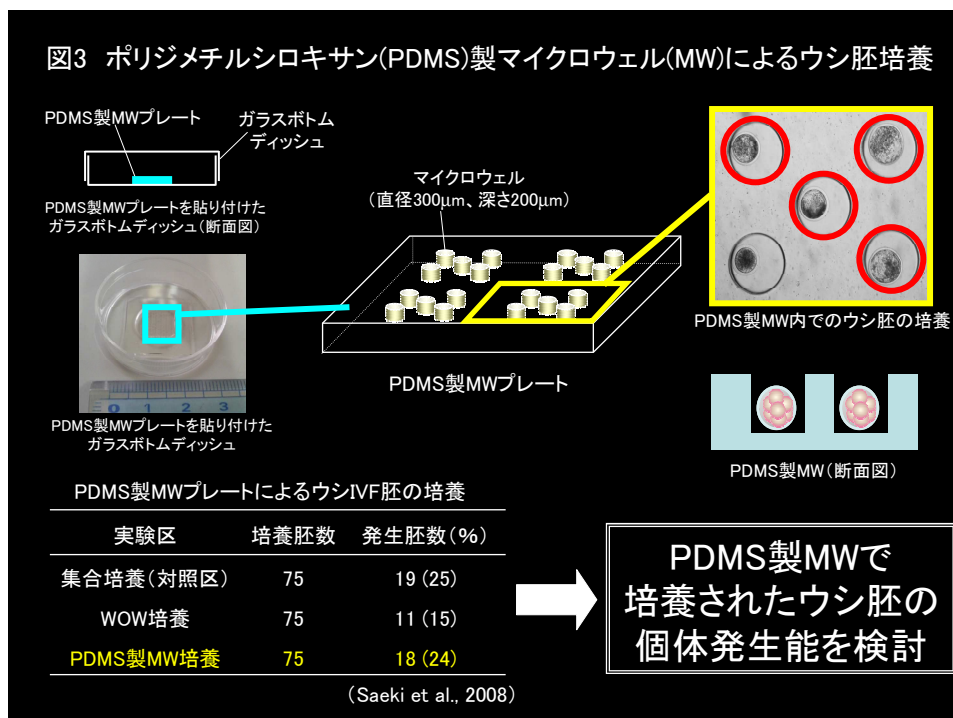
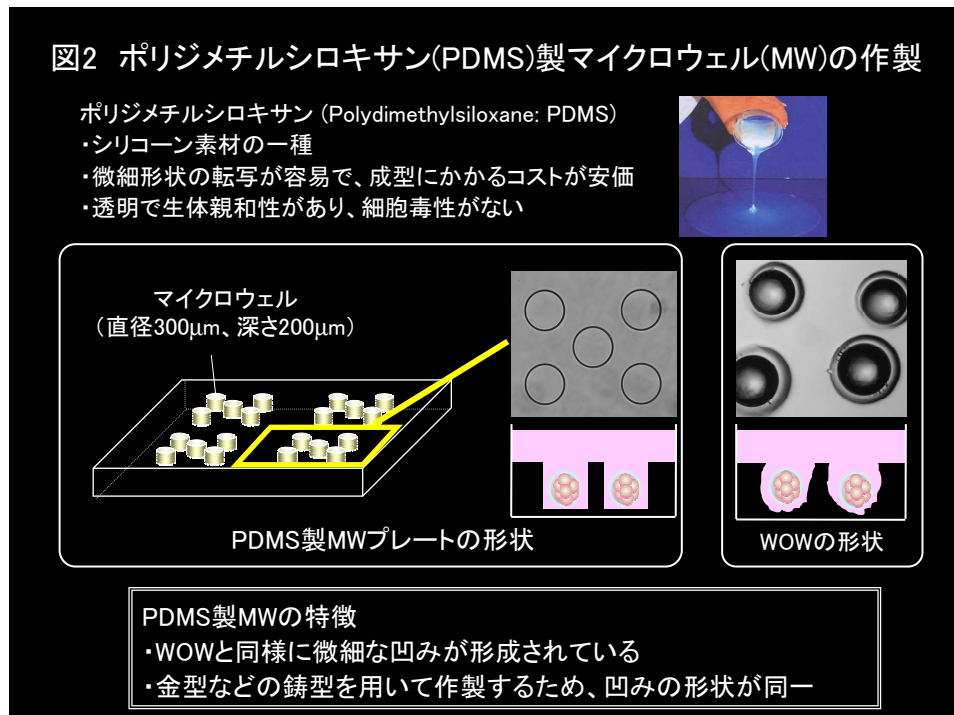
【はじめに】

ウシなどの哺乳動物胚の体外培養では、培地ドロップ内で単一あるいは少数個で培養すると非常に培養効率が低く、胚を効率的に培養するためには多数個を培地ドロップ内で培養（集合培養）する必要がある（Nagao et al., Theriogenology, 1995）。しかし、クローン胚や顕微授精胚など多数の胚の作製が困難な胚を効率的に培養するために少数あるいは単一胚でも効率的に培養できる方法の開発が望まれている。近年、培養ディッシュの底にマチ針の先端で作製した微小な凹み（Well of the well : WOW）の中で単一胚を効率的に培養できる方法が開発された（Vajta et al., Mol. Reprod. Dev., 2000）（図1）。



しかし、WOW は微小な凹みを手作業で作製するため同一形状の凹みを安定的に作製することが困難である。我々はこれまでに、微細加工が容易でコンタクトレンズなどの医用素材に広く用いられているシリコン樹脂の一種であるポリジメチルシロキサン（PDMS）を用いて、WOW と同様な微小な凹み（マイクロウェル：MW）をもつプレートを試作した。PDMS 製 MW プレートは鋳型を用いて作製するため、同一形状の MW を安定的に作製することが可能であった（図 2）。さらに我々は、この PDMS 製 MW プレートを用いるとウシ胚を単一であっても効率的に培養できることを示した（Saeki et al., The 10th World Conference on Animal Production, 2008）。さらに、直径 300 μm、深さ 200 μm の円柱状の MW を用いるともっともウシ胚の発生率が高くなること（岩本ら、日本胚移植研究会講演要旨集、2009）など、MW プレートでの胚培養に関する基礎的な知見を集積してきた。そこで、今回、我々はこの MW プレートによるウシ胚の培養系が、臨床現場で実用的に利用できることを実証するために、経膈採卵卵の体外受精胚の培養に利用した。発生し

たウシ体外受精胚は、受胎雌ウシに移植し、それら胚の受胎能および個体発生能についても検討した（図3）。

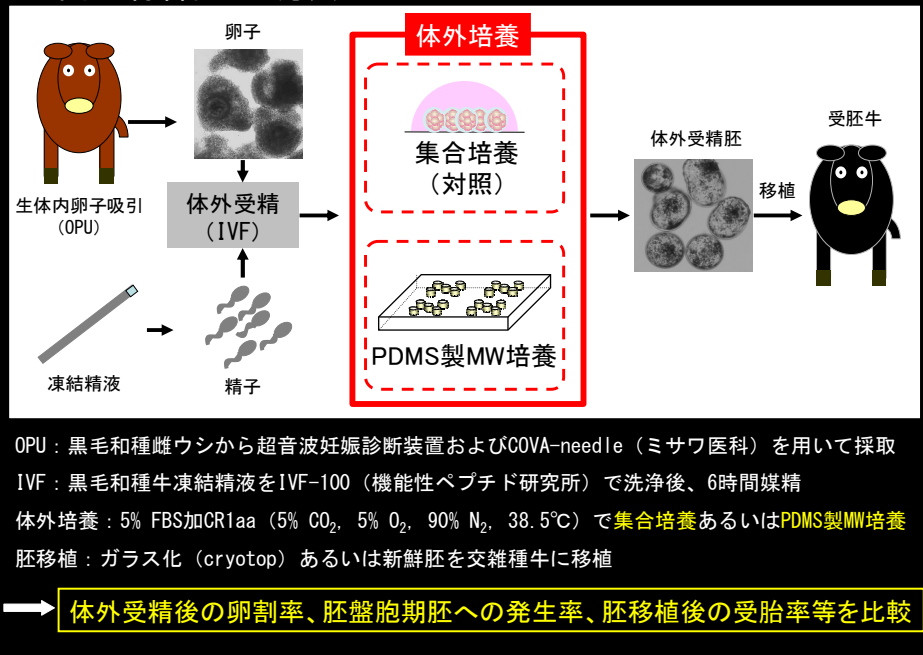


【材料および方法】

体外受精に用いる卵子は、黒毛和種経産雌牛から超音波妊娠診断装置 (HS-1500V、本多電子) および COVA-needle (ミサワ医科) を用いて経膈的に採取した。採取した未成熟卵子は、10% FBS 加 TCM-199 を用いて 20~22 時間成熟培養 (38.5°C、5% CO₂、95% 空気) した。これら卵子を IVF100 (機能性ペプチド研究所) で洗浄した黒毛和種牛凍結精液を用いて体外受精し 6 時間培養した。作製された体外受精胚は、5% FBS 加 CR1aa (Rosenkrans et al., Biol. Reprod., 1993)

を用いて PDMS 製 MW（直径 300 μ m、深さ 200 μ m の円柱状）内で 1 胚を 1 つの MW に導入して培養する単一培養あるいはミネラルオイル下に作製した培地ドロップ内での集合培養（対照）をおこなった（38.5 $^{\circ}$ C、5% CO₂、5% O₂、90% N₂）。受精 2 日目（受精後 48 時間）に卵割率を、受精 7~8 日目（受精後 168~192 時間）に胚盤胞期胚への発生率を調べた。発生胚を、自然あるいは性周期同期化処理による発情後 7~8 日目の受胎雌ウシの黄体側子宮内に新鮮あるいは cryotop（北里バイオファルマ）によるガラス化保存後に移植した。妊娠鑑定は、胎齢 40~45 日に超音波妊娠診断装置を用いておこなった（図 4）。

図4 材料および方法



【成績】

のべ 25 頭の黒毛和種雌牛より合計 279 個の未成熟卵子を採取し、成熟培養および体外受精に供した。体外受精胚を MW プレートでの単一培養あるいは培地ドロップ内で集合培養したところ、受精 2 日目における卵割率はそれぞれ 41% (32/79)、44% (81/186)、受精 7~8 日目における胚盤胞期胚への発生率（発生胚数/卵割胚数）はそれぞれ 38% (12/32)、41% (34/81) であり、MW プレートでの発生率は、集合培養と同等 (P>0.05) であった（表 1）。さらに、MW プレートおよび集合培養で得られた胚盤胞期胚を受胎雌ウシに移植したところ、それぞれ 57% (4/7)、42% (5/12) の受胎雌ウシで受胎を確認した（表 2）。さらに、MW プレートにより培養した胚盤胞期胚を妊娠した受胎雌ウシ 4 頭は、平成 21 年 8 月~9 月に全て正常な産子（雄 3 頭、雌 1 頭）を分娩した。それぞれの妊娠期間は 281~298 日、生時体重は雄では 34.7~36.0kg、雌は 18.9kg であった。現時点で、誕生した子ウシは健康であり、特に異常はみられていない（表 3 および図 5）。

表1 PDMS製MW培養によるウシ体外受精胚の初期発生

実験区	卵子吸引 頭数	吸引卵子数	IVF卵子数	卵割数(%)	発生胚数 (%)
集合培養 (対照)	18	208	186	81 (44)	34 (41)
PDMS製MW 培養	7	86	79	32 (41)	12 (38)

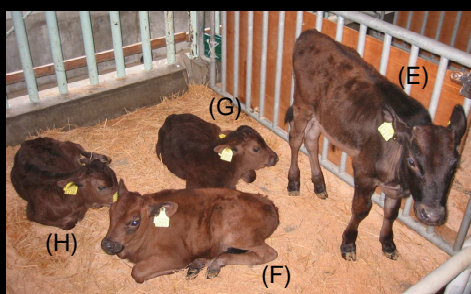
表2 PDMS製MW培養により得られたウシ体外受精胚の移植成績

実験区	移植頭数	受胎頭数 (%)	分娩頭数 (%)	流産頭数 (%)
集合培養 (対照)	12	5 (42)	4 (80)	1 (20)
PDMS製MW 培養	7	4 (57)	4 (100)	0 (0)

表3 PDMS製MW培養により得られたウシ体外受精胚由来産子の分娩状況

実験区	子ウシ	在胎日数	分娩状況	分娩誘起	性別	生時体重
集合培養 (対照)	A	299	安産	なし	♀	38.9kg
	B	289	安産	なし	♀	32.0kg
	C	283	安産	なし	♂	34.5kg
	D	288	安産	なし	♂	31.6kg
PDMS製MW 培養	E	291	安産	なし	♂	34.7kg
	F	292	安産	なし	♀	18.9kg
	G	281	介助	なし	♂	36.0kg
	H	298	安産	なし	♂	35.8kg

図5 PDMS製MW培養により得られたウシ体外受精胚由来産子
(E): H21.8.3生♂、(F): H21.9.15生♀、
(G): H21.9.24生♂、(H): H21.9.28生♂



【結論】

以上の結果より、PDMS製MW内で培養された単一のウシ体外受精胚は従来の集合培養法で発育した胚と同等の受胎能および個体発生能を有することが示された。今後の課題としては、今回誕生したウシの発育能を検討する予定である。また、本PDMS製MWプレートは哺乳動物胚に広く利用できる可能性があることから、すでにヒト胚の培養への適用について検討を開始している。