

牛胚の顕微操作と凍結保存

兵庫県立中央農業技術センター
生物工学研究所 富永敬一郎

はじめに

近年の畜産バイオテクノロジーの進歩は著しく、体内あるいは体外で発育させた後期桑実期～胚盤胞までの胚を子宮へ移植して子牛を生産する胚移植技術や、雌雄両性の配偶子の長期保存を可能にした胚の凍結保存技術が一般的な牛の繁殖技術になってきた。さらに、切断2分離(分断)胚による1卵性双子や性別判定済み胚の移植による性別判明子牛の生産技術についても都道府県や民間の研究機関を中心として野外で実証され始めている。一方、研究室段階では割球分離による知母牛の生産や有用DNAの受精卵への導入によるトランスジェニック動物の作出等の新しい技術について大学や国の研究機関を中心に精力的に研究開発が行われている。

このような人為的に胚を操作して利用価値の高い子牛を生産する技術の中で、牛胚の分断と分断胚の凍結について演者らが実施している概要を紹介する。

1 分断胚のメリット

胚を分断することにより貴重な胚を2倍に利用でき、1卵性双子の作出も可能である。また、フリーマザーにならないため安心して1頭の受胎牛から双子を生産できる。

2 胚の分断技術

胚の顕微操作のために新しいマイクロメーター等の機器の開発が行われている。京大の研究者グループが開発した切断刃が市販されたため、刃の作成が不要となり牛胚の分断が容易になった。演者らもこの切断刃を用い、刃先角45度の刃で横から切断後、15度の刃で上から切断する2段階切断分離法を行っている。1卵性双子作出のためには1対の分断胚の大きさが同じになるように正確に2等分しなければならない。また、染色体検査で性別を判定する時も胚をほぼ同じ大きさに切断した場合に性別判定率が高い。

3 分断胚の凍結のメリットと問題点

一般には新鮮胚を用いた分断胚移植が行われ、1卵性双子が非分断胚移植と同様の高い受胎率で多数生産されている。新鮮胚移植では受胎牛の発情同期化処理が必要であり、分断胚の体外培養は難しいことから、保存や輸送にも問題がある。凍結した分断胚が利用できれば、これらの問題を解決でき、しかも、分断胚を異なる時期に移植して、予め能力あるいは性別が判明した牛の作出も可能となる。しかし、分断胚を凍結した場合、融解後の生存率および受胎成功率は非分断胚に比べ著しく低く、これらを改善するためには分断に供する胚の発育ステージや凍結前の培養条件等を検討する必要がある。

4 分断に供する胚の発育ステージ

後期桑実胚から初期胚盤胞が分断後の凍結に好適であり、胚盤胞は凍結後の生

存性が低いと考えている。

5 分断胚の培養条件

一般に、分断胚の培養は難しく、培養液や培養時間によっても分断胚の生存性が異なると言われている。長時間培養には卵管あるいは子宮上皮細胞と共培養する必要があるが、共培養した場合でも胚の生存性の低下は免れない。そのため、分断胚の生存性に大きな影響を与えない3~4時間の培養時間で血清を添加した Whitten のメディアや BMOC-3 液を用いた培養方法が好結果を得る。

6 分断胚の凍結

できるだけ損傷が少ないように胚を分断した後、短時間胚を培養して、胚の切断部を修復させる。凍結後の分断胚の受胎性を高めるために、透明帯への再封入が有効と思われるが、分断直後の胚は切断部が脆弱であるため、切断後少なくとも1時間培養し、損傷部が丸くなったのを確認した後、透明帯へ分断胚を封入する。凍結処理へはさらに1時間培養して、切断3~4時間後にグリセリン平衡を開始する。Bilton の変法の6段階グリセリン添加除去法や簡易融解移植法である2ステップ法で分断胚も非分断胚と同様の凍結ができる。

7 凍結分断胚の融解

37°C の温湯で急速に融解する。グリセリン除去法は非分断胚で行う6段階グリセリン除去法や2ステップ法と同じであるが、透明帯へ胚を再封入しているため、胚が透明帯の外に出ていることもある。

8 分断胚の生存性の確認

融解直後あるいは短時間培養後の胚の形態と凍結前のそれとの比較によって、損傷程度を(-)(±)(+)の段階で判定する。凍結前の等級がGOODあるいはEXCELLENT であり、凍結後の損傷程度が(-)の分断胚を移植した場合に受胎率が高い。

9 分断胚の移植

非分断胚と同じように性周期を同期化した受胎牛の黄体側子宮角へ1胚あるいは両側子宮角へ1対を1胚ずつ移植する。

おわりに

胚の供給量が飛躍的に増加することは難しいと予測できるため、人工授精が今後とも牛繁殖技術の大きなウェートを占めることは間違いない。しかし、遠くない将来に、凍結分断胚や性別判定済み胚の利用技術の確立した地域では、新しい牛の繁殖システムができることへの期待が大きい。つまり、酪農家は高能力後継牛を取るための供胚牛群と受胎牛群を持ち、他の牛は肉牛生産用受胎牛群に振り当てられる。和牛繁殖農家では肥育用には雄子牛、繁殖用には雌子牛を選択的に生産できる。

このような胚移植をベースとした発生工学技術がもたらす繁殖システムは牛の生産効率を飛躍的に高め、国際競争に負けない強い牛の生産体制を作り出すための最も有力な手段になりうると考える。