

ウシ体外成熟卵子の単為発生に関する基礎研究

福 井 豊

畜産管理学科家畜育種増殖学講座

1. 目 的

哺乳動物卵子の単為発生に関する研究は、主にマウス、ラット、ウサギなどで報告されているが、ウシを含む家畜卵子については少ない。しかし、最近エタノール、サイトカラシン B (CB) や電気融合法により分割卵が得られるようになった。そこで、本研究では、エタノールと CB によるウシ体外成熟卵子の単為発生に及ぼす要因として成熟培養時間と卵丘細胞付着の有無について検討し、その後の胚への発生に及ぼす最適条件を確立することを目的とした。また、発生した胚は、その生存性を検討するために、移植に供した。

2. 材料と方法

と畜場より得たウシ卵巣内の小卵胞より未成熟卵子（第一卵母細胞）を採取し、TCM 199+10% ウシ胎児血清 (FCS) + ホルモン (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FSH, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LH, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ エストラジオール) + 顆粒層細胞 ($1 \times 10^6/\text{ml}$) で、24, 27, 30, 33, 36 時間、39°C, 5% CO_2 in air 下で成熟培養した。培養終了後、各時間毎に卵丘細胞付着または裸化した卵子を 7% エタノールで、7 分間室温処理後 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CB を含む合成卵管液 (Synthetic oviduct fluid medium : SOFM) + 10% FCS で 5~6 時間、39°C,

表 1. ウシ体外成熟卵子の単為発生に及ぼす成熟培養時間と卵丘細胞付着の有無の影響

培養時間	卵丘細胞の有無(+,-)	培養卵子数	発生卵子の割合(%:平均=標準誤差)	
			2-8細胞期	胚盤胞期
24	+	100	30.5 \pm 17.3	2.8 \pm 2.0
	-	105	29.7 \pm 14.3	3.1 \pm 1.6
27	+	105	22.2 \pm 5.2	8.8 \pm 5.5
	-	119	18.4 \pm 4.4	8.8 \pm 4.8
30	+	120	24.3 \pm 5.3	6.6 \pm 3.9
	-	95	46.1 \pm 5.5	9.2 \pm 4.4
33	+	104	28.2 \pm 6.9	6.7 \pm 0.3
	-	110	38.2 \pm 14.5	10.9 \pm 5.5
36	+	95	38.1 \pm 1.1	6.7 \pm 3.6
	-	103	35.1 \pm 5.0	5.2 \pm 1.5

5% CO₂ in air 下で培養した。その後、新鮮な SOFM+10% FCS で7日間、5% O₂、5% CO₂、90% μ₂ 下で培養し、分割率(3日目:2~8細胞期)および胚(胚盤胞期)への発生率(7日目)を記録した。

得られた胚(桑実胚および胚盤胞)の生存性を検討するため、4頭のホルスタイン種未経産雌牛の子宮角内に非外科的に移植した(各子宮角に1個ずつ、計2個/頭)。その後、発情回帰の観察を続け、さらに超音波画像診断装置で妊娠診断を行った。

3. 結 果

ウシ体外成熟卵子の単為発生(分割率および胚盤胞期への発生率)に及ぼす成熟培養時間および卵丘細胞付着の有無の影響を表1に示した。卵丘細胞の付着の有無による影響は認められなかった。成熟培養時間では、24時間培養の場合、胚への発生率は他の培養時間より有意に(P<0.001)低かった。また、27から36時間の培養時間においては、分割率および胚への発生率に有意差は認められなかった(図1)。

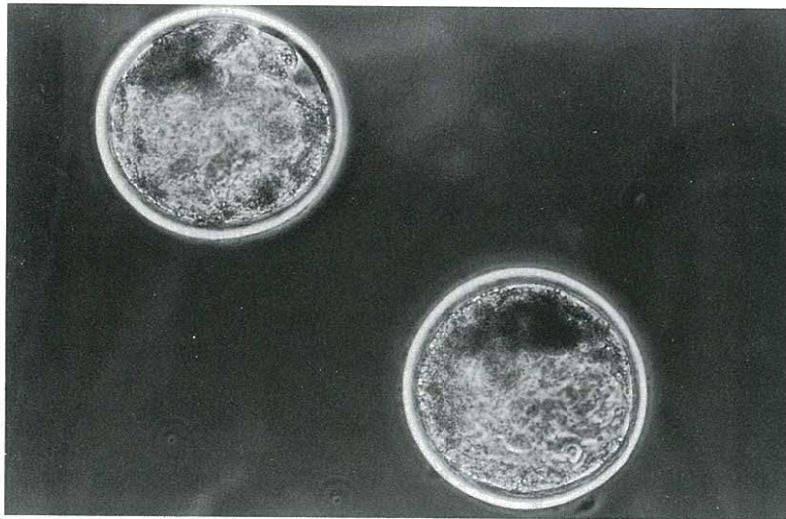


図1. 胚盤胞期まで发育したウシ単為発生卵子

単為発生胚(桑実胚または胚盤胞)を移植された4頭の受胎牛の発情周期は、各々26、35、41および48日と延長した。この内の一頭は、前回発情後35日目に検査された妊娠診断で、受胎が確認された(図2)。しかし、妊娠子宮の大きさは、正常より小さく、胎児心拍は観察されなかった。

4. 考 察

今日まで、マウスとウサギ卵子において単為発生した胚は移植後、妊娠10~11日目まで发育したことが報告されている。しかし、ウシを含む家畜卵子については、6~8細胞期にまでは发育するが、胚盤胞期への発生は報告されていない。また、受胎牛への移植後の単為発生胚の生存性についても報告されていない。本研究は、エタノールとCB処理後体外で胚盤胞期に発生することを認め、さら

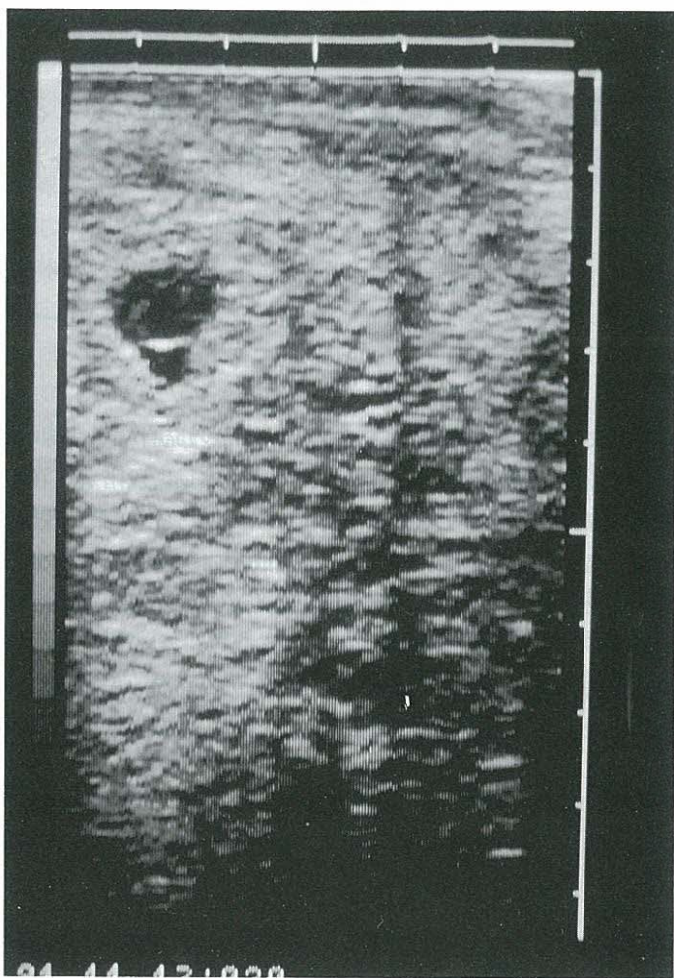


図2. ウシ単為発生胚移植後の妊娠子宮 (35日目)

に受胎牛に移植後妊娠48日目まで発育することを認めた。体外における胚盤胞期への発生率は成熟培養時間によって影響され、少なくとも27時間は必要であることが示唆された。

今後は、体外での胚への発生率をさらに向上させることと、移植後の胚の生存性を高め、ウシ単為発生胚の胎児への発生、分化の機構を研究する必要がある。本研究では実施しなかったが、単為発生胚の性はすべて雌(XX)と考えられる事から、雌生家畜の生産方法の一つとして将来利用される可能性もあると考える。