

[成果情報名]Mild-hypothermia でのウシ体外受精由来胚盤胞の培養は、胚の分化を抑制し、その生存性を向上させる

[要約]ウシ体外受精胚は低温感受性が高いため、ウシ体温（38.5℃）下での胚輸送が行われているが、ウシ体外受精胚を体温よりやや低い温度下（Mild-hypothermia:MH）での保存することで、胚の分化が抑制され、生存性が向上する。また、これらの胚から産子を得ることが出来、ウシ胚輸送方法へ応用できる。

[キーワード]ウシ体外受精胚、胚保存、Mild-hypothermia、低温応答性タンパク質、未分化

[担当]三重県畜研・家畜改良繁殖研究課

[代表連絡先]電話 0598-42-2029

[区分]関東東海北陸農業・畜産草地（大家畜（うち育種・繁殖部門））

[分類]研究・参考

---

### [背景・ねらい]

胚生産技術の発展により、体外受精由来ウシ胚の生産数は、ウシ体内で生産、回収された胚（体内胚）のそれを超過している。一方で、ウシ体外受精胚は低温障害を受けやすく、その保存には課題がある。このため、胚移植に活用される体外受精胚の数は、体内胚のそれより少なく、凍結障害を回避できる新たな体外受精胚活用技術の開発が望まれている。

ヒト神経細胞を体温よりやや低い温度下（Mild-hypothermia:MH）で保存することで、その生存性は向上し、この作用には低温応答性 RNA タンパク質（CIRP および RBM3）が関与するとの報告がある。また、ヒト iPS 細胞を MH 下で保存することで、分化が抑制されるとの報告もある。一方で、MH 下での培養がウシ胚に与える影響については、検討がなされていない。そこで、35℃および 33℃（MH 下）での培養がウシ体外受精胚へ及ぼす影響を調査し、その有用性を明らかにする。

### [成果の内容・特徴]

1. 体外受精 7 日目のウシ胚盤胞を材料とし、10%ウシ胎児血清添加 KSOM を用いて、35℃ および 33℃（MH 下）で培養する。
2. MH 下では、38.5℃下に比べてウシ胚盤胞の拡張の程度は小さく、透明体からの孵化率は低下するが、生存率は高い値で維持された（図 1、2）。
3. MH 下（33℃）で 3 日培養されたウシ胚盤胞では、CIRP 遺伝子、RBM3 遺伝子の発現量が 38.5℃下に比べて増加する。また、これらの胚では、Oct4 遺伝子、Nanog 遺伝子の発現量が 38.5℃下に比べて増加する（図 3）。さらに、これらの胚では、胚の分化の指標である Cdx2 遺伝子発現量と Oct4 遺伝子発現量の比が、38.5℃下に比べて有意に低下する（図 4）。MH 下のウシ胚では、ヒト神経細胞と同様に生存性が向上し、CIRP 遺伝子、RBM3 遺伝子の発現量の増加が認められた。また、これらの胚では、ヒト iPS 細胞と同様に、分化の抑制が示唆された。
4. MH 下で 3 日間培養された胚を 38.5℃に再加温した結果、1 日間培養した胚盤胞の 71.4%（5/7）が透明体より孵化、孵化した胚の直径は増大する（図 5）。
5. 本手法を用い、7 日目のウシ体外受精胚盤胞を MH 下で 2 日間保存し、3 頭の搾乳牛に胚移植、うち 2 頭での受胎を確認した。

### [成果の活用面・留意点]

1. 胚移植に供するウシ体外受精胚の数を増やすことが出来る。また、ウシ胚の MH 条件は、ヒトの体温と同じ温度帯であり、ヒト細胞の保温剤等を利用しウシ胚を遠隔地に輸送する事が出来る。
2. MH 下ウシ胚の受胎性については、更なる調査が必要である。

[具体的データ]

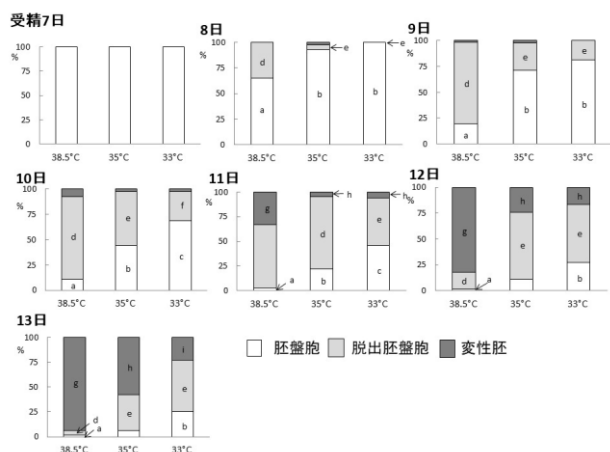


図1 MH下の胚盤胞は、透明体からの孵化率が低下、生存性は改善

(a-c, d-f, g-i:P<0.05)

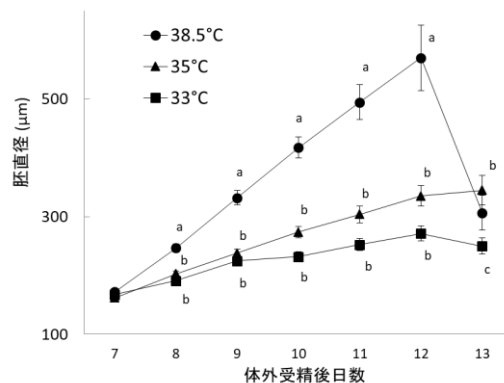


図2 MH下では、胚拡張の程度が低下 (a-c:P<0.05)

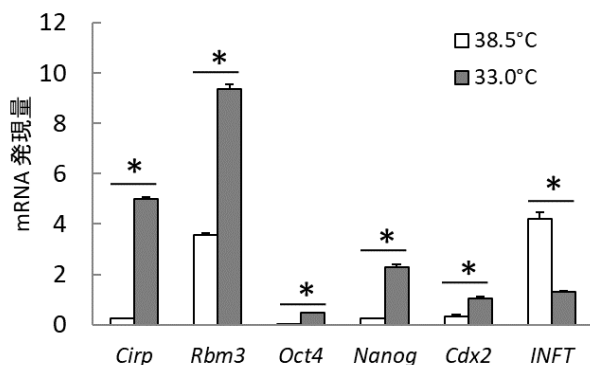


図3 MH下の胚は、低温応答性タンパク質の遺伝子、図4 MH下の胚では、分化が抑制胚の全能性遺伝子の転写発現量が増加  
実験回数3回。平均値と標準誤差を示す。(\*:P<0.05)  
各遺伝子の発現量は、試験開始時のウシ体外受精胚（体外受精7日目）の発現量を1とし比較。

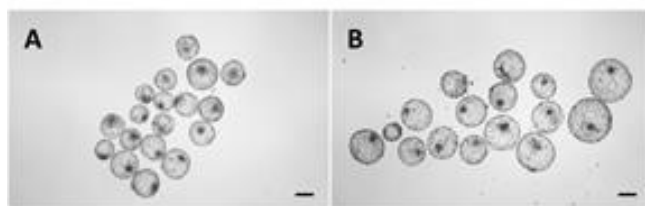
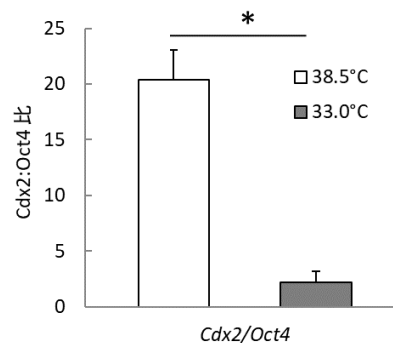


図5 MH下の胚は、再加温により拡張 (A) 33°Cで3日間培養された脱出胚盤胞期胚 (B) (A)胚を38.5°Cで1日間培養  
スケールバー：200 μm

(石井利通)

[その他]

研究課題名：新鮮体外受精卵の保存期間延長化技術の開発

予算区分：県単経常、国費（地方創生推進交付金）

研究期間：2017～2019年度

研究担当者：石井利通、中川雄平、斎藤尚彦、山田雅保（日本医化器機製作所）

発表論文等：1)Ishii T. et al. (2019) J Reprod Dev. 65(3): 275-280.