

ウシ性判別胚の凍結保存の現状

Recent progress in cryopreservation of sex-selected bovine embryos

土屋聖子¹⁾、佐野文彦、三宅晃次

Seiko Tsuchiya, Fumihiko Sano, Kouji Miyake

静岡県畜産試験場

静岡県富士宮市猪之頭 1 9 4 5

1) 現 静岡県中小家畜試験場

Shizuoka Prefectural Livestock Experiment Station,
Inokashira 1945, Fujinomiya, Shizuoka, Japan

To improve post-thaw survival of bovine bisected-embryos that were determined sex, bovine bisected embryos were cryopreserved by conventional slow freezing method and vitrification method. We also compared the protocols of the vitrification methods to develop simplified cryopreservation method for sexed half-embryos in cattle. Between pregnancy rates through direct transfer of half-embryos frozen with 1.8M ethylene glycol (EG), there was no significant difference regardless of 0.1M sucrose (Su) (26.1 %) and trehalose (25.9 %). In contrast, the pregnancy rate (42.1%) of the half-embryos vitrified with 25% EG and 25% dimethylsulfoxide (DMSO)(VSED) and diluted by stepwise method was similar to that of fresh bisected embryos (44.0%) as control. When vitrified half-embryos were diluted with 0.6% glycerol and 0.3M Su solution in straws by one step method immediately after thawing, the pregnancy rate of half-embryos vitrified with VSED was 8.3%. However, in vitro survival of half-embryos vitrified with 15% EG, 15% DMSO and 0.5M Su, and packaged in Cryotop with minimum volume (less than 1 μ l) and that diluted by one step method was significantly increased than that of half-embryos vitrified and diluted with 5% EG and 0.15M Su solution by one step method in straws. These results indicated that vitrification with 15% EG, 15% DMSO and 0.5M Su and using Cryotop is

more suitable method for cryopreservation of bovine sexed half-embryos compared with conventional freezing method and vitrification with VSED in 0.25ml straws

Key Words: ウシ、性判別胚、凍結保存

緒言

ウシの移植現場では、凍結胚の利用が生体胚全体の約 80%を占め、凍結保存技術はすでに実用化されている。これは、受胎率が、新鮮胚と差が認められない程に向上していることや融解後の操作が農家の庭先で簡単にできるダイレクト法という凍結手法が開発され、手軽に凍結胚が利用できるようになったことが挙げられる。一方、人為的処置を施した体外受精胚や核移植胚では、無処置胚と比較して受胎率が低く、凍結保存技術は改善の余地が残されているのが現状である。

雌雄産み分け技術は、胚の段階で PCR 法にて雌雄を判別し、胚移植により希望の性の産子を得る技術である。特に酪農の場合、産子の性が経済性を大きく左右するので、本技術に対する期待が高く、判別胚の供給が望まれている。凍結胚移植が普及している現状を考えると、判別胚の凍結保存は必要不可欠であるが、判別検査は、胚に分割操作を施さなければならず、人為的処置胚における保存法についての検討が必要である。

また、静岡県では、高能力牛群整備促進事業として、アメリカ、カナダの高能力牛由来の供胚牛を生産し、県下酪農家へ胚の有償配布を行っている。平成 12 年度からは、雌雄産み分け技術の導入により、ガラス化保存雌胚の供給を開始し、効率的な家畜改良を可能とした。しかし、ガラス化保存胚の加温後の処理は、顕微鏡下で行う段

階希釈法が前提であるため、現場からは、ダイレクト法やストロー内 1 段階希釈法のように農家の庭先で簡易に処理できる方法を要望する声が非常に高い。加温後の簡易的処理が可能な保存法が確立されれば、性判別胚の更なる利用推進が期待できる。

そこで、家畜雌雄産み分け技術利用促進事業において、27 道府県が、性判別胚の普及を目的とした共同試験を実施し、性判別胚の低温保存方法の検討を行った。さらに、当场において、ガラス化保存した性判別胚の簡易的希釈処理法について検討したので、その概要について紹介する。

材料と方法

1) 家畜雌雄産み分け技術利用促進事業における共同試験

緩慢凍結法によるダイレクト法では、糖類の添加効果、ガラス化法では、段階希釈法について検討した。

供試胚は、ホルスタイン種および黒毛和種の生体胚で、胚全体の容積の 10~20%を分割した、形態評価が B ランク以上の初期胚盤胞から拡張胚盤胞を用いた。

ダイレクト法では、耐凍剤として、1.8M エチレングリコール (EG) を添加した 20% 子牛血清加リン酸緩衝液 (D-PBS) を基礎媒液とし、0.1M シュークロース (Su) または 0.1M トレハロース (Tr) を添加した凍結液を用いた。手法は、プログラムフリーザーを用いた緩慢凍結法で、植氷温度 -7°C 、植氷後保持時間 15 分、冷却速度毎分 -0.3°C 、液体室

素投入温度 -30°C を目安とし、各機関の手法により実施した。融解法は、空気中に10秒曝した後、 37°C の温水に10秒曝し、移植に供した。

ガラス化法では、ガラス化液は、Ishimori et al.¹⁾が報告した25%EGおよび25%ジメチルスルフォキシド(DMSO)から成る溶液(VSED)を用いた。希釈液及び希釈法は、井上ら²⁾の報告に準じ、ストローに充填する希釈液として、6%グリセリン(Gly)、10%シュークロース(Su)及び0.3%ウシ血清アルブミン(BSA)を添加したD-PBS溶液を用いた。加温は、空気中に10秒曝した後、 20°C 水中に10秒浸漬した。段階希釈方法は、ストロー内の液層を混合後、胚をストローから取り出し、4分静置後、0.3%BSAを添加したD-PBS溶液を基礎媒液とした4%Gly、2%Gly、10%Su溶液に順次各2分浸漬し、移植を実施した。

対照として、判別後、凍結保存しない新鮮胚について移植を実施した。

2) ガラス化法における1段階希釈法の検討

試験1：A、B、C法の3種類の液層構成(図1)におけるストロー内1段階希釈後の胚の生存性及び受胎性について調査した。

供試胚およびガラス化法は、既述の1)と同条件で実施した。充填容器は、クリアストロー(容量0.25ml、IMV)を使用した。液層構成として、A、B、C法(図1)で胚を充填した。加温、希釈法は、ストローを液体窒素から取り出し、空気中に10秒曝した後、 20°C の水中に浸漬した。A法は閉封部側、BおよびC法は綿栓部側にストローを振って液層を混合し、再度 20°C 水中で5分間ストローを垂直に静置後、培養試験及び移植試験に供した。培養試験では、胚をストローから取り出し、 $100\mu\text{M}$ β -メル

カプトエタノール(β -ME)及び20%牛胎仔血清(FCS)を添加したTCM199の $50\mu\text{l}$ ドロップに入れ、温度 38.5°C 、炭酸ガス濃度3.0%、飽和湿度の培養条件で実施した。培養開始24、48、72時間後に生存性を調べた。生存性の判定は、肉眼的に胞胚腔が認められ、細胞が緊密に結合しているものを生存とした。移植試験では、ストロー内1段階希釈後、直接移植を実施し、移植50日以降に、直腸検査による胎膜触知法にて受胎を確認した。

試験2：クライオトップを用いた最小容量冷却法およびストローを用いたVSEDによるガラス化法について、1段階希釈後の胚の生存性を比較した。供試胚には、牛体外受精胚及び凍結保存されていた牛体外受精胚を融解後、修復培養により胞胚腔の再形成が認められた胚を用い、既述の1)に準じて、胚を選択し、分割を行った。試験区は、VSEDによるガラス化法を実施した区(ST区)と最小容量冷却法による区(CT区)とした。ST区におけるガラス化、加温及び1段階希釈法は、2)の試験1に準じて実施した。希釈液は、砂川ら³⁾が報告した5%EG及び0.15MSuを添加したD-PBSを用いた。ストローの液層構成は、2)の試験1で実施したB法(図1)で充填した。CT区におけるガラス化法は、Kuwayama & Kato⁴⁾が報告したTCM-199(GIBCO)に15%EG、15%DMSO、0.5MSuおよび20%FCSを添加したガラス化液(株北里サプライ)を用い、同法に準じて実施した。ガラス化手順は、TCM-199に7.5%EG、7.5%DMSO及び20%FCSを添加した平衡液に胚を約3分浸漬後、ガラス化液に移し、1分以内にクライオトップ(株北里サプライ：写真1)のシート(写真2)上に、液量が $1\mu\text{l}$ 以下になるように胚を載せ、液体窒素に投入した。加温、希釈手順は、

ウシ性判別胚の凍結保存

まず、TCM199 に 0.5MSu および 20%FCS を添加した希釈液 (39°C) をストロー (写真 3) に充填した。ストローの液層構成は、綿栓部側から希釈液層 10mm、空気層 5mm、希釈液層 100mm とした。次に、クライオトップ

を液体窒素から取り出し、シート部をストローに挿入 (写真 4)、数秒浸漬後、静かに引き抜き、39°C、5 分間静置した。ストローから取り出した胚は、既述と同条件下で培養試験を実施した。

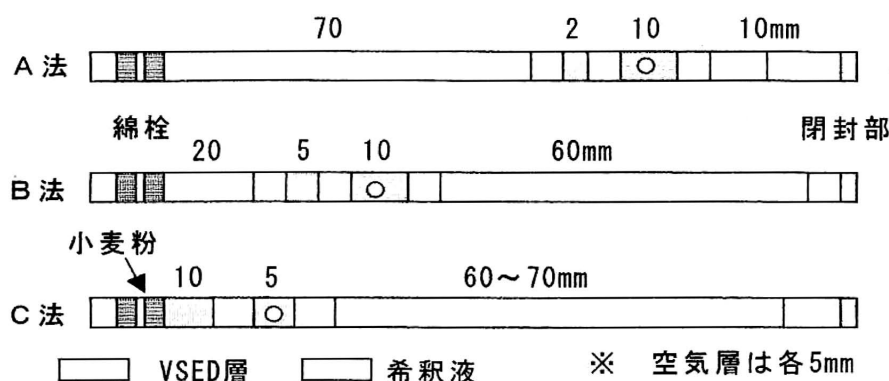
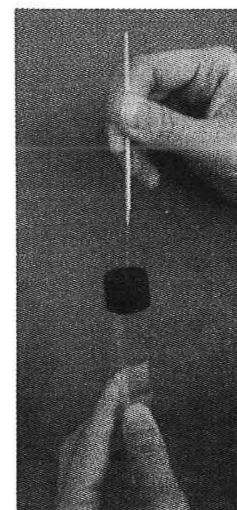
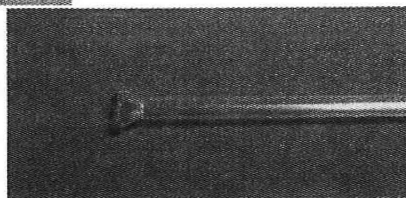
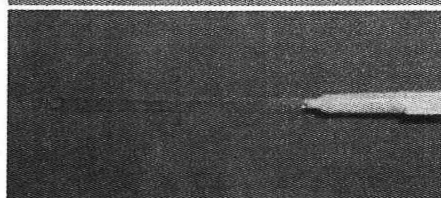
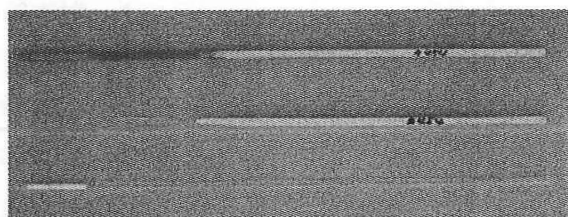


図 1 ストローの液層構成



上段 : 写真 1

下段左 : 写真 2、中央 : 写真 3、右 : 写真 4

結果

1) 家畜雌雄産み分け技術利用促進事業における共同試験

平成 10 年度から 12 年度にかけて実施した牛性判別胚の移植成績を表 1 に示した。新鮮胚の受胎率は、平成 10 年度から順に、47.8% (195/408)、43.1% (135/313)、38.5% (82/213) であった。ダイレクト法の受胎率は、平成 10 年度から順に、1.8MEG+0.1MTr では、25.1% (84/335)、31.5% (52/165)、22.0% (36

/164)、1.8MEG+0.1MSu では、26.5% (57/215)、26.6% (17/64)、24.1% (13/54) で、新鮮胚の受胎率より低く、年度を経ても受胎率の向上は認められなかった。ガラス化法の受胎率は、平成 10 年度から順に、46.2% (42/91)、40.3% (95/236)、42.3% (126/298) で新鮮胚と同等の受胎率が得られ、ダイレクト法より受胎率が高かった。また、ガラス化法を実施する機関の増加により、移植頭数も増加したが、受胎成績に大きな変

化は認められなかった。

2) ガラス化法における1段階希釈法の検討

試験1：ガラス化保存した牛生体分割胚におけるストロー内1段階希釈後の生存性と移植成績について表2に示した。各液層構成の生存率は、A、B、C法で順に、24時間後では、78.6%(11/14)、100%(24/24)、87.5%(14/16)、48及び72時間後では、64.3%(9/14)、83.3%(20/24)、62.5%(10/16)で、有意な差は認められなかった。移植成績による受胎率は、A、B、C法で順に、12.5%(1/8)、0%(0/1)、0%(0/3)で、全ての液層構成で低かったため、供試数がそろわないうちに移植試験を中断した。

試験2：牛体外受精分割胚における1段階希釈後の生存性を表3に示した。ST区では、全ての時点で、46.4%(13/28)であった。CT区では、24、48、72時間後で順に、75.0%(21/28)、75.0%(21/28)、71.4%(20/28)で、全ての時点において、ST区より高く、24、48時間後では、有意差が認められた(P<0.05)。

凍結融解した体外受精胚を分割し、ガラス化により再保存した胚の1段階希釈後の生存性を表4に示した。ST区では、24、48、72時間後で順に、7.1%(2/28)、7.1%(2/28)、3.6%(1/28)、CT区では、82.8%(24/29)、75.9%(22/29)、69.0%(20/29)で、全ての時点において、ST区より有意に高かった(P<0.01)。

表1 家畜雌雄産み分け事業共同試験における牛性判別生体胚の移植成績

年度	新鮮胚		ダイレクト法				ガラス化法	
			1.8MEG + 0.1MTr		1.8MEG + 0.1MSu		25%EG + 25%DMSO	
	移植頭数	受胎頭数(%)	移植頭数	受胎頭数(%)	移植頭数	受胎頭数(%)	移植頭数	受胎頭数(%)
H10	408	195(47.8)	335	84(25.1)	215	57(26.5)	91	42(46.2)
H11	313	135(43.1)	165	52(31.5)	64	17(26.6)	236	95(40.3)
H12	213	82(38.5)	164	36(22.0)	54	13(24.1)	298	126(42.3)

表2 ガラス化保存した牛性判別生体胚におけるストロー内1段階希釈後の生存性と移植成績

液層構成	供試胚数	生存胚数(%)			移植頭数	受胎頭数(%)
		24時間	48時間	72時間		
A	14	11(78.6)	9(64.3)	9(64.3)	8	1(12.5)
B	24	24(100)	20(83.3)	20(83.3)	1	0(0)
C	16	14(87.5)	10(62.5)	10(62.5)	3	0(0)

表3 ガラス化保存した牛体外受精分割胚における1段階希釈後の生存性

試験区	供試胚数	生存胚数 (%)		
		24 時間	48 時間	72 時間
ST 区	28	13 (46.4) ^a	13 (46.4) ^a	13 (46.4)
CT 区	28	21 (75.0) ^b	21 (75.0) ^b	20 (71.4)

(a, b: P<0.05)

表4 凍結融解後に分割、ガラス化した牛体外受精胚の1段階希釈後の生存性

試験区	供試胚数	生存胚数 (%)		
		24 時間	48 時間	72 時間
ST 区	28	2 (7.1) ^A	2 (7.1) ^A	1 (3.6) ^A
CT 区	29	24 (82.8) ^B	22 (75.9) ^B	20 (69.0) ^B

(A, B: P<0.01)

考察

緩慢凍結法によるダイレクト法は、受胎率の向上が認められず、糖類の添加効果による改善も認められなかった。本法は、全体の成績では良好な成績が得られなかったが、今回の成績を実施機関別に見ると、新鮮胚と同等の成績を得られている機関が存在した。ダイレクト法は、人工授精と同じ操作で移植が実施でき、普及性が高いという大きな利点を持つため、手法の再現性について、さらに追及するという方向が残されている。

一方、ガラス化法の段階希釈法では、新鮮胚と同等の受胎率が得られ、性判別胚の保存に適することが判明した。しかし、ストロー内1段階希釈法では、1頭しか受胎が認められず、液層構成による改善も認められなかった。原因として、VSEDは耐凍剤濃度が全体の50%と高いため、ストロー内の1段階希釈操作のみでは完全な希釈ができず、胚が化学的毒性の影響や子宮内での

急激な浸透圧差による傷害を受けたと推察された。希釈液としてエチレングリコールを用い、良好な成績が得られた報告もあり^{3,5)}、安定した希釈ができるストロー内希釈法について検討する余地がある。

試験1で推察された胚への傷害を軽減することを目的とし、超急速冷却によりガラス化する最小容量冷却法を1段階希釈に応用した結果、VSEDのストロー内1段階希釈より有意に高い生存率が得られた。凍結融解により負荷をかけた体外受精胚においても、VSEDでは、ほとんどの胚が死滅したにもかかわらず、最小容量冷却法では、高い生存率が認められた。これらの結果から、クライオトップを用いた最小容量冷却法は、VSEDによるガラス化法より胚に与える傷害が少ないと推察され、すでに分割操作のダメージを受けている性判別胚の1段階希釈に応用できると思われた。さらに、当场において、CT区と同様の手法で、2頭について移植を実施したところ、1頭の受胎が

確認され、現場での実用が可能であることが示唆された。問題点として、超急速冷却法では、脱ガラス化防止のため、的確な超急速加温操作が要求されることが挙げられ、現場での取り扱いに注意しなければならない。クライオトップの他にも、最小容量冷却法を1段階希釈に応用し、良好な成績が得られた報告があり⁶⁾、今後、より簡易で、実践的な手法への検討が必要である。

以上のことから、ガラス化法により、分割操作を施した性判別胚においても、新鮮胚と遜色のない受胎成績が得られることが明らかになり、さらに、クライオトップを用いた最小容量冷却法により、加温後の簡易処理の可能性が開けた。今後、胚へのダ

メージがより少なく、簡易操作が可能な保存法について、さらに開発が進むと思われる。また、これらの保存技術を、保存が難しいとされてきた体外受精胚などの人為的処理胚に応用し、受胎率を改善する検討も必要である。

謝辞

試験にあたり、最小容量冷却法による超急速冷却法について、技術的指導をしてくださった加藤レディースクリニック桑山正成先生、材料を提供して頂いた株式会社北里サプライ、共同試験データの公表を承諾して頂いた家畜雌雄産み分け技術利用促進事業参加道府県の皆様に深謝する。

文献

1. Ishimori et al.: Vitrification of bovine embryos in a mixture of ethyleneglycol and dimethylsulfoxide. *Theriogenology* 40, 427-433, 1993.
2. 井上直弘、大山真二、谷之木精悟、佐藤友治、岩崎英昭：牛操作胚のガラス化保存及び希釈方法の検討.第95回日本畜産学会大会要旨.pp59,1999.
3. 砂川政広、高橋正博：野外において融解後にストロー内希釈・直接移植したガラス化牛胚の受胎性.第95回日本畜産学会大会要旨.pp59,1999.
4. Kuwayama & Kato: All-round vitrification method for human oocytes and embryos. *J. Assist Reprod Genet* 17,8,pp477,2000.
5. 橋村慎二、田中嘉州、仲澤慶紀、岸井誠男：牛性判別胚のガラス化保存及び融解方法の検討.第99回日本畜産学会大会要旨.pp59,2001.
6. 浜野晴三・濱脇淳. 牛胚の保存と利用について. *日本胚移植学雑誌*,23,27-31,2001.