

水溶性プルランフィルムを用いてガラス化保存した ブタ体内生産胚のストロー内一段階希釈法の検討

坂上信忠・山本 禎・西田浩司・秋山 清
(神奈川県農業技術センター畜産技術所)

One-Step-In-Straw Dilution of *In Vivo*-Derived Porcine Blastocysts
after Vitrification using Water-Soluble Pullulan Films

Nobutada SAKAGAMI, Tadashi YAMAMOTO, Kouji NISHIDA
and Kiyoshi AKIYAMA

本試験では、プルランフィルム上でガラス化保存したブタ胚を非外科的に移植する方法として、希釈液を満たしたストロー内に投入して希釈する方法（試験 1）と、ストロー内に希釈液とともに封入してガラス化保存した胚を、加温時にストロー内で一段階希釈する方法（試験 2）を検討した。試験 1 は、過剰排卵処理後、外科的に回収した胚を水溶性プルランフィルム上で超急速ガラス化保存し、希釈液（0.3M スクロース、20% 牛胎子血清添加 PBS）を 0.5ml ストローに封入後 40°C に暖めたウォーターバス内に置き、その中に液体窒素から取り出したプルランフィルムを速やかに挿入して行った。試験 2 は、ストロー内に胚と希釈液を封入して液体窒素に投入してガラス化保存し、加温はストローを 40°C に暖めたウォーターバス内に投入し、綿栓部を押出棒で押すことでプルランフィルムを希釈液に浸漬した。試験 1 では、回収率 95.2%（20 個/21 個）、回収胚に対する生存率 70.0%、透明帯脱出率 40.0% であり、試験 2 では、回収率 76.5%（26 個/34 個）、回収胚に対する生存率 69.2%、透明帯脱出率 23.1% であった。これらのことから、水溶性プルランフィルムを用いてガラス化保存したブタ胚をストロー内で希釈して生存胚が得られることが明らかとなった。

キーワード：ブタ、胚、超急速ガラス化保存、水溶性プルランフィルム

ブタ胚の超低温保存は、優良な遺伝資源の確保と利用に有効な技術である。しかしブタ胚は低温に対する感受性がきわめて高い（Pollard と Leibo 1994）ことから、緩慢凍結法で保存した胚の移植では人工授精と同等の受胎率、産子数を得ることが困難である（Pollard と Leibo 1994）。ところが、ここ数年、超急速ガラス化保存法により保存した胚を加温後に移植することによって子ブタを生産することが可能となった（Kobayashi ら 1998, Dobrinsky ら 2000, Berthelot ら 2000, Beeb ら 2002, Misumi ら 2003, 三角 ら 2006, Cameron ら 2006, Fujino ら 2006）。

我々も、ブタ胚をプルランフィルム上で超急速ガラス化保存し、段階希釈を行うことで 79%

の生存率が得られることを報告している（Sakagami ら 2010）。プルランフィルムはデンプンを原料とした天然の中性多糖で、水に溶けるという特長があり、ブタ胚をのせたプルランフィルムを加温時に希釈液に浸漬することにより、ストロー内で凍結保護物質の希釈が可能となり、直接ストローを移植器に取り付けて非外科的に移植できる可能性がある。

これまでの報告では、マウス胚（Takagi ら 2004, 高木 ら 2006）やウシ胚（坂上 ら 2007）でプルランフィルムを用いた超急速ガラス化保存が報告されており、プルランフィルムを用いた超急速ガラス化保存が可能であることが明らかとなっている。

そこで本試験では、ガラス化保存したブタ胚を直接非外科的に移植するための希釈方法として、希釈液を満たしたストロー内に超急速ガラス化保存胚を投入して希釈する方法と、ストロー内に胚と希釈液を封入してガラス化保存し、加温後ストロー内で一段階希釈する方法を検討した。

材料及び方法

試験 1：ストロー内投入希釈法の検討

供試豚は 3 頭の春機発動前のブタ（ランドレース種）を用い、胚回収は既法（Sakagami ら 2010）を修正して行った。すなわち、供胚豚の耳根部に eCG（Peamex, Sankyo, Tokyo, Japan）1,500 単位を筋肉内注射した後、72 時間後に hCG（Puberogen, Sankyo）500 単位を筋肉内注射することによって過剰排卵処置を施した。交配は、供胚豚に hCG を投与した翌日の午後、翌々日の午前中に行った。

供試胚は hCG 投与翌日を 0 日として 6 日目の午前中にイソフルラン（4-5%）吸入麻酔下で開腹手術を施し、子宮角内をブタ卵子・胚回収液（POE-CM、(株)機能性ペプチド研）で灌流して回収した。回収した胚は、倒立顕微鏡下（倍率 100 倍）で観察し、発育ステージ等により形態的評価を行い、胚盤胞期の 21 胚を用いた。胚は超急速ガラス化保存までブタ胚発生用培地（PZM-5、(株)機能性ペプチド研）を用い、5%CO₂、5%O₂、38.5°C で約 30 分間保存した。

プルランフィルム（シルク印刷用、厚さ 20 μm、

(株)林原商事）は幅 5mm、長さ 10mm に細切し、市販のリップブラシを改良した器具の先端に接着して用いた（図 1）。超急速ガラス化保存は既報（坂上ら 2007, 坂上ら 2010）と同様の方法で行った。すなわち、4~6 個の胚を 20% 牛胎子血清（FBS）添加 D-PBS（m-PBS）に 2 分間静置した後、7.5% エチレングリコール（EG）、7.5% ジメチルスルホキシド（DMSO）、0.3M スクロースを添加した m-PBS（50%EDS30 液）で 4 分間平衡し、その後、超急速ガラス化保存液（EDS30 液: 15% EG、15% DMSO、0.6M スクロース添加 m-PBS）に移し、30 秒以内にプルランフィルム上にのせ液体窒素に浸漬することで超急速ガラス化保存した。液体窒素中では、プルランフィルムをリップブラシの鞘で蓋をして保存した（図 2）。加温および希釈は、希釈液（0.3MS 液: 0.3M スクロース添加 m-PBS）を封入した 0.5ml ストローを 40°C に暖めたウォーターバス内に縦に置き、その中にリップブラシの先端に取り付けたプルランフィルムを液体窒素から取り出し速やかに挿入し 4 分間保持して行った（図 2、3）。

希釈後の胚はストローから取りだし、4~6 個を 50 μl ドロップのブタ後期胚培養用培地（PBM、(株)機能性ペプチド研）で 5%CO₂、5%O₂、38.5°C で培養した。胚は、24 時間後に胞胚腔が再形成された胚を生存胚、48 時間後に透明帯から脱出した胚を脱出胚と判定した。

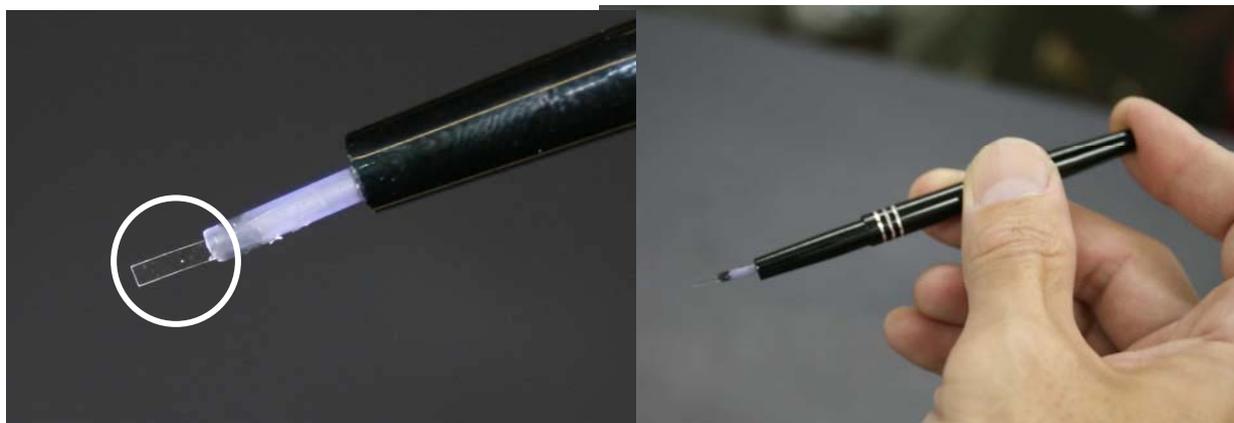


図 1 市販のリップブラシを改良した器具の先端にプルランフィルム（円内）を接着

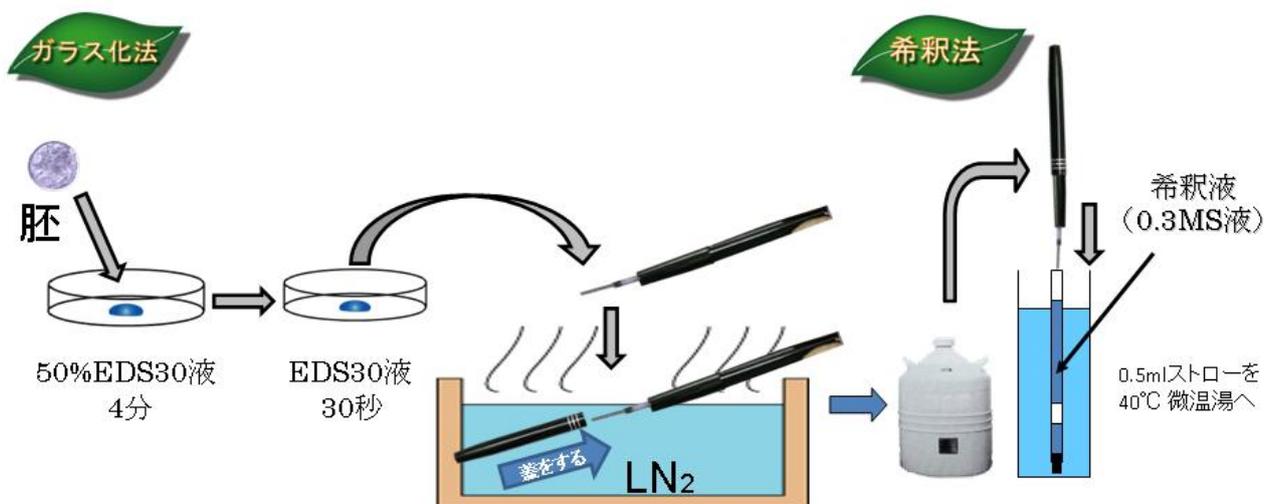


図2 プランフィルムを用いた超急速ガラス化保存法とストロー内投入希釈法

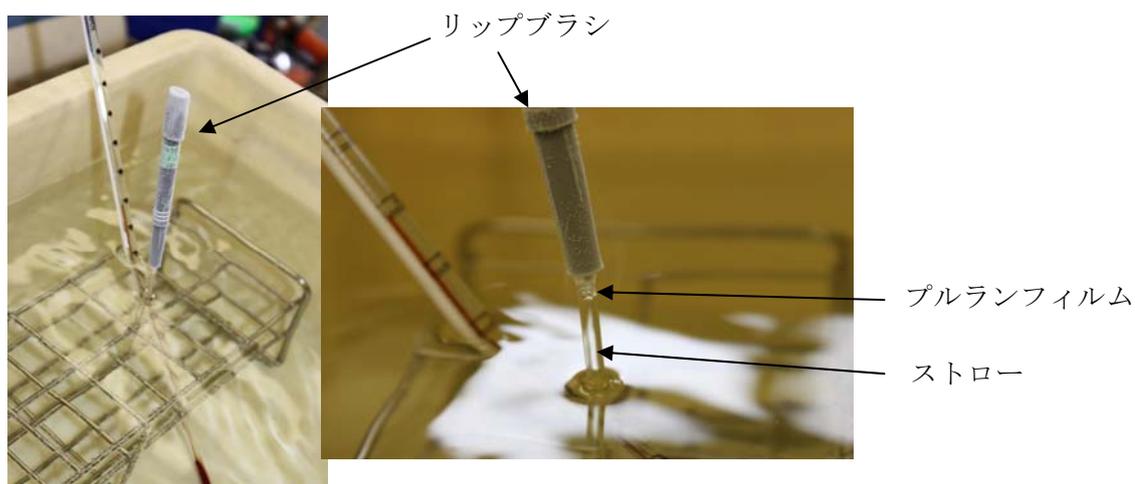


図3 ストロー内投入希釈法の様子
希釈液 (0.3MS 液) で満たした 0.5ml ストローを 40°C 微温湯内に立て(図 3 左)、その中へプランフィルム上で超急速ガラス化保存したブタ胚を投入して希釈した。

試験 2 : ストロー内一段階希釈法の検討

供試豚として 7 頭の春機発動前のブタ (ランドレース種) を用い、試験 1 と同様の過剰排卵処理を行い、人工授精後 6 日目に外科的に採取した胚盤胞 34 個を用いた。

ガラス化保存液、平衡液、希釈液は、無血清培地である 10%ヘパス添加 PZM-5 を基本液として用い、三角ら (2010) の報告を基に機能性ペプチド研究所に作成を依頼した。一次平衡液は 1.8M (10%) EG を含む基本液、二次平衡液は 1.8M EG、0.3M トレハロース及び 1%ポリエチレ

ングリコールを含む基本液、ガラス化保存液は、6M (33.5%) EG、0.6M トレハロース及び 2% ポリエチレングリコールを含む基本液、希釈液は 1.8M EG、0.3M トレハロースを含む基本液を用いた。ガラス化保存に使用した器具は、三角ら (2010) の開発した Micro Volume Air Cooling (MVAC) 法に用いるステンレス製の器具 (図 4) を長さ 15mm ほどに切断し、その先端にプランフィルムを接着したもの (以下、ガラス化器具とする) を用いた (図 5)。



図4 MVAC法に用いるステンレス製の器具

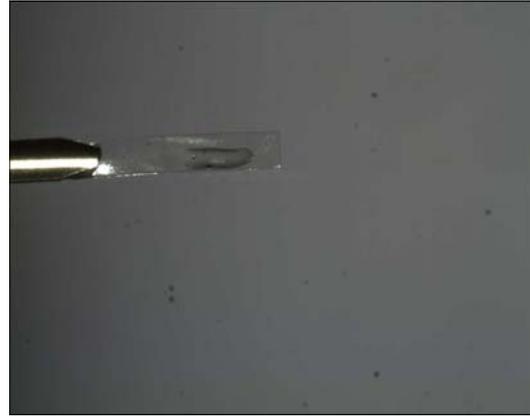


図5 ストロー内一段階希釈法に用いた器具
MVAC法のステンレス製器具の先端に
プルランフィルムを接着

5~6個の胚を一次平衡液に5分間、二次平衡液に5分間、最後にガラス化保存液に投入後、プルランフィルム上にガラス化保存液とともにのせ、希釈液をあらかじめ封入した0.25mlストロー内に挿入し(図6)、液体窒素に投入してガラス化保存した。液体窒素に投入する際には、

ストローの破損を防止するため、スチロールボードを利用してガラス化器具側(プルランフィルム+胚側)から、液体窒素に投入し、ストロー側(希釈液側)は液体窒素ガス中で冷却した。(図7)。

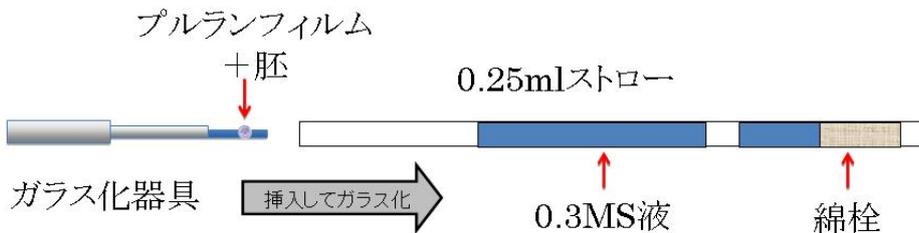


図6 ストロー内一段階希釈のためのストローへのガラス化器具の封入法

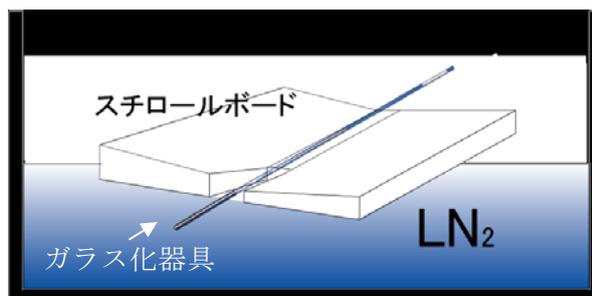


図7 ガラス化器具の液体窒素への投入
スチロールボードを利用して、ガラス化器具先端の胚の部分まで液体窒素内に入るようした。

加温および希釈は、40℃に暖めたウォーターバス内にガラス化器具側の胚の部分までを投入し（図8）、徐々にストロー全体をウォーターバス内へ投入して行った。ストロー内の希釈液が融解した後に、ウォーターバス内にストローを保持したまま、綿栓部を押出棒で押すことでプルランフィルムを希釈液に導入した（図9～11）。導入後はウォーターバス内で綿栓部を下

にして立て4分間静置した。プルランフィルムが溶解したことを確認した後、ガラス化器具をストローから引き抜いた。

加温後の胚はストローから取りだし、5～6個を50μlドロップのPBM内に入れ、5%CO₂、5%O₂、38.5℃の条件で48時間培養し、24時間後の生存胚数と48時間後の透明帯脱出胚数を計数した。



図8 ストロー内一段階希釈法の加温の様子

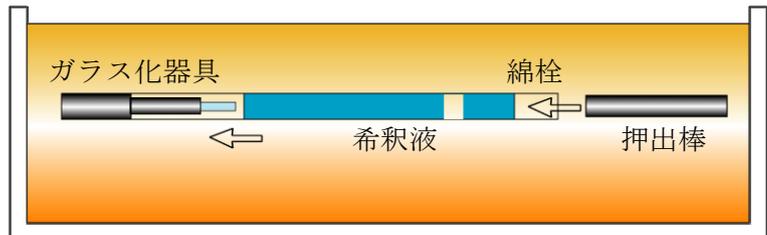


図9 ストロー内一段階希釈法の希釈液への導入
綿栓部を押出棒で押し、プルランフィルムを希釈液に導入する。



図10 ストロー内一段階希釈法の希釈液への導入の様子

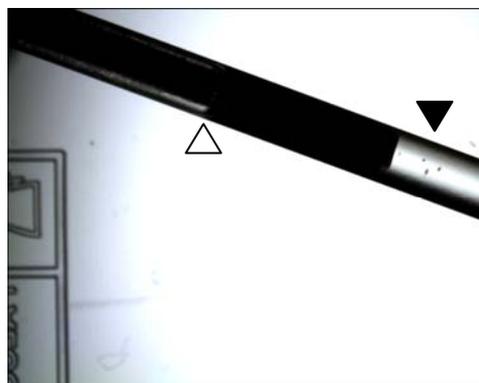


図11 希釈中のプルランフィルム
△は希釈液の液面、▼は希釈中の胚

結果

試験 1：ストロー内投入希釈法の検討

表 1 にストロー内投入希釈法による回収胚の生存性を示した。供試胚 21 個中 20 個を回収し（回収率 95.2%）、生存胚は 14 個（回収胚に対する生存率 70.0%）、透明帯脱出胚数は 8 個（回収胚に対する脱出率 40.0%）であった。

表 1 ストロー内投入希釈法による回収胚の生存性

供試胚数	回収胚数	回収率 (%)	生存及び透明帯脱出胚数	
			生存胚数 (%)	透明帯脱出胚数 (%)
21	20	95.2	14 (70.0)	8 (40.0)

() 内は回収胚に対する割合を示す。

試験 2：ストロー内一段階希釈法の検討

表 2 にストロー内投入希釈法による回収胚の生存性を示した。供試胚 34 個中 26 個を回収し（回収率 76.5%）、生存胚は 18 個（回収胚に対する生存率 69.2%）、透明帯脱出胚数は 6 個（回収胚に対する脱出率 23.1%）であった。

表 2 ストロー内一段階希釈法による回収胚の生存性

供試胚数	回収胚数	回収率 (%)	生存及び透明帯脱出胚数	
			生存胚数 (%)	透明帯脱出胚数 (%)
34	26	76.5	18 (69.2)	6 (23.1)

() 内は回収胚に対する割合を示す。

考察

試験 1 で行ったストロー内投入希釈法では、既報（坂上ら 2010）でウシ胚に使用可能であることを確認した超急速ガラス化保存液及び希釈液をそのままブタ胚に応用した。その結果、プルランフィルムを用いて超急速ガラス化保存したブタ胚は、ストロー内に投入して一段階で希釈が可能になったことが明らかになった。

しかし、その生存率は我々が過去に報告した（Sakagami ら 2010）二段階希釈時の生存率（79%）と比較して低い値であった。その原因は明らかではないが、三角ら（2010）は、MVAC 法で保存したブタ胚盤胞を一段階で希釈し 88.5% と高い生存率を報告していることから、使用したガラス化保存液に問題があると考え、試験 2 では、三角ら（2010）が MVAC 法で用いたガラス化保存液を使用し、予め希釈液を封入したストロー内でガラス化保存し、そのままスト

ロー内で一段階希釈する方法を検討した。

その結果、回収胚数に対する生存率は 69.2% とクライオトップ法（Ushijima ら 2004）（生存率 60%）と同等の生存率であったが、MVAC 法（三角ら 2010）（生存率 88.5%）、オーブンプルドストロー（OPS）法（Cuello ら 2004）（生存率 84.8%）、メタルメッシュガラス化保存（MMV）法（Fujino ら 2008）（生存率 84.4%）での報告より低率であり、生存率をより一層高める工夫や改良が必要であると考えられた。

坂元ら（2008）は、超急速ガラス化保存したウシ胚のストロー内一段階希釈法において凍結保護物質の濃度を 40%（20%グリセリン＋20%EG）にした区が、30%（10%グリセリン＋20%EG や 15%EG＋15%DMSO）と比較して有意に生存性が高いと報告している。本試験では、ガラス化保存液の毒性を勘案して凍結保護物質濃度の低い MVAC 法のもの（EG：6M＝33.5%）

を流用した。このガラス化保存液の組成は三角ら (2010) がブタ胚をステンレス製の針の上へのせ、液体窒素にあらかじめ保持したストロー内に挿入することでガラス化保存する手法に最適な濃度で構成されているので、ストロー内一段階希釈法での有効性については再度検討する必要があると考えられた。

また、今回検討したストロー内一段階希釈法では、回収率が 76.5% と非常に低かった。ガラス化器具をストローに投入する手法では、クライオトップを使用した土屋ら (2002 ab) や稲葉ら (2008) の報告で共に 100% の回収率が報告されている。これらは共に、ストロー内でクライオトップを振とうする方法を用いている。クライオトップ上で超急速ガラス化保存した胚は、希釈液に投入した時にクライオトップから離れにくい場合があるが、本試験で使用したプルランフィルムは希釈液に溶解することから振とうせずにガラス化器具を引き抜く方法を用いた。試験 2 で回収できなかった 8 個の胚のうち 4 個はガラス化器具のステンレス部分に、1 個は綿栓部分に付着していたことが確認されたことから、今後は希釈方法も検討する必要があると考えられた。

本試験では、現場で利用できるようにストロー内で希釈する手法を検討したが、ガラス化保存の手順や希釈手順が複雑で慣れや速やかな操作が必要であり、それらの複雑な操作のため温度降下や加温温度にばらつきが生じ、生存率が低かったのではないかと考えられた。ガラス化保存法の直接移植への応用は、省力化と胚の生存性の両面にメリットを有するが、胚操作におけるわずかな条件の違いによって生存性が大きく影響を受けることが考えられる。生産現場での直接移植に対応するためには、現場での条件に対応可能な安定した手法が必要だと考えられた。

結論として、水溶性プルランフィルムを用いてブタ胚がガラス化保存できることが明らかとなり、さらにストロー内投入希釈法により 70.0% の生存率が得られ、超急速ガラス化ブタ胚をストロー内で希釈して非外科的に移植できる可能性があると考えられた。しかし、ストロー内一段階希釈法では回収率が 76.5% と低かったことから、ガラス化保存及び希釈の手法や、ガラス化保存液及び希釈液の組成をさらに検討する必要があると考えられた。

謝辞

本試験の実施に当たりご指導を頂いた(独)家畜改良センターの三角浩司先生に深く感謝の意を表します。

引用文献

- Beeb LF, Cameron RD, Blackshaw AW, Higgins A, Nottle MB. 2002. Piglets born from centrifuged and vitrified early and peri-hatching blastocysts. *Theriogenology* 57, 2155–65.
- Berthelot F, Martinat-Botté F, Locatelli A, Perreau C, Terqui M. 2000. Piglets born after vitrification of embryos using the open pulled straw method. *Cryobiology* 41,116–24.
- Cameron RD, Beebe LF, Blackshaw AW. 2006. Cryopreservation and transfer of pig embryos. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 62, 277–91.
- Cuello C, Gil MA, Parrilla I, Tornel J, Vázquez JM, Roca J, Berthelot F, Martinat-Botté F, Martínez EA. 2004 In vitro development following one-step dilution of OPS-vitrified porcine blastocysts. *Theriogenology* 62,1144–1152.
- Dobransky J.R, Pursel VG, Long CR, Johnson LA. 2000. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biol. Reprod.* 62, 564– 570.
- Fujino Y, Nakamura Y, Kobayashi H, Nakano S, Suzuki C, Yoshioka K. 2006. Viability of porcine embryos vitrified by the metal mesh vitrification method after surgical or nonsurgical transfer. *Reprod. Fertil. Dev.* 19, 221–222 (abstract).
- Fujino Y, Kojima T, Nakamura Y, Kobayashi H, Kikuchi K, Funahashi H. 2008、Metal mesh vitrification (MMV) method for cryopreservation of porcine embryos. *Theriogenology* 70(5), 809–17.
- 稲葉泰志、小林修司、三角浩司、相川芳雄、大竹正樹、工藤 茂、今井 敬. 2008. Cryotop を用いてガラス化したウシ体外受精胚のストロー内加温・希釈方法の検討. 第 23 回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会講演要旨集, 24: 62–63.
- Kobayashi S, Takei M, Kano M, Tomita M, Leibo SP. 1998. Piglets produced by transfer of vitrified porcine embryos after stepwise dilution of cryoprotectants *Cryobiology* 36, 20–31.
- Misumi K, Suzuki M, Sato S, Saito N. 2003

- Successful production of piglets derived from vitrified morulae and early blastocysts using a microdroplet method. *Theriogenology* 60, 253–60.
- 三角浩司, 鈴木美佐枝, 平山祐理, 藤野幸宏, 米内美晴. 2006. 胚の遠心処理がガラス化及び凍結保存後の豚胚の生存性に及ぼす影響. 日本畜産学会報, 77, 17–22.
- 三角浩司, 平山祐理, 江川紗智子, 山下祥子, 星 宏良, 小西一之. 2010. Micro Volume Air Cooling (MVAC)法による豚胚盤法のガラス化保存方法の検討. 日本養豚学会誌, 47: 80.
- Pollard JW, Leibo SP. 1994. Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology* 41, 101–106.
- 坂上信忠, 秋山清, 横溝翔子, 高木優二. 2007. 水溶性プルランフィルムを用いた牛体外生産胚のガラス化保存. 第 100 回日本繁殖生物学会講演要旨, *J.Reprod.Dev.* 51 (Suppl.), j57.
- 坂上信忠, 阿部宏之, 高木優二, 秋山清. 2010. 水溶性プルランフィルムを用いて超急速ガラス化保存したウシ体外生産胚のストロー内一段階希釈法の検討. 第 65 回関東畜産学会大会講演要旨, p15.
- Sakagami N, Yamamoto T, Akiyama K, Nakazawa Y, Kojima N, Nishida K, Yokomizo S, Takagi Y, Abe H, Suzuki C, Yoshioka K. 2010. Viability of porcine embryos after vitrification using water-soluble pullulan films *J. Reprod. Dev.* 56, 279–284.
- 坂元克弥, 詫摩哲也, 笠 正二郎, 西木秀人, 今井敬. 2008. 超急速ガラス化保存した牛体外受精胚のストロー内一段階希釈法の検討. 第 23 回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会講演要旨集, 24: 60–61.
- Takagi Y., Shimizu M, Kato A, Danguri A, Sakamoto M. 2004, Vitrification of mouse morulae by a new method: pullulan film-straw vitrification. *Reprod. Fertil. Dev.* 16, 183 (abstract).
- 高木優二, 清水真由美, 横溝翔子, 森村典代. 2006. プルランフィルム上でガラス化したマウス胚のストロー内での保存及び融解, 第 99 回日本繁殖生物学会講演要旨, *J.Reprod.Dev.* 52 (Suppl.), j169.
- 土屋聖子, 佐野文彦, 三宅晃次, 桑山正成, 井上保. 2002a. クライオトップを用いたパイオプシーウシ胚の最小容量冷却法によるガラス化保存の検討. 第 17 回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会講演要旨集, 18: 44–45.
- 土屋聖子, 佐野文彦, 三宅晃次. 2002b. ウシ性判別胚の凍結保存の現状. *Journal of Reproduction Engineering* 5: 219– 225.
- Ushijima H, Yoshioka H, Esaki R, Takahashi K, Kuwayama M, Nakane T, Nagashima H. 2004. Improved survival of vitrified in vivo-derived porcine embryos. *J.Reprod. Dev.* 50, 481–486.