

牛性判別胚のガラス化保存方法の検討

秋山清・橋村慎二・坂上信忠・仲澤慶紀・岸井誠男

Vitrification of Bovine Biopsied Embryo for Sex Detection

Kiyoshi AKIYAMA, Shinji HASHIMURA, Nobutada SAKAGAMI, Yoshinori NAKAZAWA
and Yoshio KISHII

雌雄産み分け技術の野外実用化に向けて、性別判定のために顕微操作を施した胚のガラス化保存方法について検討した。試験1では緩慢凍結法とガラス化法の受胎性を調査したところ、緩慢凍結法及びガラス化法の受胎率は28.6%及び75.0%であり、ガラス化法の受胎率が優れていた。試験2ではガラス化法における保存方法別に生存性及び受胎性を調査したところ、融解後の生存率は、段階希釈法で97.3%、ストロー内希釈法で90.5%、超急速ガラス化法で100%であった。また、移植後の受胎率は、段階希釈法で41.0%、ストロー内希釈法で40.0%、直接移植法で42.8%、超急速ガラス化法で58.3%であり、生存率、受胎率ともに超急速ガラス化法が最も優れていた。このことから、性判別胚の凍結保存にはガラス化法が有効であり、実用性の高い手法と考えられた。ガラス化方法別には、超急速ガラス化法の受胎率が最も優れることが明らかとなった。一方、ストロー内希釈法や直接移植法において段階希釈法と遜色ない受胎率が得られ、野外の直接移植に対応できる手法を確立する可能性が示された。

キーワード：性判別胚・ガラス化・超急速ガラス化・耐凍剤除去

性別判定された胚の移植により牛の雌雄産み分けが可能となっている。この技術を野外で実用化するためには、凍結保存された性判別胚を用いて高い受胎率を安定的に確保することが必要である。

性判別胚は性別判定用の細胞を切除されているため、グリセリンやエチレングリコールを用いた緩慢凍結法で凍結保存した場合、移植後の受胎率が低いことが認められており^{1) 2) 3)}、受胎率の高い凍結保存法の確立が望まれている。一方、冷却後に氷晶形成を伴わないガラス化保存法（以下、ガラス化法とする）では、緩慢凍結法に比べて高い生存性が得られることが報告されている^{4) 5) 6)}。また、性判別胚の凍結保存を実用化するためには、凍結胚の利用法の主流となっている庭先融解による直接移植法へ対応可能な手法の確立が望まれる。

そこで、性判別胚の凍結保存方法について、高い受胎率を確保し、直接移植に対応可能な保存法を確立するため、顕微操作を受けた移植用胚のガラス化法について検討した。

材料及び方法

1. 供試材料

当所で飼養する黒毛和種及びホルスタイン種雌牛に過剰排卵処理を施し、人工授精後7日目に採取した後期桑実胚から拡張胚盤胞のA、A'、Bランク胚を試験に用いた。

2. 顕微操作

胚を0.2Mシュークロース添加修正リン酸緩衝液ドロップ上に保持し、倒立顕微鏡下でマイクロマニピュレーターに接続した金属刃（BIO-CUT No 715, FEATHER）を操作し、胚容積の10～20%を切断して移植用胚と性別判定用サンプルに分離した。なお、初期胚盤胞以降の発育ステージの胚では、内部細胞塊を避け栄養膜細胞のみを切断した。

3. 修復培養

移植用胚は、20%牛胎児血清及び100 μ M β メルカプトエタノールを添加したTCM199（FBS β ME199）中で、38.5°C、5%CO₂、95%空気の条件で3～4時間の修復培養を行った。修復培養後、形態的に移植可能と判定された胚を凍結保存に用い

た。

4. 凍結保存

次の2種類の試験を行った。

<試験1> 緩慢凍結法とガラス化段階希釈法による移植成績の比較

(1) 凍結方法

ア 緩慢凍結法

修復培養後の移植用胚を10%エチレングリコール、0.1M シュークロース及び20%子牛血清添加修正リン酸緩衝液で15分間平衡し、0.25ml プラスチックストローに充填した。プログラムフリーザーの-7℃冷却槽にストローを投入し、1分後に植氷し、14分間保持後、-30℃まで0.3℃/分で冷却して液体窒素中に保存した。

イ ガラス化段階希釈法⁴⁾ (以下、段階希釈法とする)

修復培養後の移植用胚を25%エチレングリコール、25%DMSO 及び0.4%BSA 添加修正PBS (以下、VSED) を耐凍剤に用いて次の方法によりガラス化保存した。

移植用胚を50%VSED に60秒間平衡した後、VSED に移し、移動直後から30秒以内に0.25 ml プラスチックストローへ充填し、30秒後に液体窒素蒸気中に静置し、2分後に液体窒素中に浸漬し保存した。

ストロー内構成は図1に示すとおり、綿栓側から6%グリセリン10%シュークロース0.3% BSA 添加 PBS (6%グリセリン)、VSED、VSED と移植用胚、6%グリセリンの順に気層を挟んで溶液を吸引し充填した。

(2) 融解及び耐凍剤除去

ア 緩慢凍結法

ストローを液体窒素より取り出し、空気中で10秒間保持後、20℃の水の中に入れ氷晶が消えるまで保持して融解した。

イ 段階希釈法

ストローを液体窒素より取り出し、空気中で5秒間保持後、20℃の温水中に入れ氷晶が消えるまで保持して融解した。ストローを振って各液層を混合し、内容をシャーレに取り出し4分間保持した。その後、4%、2%、0%グリセリン液にそれぞれ2分間隔で移植用胚を移し換えながら段階的に耐凍剤の除去を行った。

<試験2> ガラス化法別の生存及び移植成績の比較

(1) 凍結方法

ア 段階希釈法

試験1の段階希釈法と同様の手順で凍結保存した。

イ ストロー内希釈法⁵⁾

耐凍剤平衡及び冷却は段階希釈法と同様の手順で行った。

ストロー内構成は図2に示すとおり、綿栓側から、5%エチレングリコールと0.15M シュークロース及び20%子牛血清添加修正 PBS (以下、EGS)、VSED、VSED と移植用胚、EGS の順に気層を挟んで吸引し充填した。

ウ ストロー内希釈直接移植法 (以下、直接移植法とする)

耐凍剤平衡、冷却、ストロー内構成はストロー内希釈法と同様の手順で行った。

エ 超急速ガラス化法⁷⁾

20%エチレングリコール、20%DMSO、0.6M シュークロース及び20%子牛血清添加 TCM199 (以下、EDS) を耐凍剤に用いて次の方法によりガラス化保存した。

移植用胚を10%エチレングリコール、10%DMSO、及び20%子牛血清添加 TCM199に2分間平衡した後、EDS に移し、移動直後から30秒以内にゲルローディングチップへ充填し、30秒後にチップ先端を液体窒素中に浸漬し保存した。

(2) 融解及び耐凍剤除去

融解及び耐凍剤除去は次の方法により行った。

ア 段階希釈法

試験1と同様の手順で融解し耐凍剤を除去した。

イ ストロー内希釈法

段階希釈法と同様の手順でストローを融解し、ストロー内の各液層を混合した後に、綿栓部を上にして20℃の温水中に3分間垂直に保持して耐凍剤の一段階除去を行った。その後、内容を FBS β ME199のシャーレに取り出し、3分間保持した。

ウ 直接移植法

ストロー内希釈法と同様の手順で融解及びストロー内で耐凍剤除去を行い、生存性判定をせずに移植に用いた。

エ 超急速ガラス化法

移植用胚を充填したチップを液体窒素より取り出し、直ちに希釈液1 (0.25M シュークロース及び28%子牛血清添加 TCM199) に浸漬してチップから胚を排出後1分間保持し、希釈液2 (0.125M シュークロース及び20%子牛血清添加 TCM199)、希釈液3 (5%子牛血清添加 TCM199) にそれぞれ5分間隔で移植用胚を移し換えなが

ら耐凍剤の除去を行った。
5. 生存性判定
段階希釈法、ストロー内希釈法、超急速ガラス

化法ともに、移植用胚を FBS β ME199中で2時間程度培養した後に形態観察により生存性を判定した。

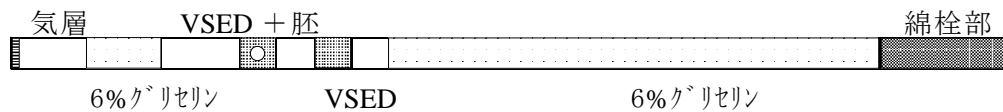


図1 段階希釈法のストロー内構成

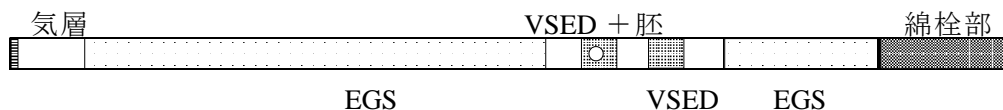


図2 ストロー内希釈法及び直接移植法のストロー内構成

表1 試験区の凍結融解操作の概要

試験区	耐凍剤	凍結容器	希釈方法	希釈液	移植方法
緩慢凍結法	10%EG液	ストロー	-	-	直接
段階希釈法	VSED液	ストロー	段階希釈	GLS液	生存性判定後
ストロー内希釈法	VSED液	ストロー	ストロー内希釈	EGS液	生存性判定後
直接移植法	VSED液	ストロー	ストロー内希釈	EGS液	直接
超急速ガラス化法	EDS液	ゲルローディングチップ [®]	段階希釈	SUC液	生存性判定後

6. 移植

段階希釈法、ストロー内希釈法、超急速ガラス化法で融解後に生存の確認された移植用胚は FBS β ME199とともに0.25ml プラスチックストローに充填し、移植に用いた。直接移植法ではストロー内で耐凍剤除去を行い、移植用胚の生存性判定をせずに直接受精卵牛に移植した。

受精卵牛は発情確認後7~8日目のホルスタイン種及び黒毛和種で、非外科的方法により黄体側子宮角に移植を行った。

妊娠鑑定は移植後35日以降に直腸検査並びに超音波画像診断装置により行った。

7. 統計処理

統計処理は、コンピューターソフト SPSS を用い、生存率及び受胎率について Pearson の χ^2 乗検定または Fisher の直接確立計算法を用いて危険率5%未満を有意差ありとした。

結果及び考察

移植用胚の凍結保存後の生存性及び受胎性を表2に示した。段階希釈法では11個中10個が融解後に形態的に生存と判定され生存率90.9%であった。融解後の移植用胚の受胎性は、緩慢凍結法で7頭中2頭が受胎し、受胎率28.6%、段階希釈法では、8頭中6頭が受胎し、受胎率は75.0%であった。

移植用胚のガラス化法別の生存性及び受胎性を表3に示した。段階希釈法では45個中44個が生存し、生存率は97.3%であった。ストロー内希釈法では42個中38個が生存し、生存率は90.5%であった。超急速ガラス化法では12個中12個が生存し、生存率は100.0%であった。移植後の受胎性は、段階希釈法では39頭中16頭が受胎し、受胎率は41.0%であった。ストロー内希釈法では30頭中12頭が受胎し、受胎率は40.0%であった。直接移植法では14頭中6頭が受胎し、受胎率は42.8%であった。超急速ガラス化法では12頭中7頭が受胎し、受胎率

は58.3%であった。

現在、凍結胚の利用は農家の庭先で融解し耐凍剤除去操作を行わずに直接受卵牛に移植する方法

が主流となっている。性判別胚についても、グリセリンやエチレングリコールを耐凍剤として用いた緩慢凍結法で直接移植に対応するための試みが

表2 緩慢凍結法とガラス化法による移植成績の比較

試験区	融解胚数	生存胚数	生存率	移植頭数	受胎頭数	受胎率
緩慢凍結法	- 個	- 個	- %	7頭	2頭	28.6%
段階希釈法	11	10	90.9	8	6	75.0

表3 ガラス化法における手法別の移植成績の比較

試験区	融解胚数	生存胚数	生存率	移植頭数	受胎頭数	受胎率
段階希釈法	45個	44個	97.3%	39頭	16頭	41.0%
ストロー内希釈法	42	38	90.5	30	12	40.0
直接移植法	14	-	-	14	6	42.8
超急速ガラス化法	12	12	100.0	12	7	58.3

行われているが一部を除き良好な成績は得られていない^{1) 2) 8)}。本試験では性判別胚の凍結保存後の受胎率向上を目的として移植用胚に対するガラス化法の有効性について検討した。

試験1では、移植用胚を緩慢凍結法とガラス化法で凍結保存しその受胎性を比較した。その結果、有意差はないがガラス化法で緩慢凍結法に比べて高い受胎率が得られた。ガラス化法は、冷却後に氷晶形成を示さないことから性判別胚のように顕微操作を受けた胚の凍結保存において有効な手法であることが報告されており^{9) 10) 14)}、本試験でも移植頭数は少ないが同様の結果が得られた。

試験2では、耐凍剤、保存容器及び融解後の耐凍剤の希釈方法等の異なる4種のガラス化法を用いて、移植用胚の融解後の生存性及び移植後の受胎性を比較したところ、融解後の生存率はいずれの方法も高く、手法間で有意な差は認められなかった。移植後の受胎率は手法間で有意差は認められなかったが超急速ガラス化法が最も優れていた。

超急速ガラス化法は微量のガラス化溶液を用いることでストローを用いたガラス化法より冷却と加温速度を速めることが可能であり、耐凍剤濃度を低下させても高い受胎率の得られることが報告されており、種々の方法^{7) 11) 12)}が考案されている。凍結性判別胚の受胎率を高めるためには現状で最も優れた方法と考えられる。しかし、一部で

ストロー内希釈への応用を試みられているが¹¹⁾、多くは庭先融解に対応することは困難であり、手法の改良が必要である。

一方、本試験において庭先融解直接移植への対応を想定したストロー内希釈法や直接移植法において、生存性を確認後に移植を行う段階希釈法と同等の受胎率が得られたことは、性判別胚の凍結利用の簡易化や庭先融解へ対応し得る手法の確立の可能性を示している。しかし、ガラス化法では胚に対する高濃度の耐凍剤による化学毒性や高浸透圧による物理毒性を回避する必要があり、ストロー内構成や操作の的確性が受胎性に及ぼすことが指摘されており¹³⁾、野外実用化に適した普及性の高い手法¹⁴⁾への改良が必要と考えられる。

引用文献

- 1) 沼辺孝・高田直和・佐藤秀俊 他. 牛胚の性染色体分析法及びPCR法による性判別. 日本胚移植学雑誌, 17:183-190. 1995.
- 2) 吉羽宣明・山本信義・福島毅. PCR法による牛胚性判別技術の野外応用. 日本胚移植学雑誌, 18:139-145. 1996.
- 3) 秋山清・仲沢浩江・仲沢慶紀・岸井誠男. 牛性別判定受精卵の凍結融解後の生存性. 神奈川県畜産研究所研究報告, 88:10-14. 2001.
- 4) Ishimori H et. al. Vitrification of bovine embryo

os in a mixture of ethyleneglycol and dimethylsulfoxide. *Theriogenology*, 40:427-433. 1993.

5) 砂川政広・高橋正博. 野外における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, 59. 1999.

6) 葛西孫三郎. 哺乳動物における卵子及び胚のガラス化保存. *日本胚移植学雑誌*, 23:13-17. 2001.

7) 富永敬一郎・浜田由佳子. ウシ体外受精由来初期胚の緩慢凍結及びガラス化保存. *日本胚移植学雑誌*, 23:19-26. 2001.

8) 中里敏・井上哲郎・谷山敦・清松邦章. 長崎県畜産試験場研究報告, ウシ胚の性判別技術の確立(第4報). 10:1-3. 2001.

9) 井上直弘・大山真二・谷之木精吾・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, 59. 1999.

10) 小淵裕子・川島敬二・須藤慶子・砂川政広. フィールド活用した牛ガラス化胚の移植成績. *日本胚移植学雑誌*, 23:32-35. 2001.

11) 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.

12) 斎藤美英・土屋聖子・佐野文彦・手塚弘樹・井上保・三宅晃次. クライオトップ法を用いたウシバイオブシー胚のガラス化保存. 静岡県畜産試験場試験研究報告, 30:25-26. 2005.

13) 土屋聖子・佐野文彦・三宅晃次. ウシ性判別胚の凍結保存後現状. *J. of Reproduction Engineering*, 5:219-225. 2002.

14) 加藤英生・高梨伊知郎・酒井清高・久保田誠寛・中山和彦・葛西孫三郎. 第103回日本畜産学会講演要旨, 126. 2004.