

雌雄判別ガラス化保存ウシ胚のストロー内希釈の検討

小田頼政・黒岩力也・古川 恵・有安則夫・水木 剛

Investigation of the dilution in a straw of vitrified bovine embryos after sex distinction

Yorimasa ODA, Rikiya KUROIWA, Megumi FURUKAWA, Norio ARIYASU
and Takesi MIZUKI

要 約

雌雄判別ガラス化保存ウシ胚の融解方法の簡易化を目的に、ガラス化液の希釈液として0.3% BSA加修正PBS溶液を基礎媒液に3% Glycerolと0.5M Sucroseを混合した溶液を用いたストロー内での耐凍剤の希釈が生存及び受胎率に及ぼす影響について検討した。

- 1 ガラス化液の希釈方法別の生存率は、保存前のランクがAランク胚でストロー内希釈法が88.1% (37/42)、段階希釈法が88.5%(54/61)と同等の成績が得られたが、Bランク胚でそれぞれ61.9%(13/21)、87.5%(7/8)とストロー内希釈法が約25%と低い成績であった。
- 2 ガラス化液の希釈方法別の受胎率は、保存前のAランク胚でストロー内希釈法が45.7% (16/35)、段階希釈法が43.4%(23/53)と同等の成績が得られたが、Bランク胚でそれぞれ8.3%(1/12)、42.9%(3/7)とストロー内希釈法が低く、生存率と同様の傾向がみられた。
- 3 ストロー内希釈法での保存前の発育ステージ別の生存率は、Aランク胚で初期胚盤胞が71.4%(5/7)、他の発育ステージが90%以上であり、初期胚盤胞が低い傾向が見られた。また、受胎率においては、発育ステージの若い後期桑実胚および初期胚盤胞が40%に対し、発育の進んだ胚盤胞および拡張胚盤胞期胚が50%と発育ステージが進んだものが高かった。
- 4 移植前のランク別の受胎率は、ストロー内希釈法ではAランク胚が55.6%(15/27)、Bランク胚が10.0%(2/20)であり、段階希釈法ではそれぞれ45.1%(25/51)、33.3%(3/9)と両法ともAランク胚の受胎率が高かった。

以上のことから、雌雄判別後、ガラス化保存する胚のランクを厳選すれば、融解方法として3% Glycerolと0.5M Sucroseを混合した溶液を用いたストロー内希釈法は有効であり、簡易化が図れることが示唆された。

キーワード： 牛、ガラス化保存法、超低温保存技術、性判別技術

緒 言

家畜において性を人為的に支配することができれば、その経済的効果は大きい。近年、バイオプシーによりウシ胚の少量の胚細胞を用いて雌雄判別できるPCR(Polymerase Chain Reaction)法が確立され^{1,2,3,4)}、実用可能な段階になっている。この技術のより一層の実用化を図るには、バイオプシー胚の保存技術が不可欠であるが、通常の緩慢凍結法で試験が広く実施されたが、満足な受胎率が望めないのが現状である⁵⁾。そこで、高濃度の耐凍剤(ガラス化液)に胚を短時間浸漬後、速い速度で冷却することにより、胚の細胞内部だけでなく、胚の周囲にも氷晶を形成させずに凍結できるガラス化保存法^{5,6,7,8)}が開発されてきている。しかし、ガラス化保存法は高い濃度の耐凍剤を使用するために、融解後は素早くガラス化液を糖類を用いて希釈できる段階希釈法が有効^{5,9,10)}であることが報告されており、これらの技術を実用化に近づけるためにはストロー内で希釈できる融解方法の簡易化が望まれている。

また、ガラス化保存法は高い濃度の耐凍剤を用いるため、段階希釈法での希釈が有効とされているが^{5,9,10)}、この融解方法は煩雑であることから、本研究では、雌雄判別ガラス化保

存胚の融解方法の実用化に向け、簡易化を目的に、ガラス化液の希釈液に0.3% BSA加修正PBS溶液を基礎媒液として、有安ら⁵⁾の報告した段階希釈法に有効であった希釈液を、1段階で希釈できるストロー内希釈法に改善するために、Glycerol量を半量とした3% Glycerolと0.5M Sucroseを混合した溶液を用いてストロー内での耐凍剤の希釈が生存及び受胎率に及ぼす影響について検討した。

材料及び方法

1 供試胚

当センターに繋養する黒毛和種経産牛にFSH-R(デンカ製薬)総量20mgを3日間、少量の細胞で雌雄判別を可能にするため、胚のステージが発育したものを回収できる夕朝¹¹⁾の2回の減量投与方法とFSH投与開始後48時間目に総量3mlのPG-A(武田シリング・プラウアナル社)による過剰排卵処理を行った。人工授精はPG投与開始4日目の朝と夕の2回行った。採胚は、人工授精7日目の朝にハルゼン-V注射液(乳酸加リンゲル液:日本全薬)に1%の子牛血清(CS)を加えたもので子宮を灌流して胚を回収した。採取した胚のうち、後期桑実期から拡張胚盤胞までの品質がA~Bランクと判定されたものを用いた。保存胚は、雌雄判別のために、倒立顕微鏡下で金属製の刃(フェザー工業製: BIO-CUT BLADS)を装着したマイクロマニピュレーターによりバイオプシーした胚を用いた。

2 バイオプシー胚の培養

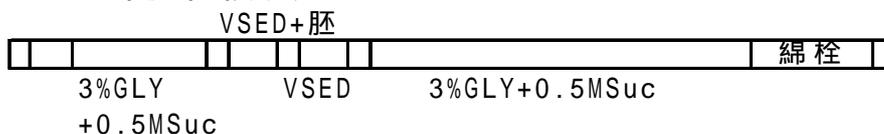
バイオプシー胚は、20%胎児血清(FCS)添加TCM-199液に、100 μ M -Mercaptoethanolを添加の小滴中で3~5時間行った。培養条件は、38.5 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 95%空気の気相下の培養器内で行った。

3 ガラス化保存方法

ガラス化溶液は、Ishimoriら⁶⁾が報告した0.4%ウシ血清アルブミン(BSA)加修正PBS溶液を基礎媒液とし、25%Ethylene Glycol(和光純薬)と25%Dimethyl Sulfoxide(DMSO: SIGMA)からなる溶液(VSED液)を用いた。ガラス化保存方法は、VSED液を基礎媒液で50%に希釈した液中で1分間平衡後、VSED液中に30秒間投入したのち、ストローに吸引し、液体窒素ガス中で2分間静置後、液体窒素に浸漬して行った。

なお、ストロー内の液層は、図1に示すとおりで、ストロー内希釈法は、希釈液として0.3% BSA加修正PBS溶液を基礎媒液に3% Glycerolと0.5M Sucroseを混合した溶液を用い、ガラス化溶液の周りを空気層で隔てたストロー構成とした。段階希釈法は、井上ら⁹⁾の方法に準じて希釈液にはストロー内希釈法と同様の基礎媒液に6% Glycerolと10% Sucroseを混合した溶液を用い、ストロー内構成はストロー内希釈法と同様に行った。

ストロー内希釈法



段階希釈法



図1 ガラス化保存用のストロー構成

4 ガラス化保存胚の加温および培養

ガラス化保存胚の加温は、液体窒素よりシールした部分を上にしてストローを取り出し、10秒間空気中に保持したのち、20 $^{\circ}$ Cの微温湯に投入して加温した。

加温後シールした部分を持ち2~3回振って各溶液を混和し、シャーレ内に全量を取り出し、室温で4分間保持する。ストロー内希釈法は、直ちに20%FCS添加TCM-199液に、

100 μ M β -Mercaptoethanol添加液で洗浄して、同培養液で培養した。段階希釈法は、井上ら⁹⁾の方法に準じた手順で実施した。まず、38℃に加温した0.3% BSA加修正PBSに10% Sucroseを添加した基礎媒液に4、2、0%で加えたGlycerol液でそれぞれ38℃で2分間浸漬したのちに洗浄後培養した。培養時間は、1～5時間行った。

5 胚の移植

生存の判定は、培養後に形態の回復したものを生存とし、ランク付けは、輪郭及び死滅部位の大きさにより行い、A～Bランク胚を1胚ずつストローに吸引封入し、受胎牛に移植した。なお、受胎牛の妊娠診断は、胎齢40日以降に直腸検査法で行った。

結果及び考察

ガラス化液の希釈方法によるガラス化保存前のランク別の融解成績を表1に示した。ガラス化保存前のランク別の生存率は、Aランク胚では、ストロー内希釈法が88.1%(37/42)、段階希釈法が88.5%(54/61)とほぼ同等の成績が得られたのに対し、Bランク胚では、それぞれ61.9%(13/21)、87.5%(7/8)と有意差はないもののストロー内希釈法が約25%低い成績であった。井上ら⁹⁾は性判別のため操作した胚をVSED溶液によるガラス化保存胚を0.5M Sucroseでの一段階希釈の生存率は88.9%と報告し、山崎ら¹²⁾は40% Ethylene Glycol + 18% Ficoll + 0.3M Sucrose(EFS40)を用いたバイオブシーしたガラス化保存胚の0.5M Sucroseでの一段階希釈の生存率は90%と報告しており、本試験においてもAランク胚ではストロー内希釈法で同等の成績が得られた。しかし、Bランク胚の生存率はこれらの報告に比べ、低い成績であった。加藤ら¹³⁾はガラス化溶液に0.3Mシュークロースを含むEFS40を用いた体外受精胚をストロー内希釈後直接移植において、71%の高受胎率を得ている。また、小淵ら¹⁴⁾はVSED溶液と5% Ethylene Glycol + 0.15M Sucrose(EGS)をストロー内へ封入したIntactのガラス化保存胚をストロー内希釈後直接移植し、50.7%の受胎率を得ている。これらの報告のようにストロー内希釈後に直接移植する場合は、シュークロース濃度が低いことが好成績を得たとも考えられる。シュークロースは、細胞内に透過せずに細胞外の浸透圧を高めるので、細胞を収縮させようとする働きがあり、耐凍剤除去過程の細胞の膨張を抑制することができる反面、細胞内の耐凍剤が外に拡散した後は、細胞はシュークロースの影響によって収縮したままとなり、この収縮により卵子の傷害を受ける可能性があることから、本試験において、0.5M濃度のシュークロースを用いたため生存細胞が少ないBランク胚で、特に、希釈時に傷害を受けたものと考えられる。

このことから、今後は、低ランクのガラス化胚の融解には、シュークロース濃度の検討が必要と思われるとともに、当面は、0.3Mシュークロースを用いた段階希釈法が有効と考えられる。

表1 ガラス化保存前のランク別融解成績

方 法	ランク	保存個数	生存個数	死滅個数	個、%
					生存率
ストロー内希釈法	A	42	37	5	88.1
	B	21	13	8	61.9
	計	63	50	13	79.4
段階希釈法	A	61	54	7	88.5
	B	8	7	1	87.5
	計	69	61	8	88.4

ガラス化液の希釈方法によるガラス化保存前のランク別の移植成績を表2に示した。

ランク別の受胎率は、Aランク胚では、ストロー内希釈法が45.7%(16/35)、段階希釈法が43.4%(23/53)とほぼ同等の成績が得られたのに対し、Bランク胚では、それぞれ8.3%(1/12)、42.9%(3/7)と有意差はないもののストロー内希釈法がかなり低い成績であり、受胎率においても生存率と同様の傾向が見られた。川島ら¹⁵⁾はIntact胚をVSED溶液とEGSをストロー内へ封入したガラス化保存胚を、20～22℃で加温・融解後ストロー内希釈し、加温融解した水中

で5分間垂直保持後、38のPBSドロップ中にストロー内容を排出し、胚を3分間浸漬後、形態観察した胚の受胎率が、55.2%(58/105)であり、ランク別では、Aランク胚が58.8%(47/80)、Bランク胚が44.0%(11/25)とランク別で受胎率に差があると報告しており、本試験においても、同様に保存前の胚のランクによる受胎率への影響があることが示唆された。また、山崎ら¹²⁾はETS40を用いたバイオプシーしたガラス化保存胚の0.5M Sucroseでの一段階希釈の受胎率は43%と報告しており、本試験のAランク胚の受胎率と同等の成績が得られ、従来の凍結保存同様に保存前のランクを選別することにより、雌雄判別のためにバイオプシーしたガラス化保存胚のストロー内希釈による簡易化が可能であることが示唆された。

表2 ガラス化保存前のランク別移植成績

方 法	ランク	移植頭数	頭、%		
			受胎頭数	不受胎頭数	受胎率
ストロ-内希釈法	A	35	16	19	45.7
	B	12	1	11	8.3
	計	47	17	30	36.2
段階希釈法	A	53	23	30	43.4
	B	7	3	4	42.9
	計	60	26	34	43.3

ガラス化保存胚のストロー内希釈法での発育ステージ別の融解および移植成績を表3に示した。Aランク胚の融解後の生存率では、初期胚盤胞が71.4%(5/7)と有意差はないものの他の発育ステージに比べ低い傾向が見られ、他の発育ステージでは90%以上であった。また、受胎率では、発育ステージの進んだ胚盤胞および拡張胚盤胞が50%と発育ステージの若い後期桑実胚および初期胚盤胞に比べやや高い傾向が見られた。堂地ら¹⁶⁾は25%Ethylene Glycolと25% Propanediolを用いたガラス化保存したウシ胚の発育ステージ別受胎率では、桑実期胚で57.1%(8/14)を得たが、胚盤胞以上では全く受胎は得られなかったと報告している。また、小淵ら¹⁴⁾はIntact胚をVSED溶液とEGS溶液をストロー内へ封入してガラス化保存し、川島ら¹⁵⁾と同様の方法でストローを加温・融解後、5分間水中で静置後、直接移植を実施した受胎率は、ストロー内希釈後、PBSに浸漬した区において、後期桑実期～胚盤胞までのステージでの受胎率(56.9～56.3%)に差が認められなかったが、ストロー内融解後の直接移植区では、発育ステージの若い後期桑実期～初期胚盤胞が44.3%で発育の進んだ胚盤胞～拡張胚盤胞が55.9～52.9%で発育の若いステージのものがやや低い傾向が見られたと報告している。本試験においても直接移植はしていないものの、ステージ間の受胎率の差と同様の傾向が見られた。葛西⁸⁾は、まず胚を10～20%の耐凍剤を含む毒性の低い溶液で浮遊させて胚の内部に耐凍剤を透過させておき、その後ガラス化溶液に移して脱水を促し、短時間(30～60秒)で液体窒素に移す2段階法は、耐凍剤の透過性の低い卵割初期の胚や胞胚腔の大きい胚

表3 ガラス化保存前のステージ別の融解・移植成績(ストロ-内希釈法)

方 法	ランク	保存個数	生存率	個、%	
				移植頭数	受胎率
後 期 桑実期	A	12	91.7	10	40.0
	B	10	60.0	6	16.7
	計	22	77.3	16	31.3
初 期 胚盤胞	A	7	71.4	5	40.0
	B	5	40.0	2	0.0
	計	12	58.3	7	28.6
胚盤胞	A	2	100	2	50.0
	B	3	66.7	1	0.0
	計	5	80.0	3	33.3
拡 張 胚盤胞	A	21	90.5	18	50.0
	B	3	100	3	0.0
	計	24	91.7	21	42.9

盤胞の胚にも適していると報告している。また、牧野ら¹⁷⁾はEPS40の液量を15mm増量した拡張胚盤胞をストロー内で希釈しても安定して高い生存率が得られたと報告し、砂川ら¹⁸⁾はVSED液のEGS溶液によるストロー内融解・直接移植においてステージ間の受胎率に有意な差がなかったと報告している。これらのことから、ガラス化保存胚の3% Glycerolと0.5M Sucroseを混合した溶液を用いたストロー内希釈法に適する保存前の発育ステージについても、今後、さらに例数を重ねて検討が必要と思われる。

ガラス化保存融解胚の移植時ランク別の移植成績を表4に示した。移植時のランク別の受胎率は、ストロー内希釈法での融解では、Aランク胚が55.6%(15/27)、Bランク胚が10.0%(2/20)と1%水準で有意差が認められ、段階希釈法での融解では、それぞれ45.1%(23/51)、33.3%(3/9)と有意差はないもののBランク胚が低く、両法とも融解胚の移植時のランク不良のもの受胎率は低い傾向が認められた。また、Aランク胚では、ストロー内希釈法が段階希釈法に比べ、10%程度高い成績が得られたことから、ガラス化融解法としてストロー内融解法は有効な手法と考えられた。しかし、表には示していないがAランクからBランクへの融解後のランク低下率が、段階希釈法では3.8%(2/53)であるのに対し、ストロー内希釈法では22.9%(8/35)と高いことから、Aランク胚についても、今後は融解後のランクの低下率を少なくするための希釈方法及び希釈液(特に、シュークロース濃度)の検討が必要と思われる。

表4 融解胚の移植時ランク別の移植成績

方 法	ランク	移植頭数	受胎頭数	不受胎頭数	頭、%
					受胎率
ストロー内希釈法	A	27	15	12	55.6 ^a
	B	20	2	18	10.0 ^b
	計	47	17	30	36.2
段階希釈法	A	51	23	28	45.1 ^c
	B	9	3	6	33.3
	計	60	26	34	43.3

a - b間に有意差あり (p<0.01)

b - c間に有意差あり (p<0.05)

また、保存する胚のランクを厳選すれば、ストロー内希釈が可能でガラス化保存胚の融解法の簡易化が図れることが示唆されたことから、雌雄判別技術をより実用化技術とするために、農家の庭先での直接移植する試験を今後、実施する計画にしている。

謝 辞

稿を終えるに当たり、本試験の移植試験を実施していただきました家畜保健衛生所の関係各位に深謝いたします。

引用文献

- 1) Charies. M. Herr, Neil A. Holt, Klaus I. Matthaei and Ken .C.Reed(1990):SEX OF PROGENY FROM BOVIN EMBRYOS SEXED WITH A RAPID Y-CHROMOSOME-DETECTION ASSAY. THERIOGENOLOGY, 33, 247.
- 2) T. Peura, J. -M. Hyttinen, M. Turunen and J. Janne(1991): A RELIABLE SEX DETERMINATION ASSAY FOR BOVINE PREIMPLANTATION EMBRYOS USING THE POLYMERASE CHAIN REACTION. THERIOGENOLOGY, 35, 547-555.
- 3) 内海恭三(1990):胚の性判別に関する研究の現状と問題点. ETニュースレター, 7, 16-27.
- 4) 佐伯和弘(2001):PCR法による胚の性判別とその実用化. 畜産技術, 11, 5-8.
- 5) 有安則夫・小田頼政・中原 仁・坂部吉彦(2000):ガラス化保存法による性判別受精卵の凍結保存技術. 岡山総畜セ研報, 11, 1-3.
- 6) H. Ishimori, Y. Miki, M. Kishi, K. Saeki, N. Seike and H. Kainuma(1992): VITRIFICATION OF BOVINE EMBRYOS. THERIOGENOLOGY, 37, 228.
- 7) 葛西孫三郎(1997):受精卵の凍結保存 - 緩慢法とガラス化法. 家畜人工授精, 183, 12-21.

- 8) 葛西孫三郎(2001)：哺乳動物における卵子及び胚のガラス化保存．日本胚移植雑誌，23，2-17．
- 9) 井上直弘・大山真二・谷之木精悟・佐藤友治(1999)：牛操作胚のガラス化保存及び希釈方法の検討．第10回西日本胚移植研究会大会講演要旨，31．
- 10) 濱田由佳子・富永敬一郎(2001)：ゲル・ローディング・チップを用いたウシ胚のガラス化保存．家畜人工授精，205，8-14．
- 11) 野上與志郎・小田頼政・中原 仁(2000)：卵胞刺激ホルモン剤の夕・朝処理法により7.0日齢に採取された牛胚の品質と発育．日本胚移植学雑誌，22，51-57．
- 12) 山崎慎一郎・野村康宏・川井昭雄・葛西孫三郎(2000)：EFS40を用いた牛性判別胚のガラス化保存法の検討．第7回日本胚移植研究会大会 第11回西日本胚移植研究会大会講演要旨，41．
- 13) 加藤英生・中山和彦・酒井清高・久保田誠寛・海老沢信子(2001)：ガラス化保存したウシ胚の直接移植に関する検討．第16回東家畜受精卵技術研究会大会，34-35．
- 14) 小淵祐子・川島敬二・須藤慶子・砂川政広(2001)：フィールド活用した牛ガラス化胚の移植試験．日本胚移植学雑誌，28，32-35．
- 15) 川島敬二・須藤慶子・小淵祐子・高橋正博・砂川政広(2000)：ストロー内希釈後に加温PBSにて希釈したガラス化牛胚の野外移植成績．第15回東日本受精卵技術研究会大会，46-47．
- 16) 堂地 修・高倉宏輔・今井 敬(1990)：ガラス化による超低温保存したウシ胚の移植．家畜繁殖学雑誌，36，69-72．
- 17) 牧野薫子・加藤絹代・枝重圭祐・葛西孫三郎(1997)：ガラス化保存胚の直接移植のためのストロー内希釈法の開発．第92回日本畜産学会大会講演要旨，202．
- 18) 砂川政広・高橋正博(1999)：野外における融解後のストロー内希釈・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講演要旨，99．