

ウシ性判別胚のガラス化保存における保存液の種類・バイオプシーと保存処理の順序・保存前培養の有無が保存後の受胎性に及ぼす影響

大下雄三・米村 功・妻由道明

要 約

雌雄判別胚の凍結保存は、雌雄産み分け技術の普及を図るための必須技術であり、平成14年度から平成16年度にわたり全国の27道府県の試験研究機関と共同して雌雄判別した胚の凍結保存技術について検討した。

1 平成14年度は雌雄判別卵の凍結保存法としてガラス化法の保存液を比較した。当场においては、ガラス化保存ではVSED区の方がGESX区より若干受胎率が高かった。緩慢冷却区では受胎例が得られず、新鮮胚区は受胎例があった。

2 平成15年度はバイオプシー前にガラス化保存し融解後に性判別・移植を行う区（ガラス化後判別区）と、バイオプシー後にガラス化保存し融解・移植する区（判別後ガラス化区）で、どちらの手法が生存性及び受胎率が高いか比較検討した。当场においては受胎率は性判別前ガラス化区で10%、判別後ガラス化区で30%と判別後ガラス化区で統計的有意差は無いが受胎率は高かった。

3 平成16年度は雌雄判別のため一部の細胞をバイオプシーした後に3時間培養した場合としない場合の凍結保存への影響を比較した。当场においてはバイオプシー直後に凍結保存する区は受胎率36.7% (4/11)、3時間培養した区は受胎率45.5% (5/11)で、統計的有意差は無いが3時間培養した場合が受胎率が高かった。

緒 言

ウシ性判別卵の移植における受胎成績は、新鮮卵の移植においては実用的な成績が得られている。しかし、新鮮卵で移植するためには受卵牛の発情同期化が必要であり、さらに移植実施場所が試験場等から遠くない範囲に限定される。これらの問題から、ウシ性判別卵の移植は現場で容易に実施する技術には至っていない。これらの問題の解決のため、距離や時間の影響を受けない雌雄判別卵の凍結保存卵の実用化が望まれている。

卵子あるいは雌雄判別のためバイオプシーされた牛胚を緩慢冷却法による凍結保存した場合、その生存性が大きく減じることが知られており¹⁾²⁾、これらの超低温保存法としてガラス化法の有効性が報告されている。ガラス化保存法は、凍結保存時に氷晶が形成されないので氷晶による細胞への物理的障害の発生が低減出来る。また

細胞などにとって危険とされる温度域に曝される時間を短縮することが可能となる点などの有効性を持っている。一方、ガラス化保存法は高い耐凍剤濃度の保存溶液を用いるために、耐凍剤による細胞毒性が懸念される。また高い浸透圧を持った保存液による大きい浸透圧変化の障害などの欠点が指摘されている。

平成13年度の全国共同試験の雌雄判別済み凍結受精卵の受胎率は、ダイレクト法22%、ガラス化法25%であり、凍結保存法をさらに改良することによる受胎率の向上が必要である。そこで、平成14年度から平成16年度にかけて全国の共同研究により、ガラス化凍結液組成の比較等により高い受胎率が期待できる雌雄判別卵の凍結保存法を検討した。

試験として平成14年度には、ガラス化溶液にVSED液³⁾とGESX液⁴⁾を用いた場合の凍結保存後の胚の生存率と移植後の受胎率を調査した。試験として平

成15年度には、凍結保存胚やガラス化保存胚を融解または加温後にバイオブシーし性別を行ってから移植した場合でも、受胎し産子が得られることが確認されていることから、バイオブシー胚をガラス化保存した場合と、ガラス化保存胚をバイオブシーした場合の生存性及び移植後の受胎性を比較し、実用的な方法はどちらであるかを検討した⁵⁾。試験として平成16年度には、雌雄判別のため一部の細胞をバイオブシーした後に3時間培養した場合としない場合で移植後の受胎能力への影響を比較した。

材 料 及 び 方 法

1 供試ウシ胚（試験、で共通）

発情後9～14日の供胚牛（黒毛和種）に、卵胞刺激ホルモン（FSH）の20AU減量投与による過剰排卵処理を行い、処理開始から3日目の午前中にプロスタグランジン製剤（PGF2）にて発情を誘起した。5日目の午後と6日目の朝に人工授精を実施し受精後7日目に回収した。回収されたA～Bランクの胚を供試した。

胚を取り扱う基礎培養液には、10%（V/V）ウシ胎子血清（FBS）を含む25mM HEPES緩衝TCM-199（インビトロジェン）を用いた。移植に用いる胚は、各試験区の処理後、短時間培養し、生存している胚を発情後7日目の黒毛和種及びホルスタイン種雌牛に移植することにより受胎率を調査した。

2 試験方法

1) 試験

ガラス化VSED区（VSED区）では耐凍剤に25%エチレングリコール（EG）+25%ジメチルスルホキシド（DMSO）を用い、0.25mlストローに封入し液体窒素中で保存した。

ガラス化GESX区（GESX区）では耐凍剤に20%グリセロール（GLY）+20%EG+0.3M SU+0.3Mキシロース（XYL）+3%ポリエチレングリコール（PEG）を用い0.25mlストローに封入し液体窒素中で保存した。

緩慢冷却保存区では、耐凍剤に1.8MEGを用い緩慢に冷却し液体窒素中で保存した。

新鮮胚移植区では、凍結せずに新鮮胚で移植した。

2) 試験

胚を回収後直ちにバイオブシーを行う区（判別後ガラス化区）及びバイオブシーせずにガラス化保存し融解後にバイオブシーして性別する区（ガラス化後判別区）を設定し、ガラス化VSED保存法により、0.25mlストローに封入し液体窒素中で保存した。胚のバイオブシーは、金属刃（バイオカッター）を用いて行った。

3) 試験

雌雄判別のためバイオブシーした後に3時間培養し凍結保存した区（3時間区）及びバイオブシー後に直ちに凍結保存した区（0時間区）を設定し、オープンブルドストロー法（OPS法）により耐凍剤に20%EG+20%DMSOを用い、OPSに封入し液体窒素中で保存した。

結 果

1 試験

データ数が少ないが、ガラス化保存ではVSED区が1/3(33%)とGESX区1/4(22%)より若干受胎率が高かった。緩慢冷却区では受胎例が得られず、新鮮胚区は受胎例(1/2)があった。

各県のデータと合わせた総合的な検討では、VSED区が19/33(35.2%)でGESX区15/62(31.9%)であり、両区に統計的有意差は認められなかった。

表1 凍結保存方法別の受胎成績

試験区	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
VSED区	3(66)	1(19)	33(35.2)
GESX区	4(62)	1(15)	25(31.9)
緩慢冷却区	2	0	0
新鮮胚区	2(60)	1(21)	50(39.6)
計	11	3	36

* カッコ内は全国共同試験の成績

2 試験

移植可能胚数は両区共に62.5%であった。移植に対する受胎率は、判別後ガラス化区で30%、ガラス化後判別区で10%と判別後にガラス化保存した方が受胎率が高い成績であった。各県のデータと合わせた総合的な検討では、判別後ガラス化区が33.9%でガラス化後判別区が34.1%で両区に差はなかった。

表3 バイオブシーと保存処理の順序別の受胎率

区分	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
判別後ガラス化区	10(62)	3(21)	30(33.9)
ガラス化後判別区	10(44)	1(15)	10(34.1)

* カッコ内は全国共同試験の成績

3 試験

バイオブシー直後に凍結保存する区を受胎率は 36.7% (4/11)、3時間培養した区を受胎率は 45.5% (5/11)で、統計的有意差は無いが3時間培養した場合が受胎率が高かった。

表5 保存前培養時間別の移植後受胎率

区分	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
0時間区	11	4	36.7%
3時間区	11	5	45.5%
合計	22	9	40.9%

考 察

1 試験

性判別胚の凍結保存方法としては緩慢冷却区では受胎例が得られていないことから、ガラス化保存法が有効と考えられた。ガラス化保存の方法ではVSED区とGESX区に統計的有意差は認められず、いずれの方法も有効と考えられた。

2 試験

凍結保存と性判別の順番の比較では、受胎成績でも判別後ガラス化区で統計的有意差は認められていないが、性

判別胚を広域的に利用する面からは、ガラス化後の性判別では、融解・加温 雌雄判別(バイオブシー) 培養など移植当日に多くの時間を要するため、準備した受胎牛の頭数に対して希望した性の胚数を準備することが困難であること等の問題点があることから性判別した後に凍結保存する方法が現実的と考えられた。

3 試験

ガラス化保存と培養の関係では統計的有意差は無いがやや培養を実施した場合の受胎率が高く、全国の共同試験の結果も同様な結果となっていることから、胚を切り取った後に3時間培養した場合が受胎率が高くなる可能性があると考えられた。

ウシ性判別胚の凍結保存における今後の課題としては、さらに受胎率を向上させる必要が有ると共に、現在の性判別胚の凍結保存では、胚の融解は顕微鏡下での段階希釈が必要であるため庭先での直接移植に対応しにくい問題点が残されている。今後はガラス化保存された胚の農家の庭先での利用性を向上させるため、簡便な融解方法及び移植のシステムを構築するための技術開発が必要であると考えられた。

参 考 文 献

- 1) 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, 日本胚移植学会誌, 12-17(2001)
- 2) Kasai M.,etal: Effects of Various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos, J.Reprod.Fert.63,175-180(1981)
- 3) 新納正之, ウシ胚のガラス化保存法マニュアル, 農林水産省家畜改良センター(1998)
- 4) 井上直弘, ガラス化(VSED)保存法マニュアル, 宮崎県優良家畜受精卵総合センター(1999)
- 5) 大下雄三ら, ウシ性判別におけるバイオブシー前後のガラス化が胚の生存性に及ぼす影響, 鳥取畜試研報, 32, 5-8(2004)