

# ウシの体外受精胚・低品質胚及びバイオブシー胚の 最小容量冷却法による超低温保存

米村 功・大下雄三\*・瀬尾哲則・妻由道明

\* 現 鳥取県中部総合事務所 福祉保険局 健康支援課

## 要 約

ウシ胚において比較的凍結に弱いとされる体外受精胚・低品質な胚及び細胞の一部をバイオブシーされた胚等において、その超低温保存を改善するため、ガラス化保存の発展法である最小容量冷却法（以下 MVC 法と略す）による胚の生存性を検討した。胚の保存器具にはクライオトップを用いた。

### 試験Ⅰ：体外受精胚の MVC 法による保存

ウシ体外受精胚を MVC 法により超低温保存したところ、その結果、MVC 法の耐凍剤に 15%エチレングリコール (EG) 及び 15%ジメチルスルホキシド (DMSO) を混合し耐凍剤濃度を 30%にした場合が胚の培養後の生存率が 83.0% (39/47) であり、EG 単独で耐凍剤濃度を合計で 30%にした場合が 68.4% (13/19) であった。MVC 法の耐凍剤には EG と DMSO を混合した場合が EG 単独の場合より融解後の胚の生存率が高く、体外受精胚に用いる耐凍剤は混合する方が実用的と考えられた。

### 試験Ⅱ：低品質胚の MVC 法による保存

低品質胚の MVC 法による超低温保存後に 75%の生存胚が得られたが、培養において胚細胞が透明体を脱出する能力が不十分であった。そこで透明体脱出の補助として透明体を切開した低品質胚の MVC 法による保存と移植を検討した。その結果、透明体を切開しないで最小容量冷却法により凍結・融解・移植した場合の受胎率は (2/15,13.3%) 低かった。しかし、胚の透明体を予め切開して発育を促進する処理を検討したところ、比較的高い受胎率 (4/9,44.4%) が得られ、ほぼ利用可能な受胎成績に達した。

### 試験Ⅲ：性判別胚などのためバイオブシーされた胚の MVC 法による保存

ウシ性判別胚などの超低温保存の改善のため、MVC 法に用いる耐凍剤について検討した。

耐凍剤種別の移植後の受胎率では混合区が 45.5% (5/11) で EG 単独区が 71.4% (5/7) で、EG 単独区のほうが若干受胎率が高かった。しかし、流産が EG 単独区で 28.6% (2/7) 発生し、分娩率では両区に差は認められなかった。

MVC 法による保存の今後の課題としては、胚の融解が顕微鏡下での段階希釈を必要としているため、農家の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 MVC 法により保存された胚の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。

## 緒 言

卵子・体外受精胚及びバイオプシーされたウシ胚を緩慢冷却法による超低温保存した場合、その生存性が大きく減じることが知られており<sup>1) 2)</sup>、これらの保存法としてガラス化法の有効性が報告されている<sup>3)</sup>。

ガラス化保存法は、超低温保存時に氷晶が形成されないこと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。

近年、急速なガラス化冷却法としてマイクロドロップレット、オープンブルドストロー及びクライオトッブなどの器具等によるガラス化保存が開発され、従来凍結保存が困難であった卵子や性判別ウシ胚などの超低温保存で成果を得ている。さらに最近ゲルローディングチップ及びクライオトッブなどの器具を用いた MVC 法により、およそ-20,000 °C/分と極めて高速な冷却速度を実現した超低温保存法が開発されている<sup>4)</sup>。これら MVC 法の開発により、従来のガラス化保存法よりも低い濃度の耐凍剤濃度での保存が可能となってきた。

また、ウシ胚等の凍結保存に用いる耐凍剤の種類として EG は胚に対する毒性の低さ及び細胞内への浸潤、希釈の早さ等からその有効性が広く知られている<sup>5) 6)</sup>。

そこで体外受精胚の MVC 法による保存に適した耐凍剤を検討するために試験 I では、ウシ体外受精胚を用い、耐凍剤濃度を 15% (V/V)EG 及び 15% (V/V)DMSO を混合し合計で 30%にした場合と EG 単独で耐凍剤濃度を 30 % (V/V)にした場合の超低温保存後の胚の生存率を調査した。

次に、ウシの過剰排卵処理により胚を採取する際に 20 %程度発生する低品質な胚は、新鮮胚で移植すれば、実用的な成績で正常な子牛に発生する。しかし、新鮮卵で移植するためには、あらかじめ受胎牛の発情同期化が必

要であり、また移植実施場所が胚の採取場所等から短時間で輸送出来る範囲に限定され、多くの場合廃棄されていた。これらの問題の解決のため、低品質胚の長期保存の実用化が望まれている。低品質胚を凍結保存出来れば、受胎牛の確保が容易になり、移植胚の数が増加し優良子牛の生産頭数増加が可能になる。そこで試験 II では低品質胚の MVC 法による保存による、受胎性を調査した。

さらに、ウシ性判別胚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胎牛の発情同期化が必要であり、また移植実施場所が限定される。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胚の超低温保存の実用化が望まれている。そこで試験 III では性判別胚などのためバイオプシーされた胚の MVC 法に適した耐凍剤を検討するために、15% (V/V)EG 及び 15% (V/V)DMSO を混合し耐凍剤濃度を合計で 30%にした場合と EG 単独で耐凍剤濃度を 30 % (V/V)にした場合の超低温保存後の胚の生存率を調査した。

## 材料及び方法

### 試験 I : 体外受精胚の MVC 法による保存

#### 1) 供試体外受精ウシ胚

鳥取県食肉センターに出荷された、黒毛和種、交雑種及び乳用種の卵巣を用い、卵巣採取時から 21 ~ 24 時間 15 °C ~ 20 °C、抗生物質 (硫酸カナマイシン 100mg/l) を含む生理食塩水で保存した。体外受精方法は機能性ペプチド研究所製の「エンブリオパック」非共培養完全セットを用いて、裸化受精卵無血清培養法 (低酸素培養 Ver.1.2<sup>7)</sup>) により実施し、体外受精後 7 日 ~ 8 日に生産された胚盤胞を供試した。

#### 2) 超低温保存器具

最小容量冷却法が可能な器具としてクライオトッブ (北里サプライ、静岡市) を用いた。

### 3) 供試溶液

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。基礎保存溶液は、基礎培養液に 0.5M シュークロース (SU) を添加し、耐凍剤を試験区分の濃度に従って調整した。耐凍剤別の試験区分には、kuwayama<sup>8)</sup> の報告している 15% (V/V) EG 及び 15% (V/V) DMSO を混合し耐凍剤濃度を合計で 30% (V/V) にした試験区 (30%CPA 区)、及び基礎保存溶液に耐凍剤として EG を単独で用い、耐凍剤濃度を 30% (V/V) にした試験区 (30%EG 区) で比較した。

### 4) 超低温保存

#### (1) 保存溶液への平衡と凍結

15%の耐凍剤濃度に調整した一次平衡液に 4 分間浸漬する。ついで凍結溶液に移し 30 秒以上～45 秒以内に、極少量 (約 0.4 マイクロリットル) の凍結溶液とともにクライオトップの先端部に滴下し、液体窒素に先端部を投入した。

#### (2) 保存

クライオトップの先端部にキャップを取り付け全体を液体窒素に投入し、液体窒素中で保存した。

#### (3) 胚の融解と培養

クライオトップの先端部を 1 M SU を含む培養液に 1 分浸漬し、ついで 0.5M SU を含む培養液に 3 分間浸漬した後、培養液中で 5%CO<sub>2</sub>、38.5 °C、24 時間～48 時間培養した。

#### (4) 胚の生存性の判定

保存後、融解培養した胚が保存以前の発育段階より進んだ発育段階になった場合に生存と判定した。生存胚は培養を継続し透明体を脱出するか調査した。

### 試験Ⅱ：低品質胚の MVC 法による保存

#### 1) 透明体の切開

顕微鏡下において、バイオカットブレード (フェザー) を用いて透明体の一部を切開した。

#### 2) 胚の移植

胚を融解後に 1 時間～3 時間培養し、自然に発情を発現した、発情後 7 日目の黒毛和種雌牛に定法により移植し受胎率を調査した。

#### 3) 保存

クライオトップの先端部にキャップを取り付け全体を液体窒素に投入し、液体窒素中で保存する。

#### 4) 胚の融解と培養

クライオトップの先端部を 1 M SU を含む培養液に 1 分浸漬し、ついで 0.5M SU を含む培養液に 3 分間浸漬した後、培養液中で 5%CO<sub>2</sub>、38.5 °C、1 時間～3 時間培養する。融解培養した胚が保存以前の発育段階以上になった場合に生存と判定し、移植に供した。

#### 5) 胚の移植

自然に発情を発現した黒毛和種雌牛を用い、発情後 7 日目に定法により移植した。

### 試験Ⅲ：性判別胚などのためバイオプシーされた胚の MVC 法による保存

#### 1) 供試胚

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 20 AU 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 (PGF<sub>2</sub>α) にて発情を誘起し、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。

#### 2) 透明体の切開

顕微鏡下において、バイオカットブレード (フェザー) を用いて胚の一部を切除した。

#### 3) 胚の保存・融解・移植

試験Ⅰと同様に実施した。

## 結果

### 試験Ⅰ：体外受精胚のMVC法による保存

耐凍剤種類別の保存胚の生存率を表1に示した。耐凍剤別の胚の生存率においては耐凍剤に30% (V/V) CPAを用いた場合が83.0%と、30%EGを用いた場合の68.4%よりも有意差は認められないが、生存率は上まわっていた(表1)。

胚の発育段階別の生存率では拡張期胚盤胞(EXP)が86.5%と胚盤胞の生存率69.0%より有意差は無いが上まわった。これらのことより、耐凍剤の選択には、15% (V/V) EG及び15% (V/V) DMSOを混合し耐凍剤濃度を合計で30% (V/V)にした場合がEG単独で耐凍剤濃度を30% (V/V)にした場合よりも有効と考えた。

表1 耐凍剤種類別の保存胚の生存率

区分	胚の種類	供試胚数	生存胚数	発育無胚数	発育率(%)
30%CPA	EXP	29	25	4	86.2
	BL	18	14	4	77.8
	小計	47	39	8	83.0
30%EG	EXP	8	7	1	87.5
	BL	11	6	5	54.5
	小計	19	13	6	68.4

EXP：拡張期胚盤胞、BL：胚盤胞

### 試験Ⅱ：低品質胚のMVC法による超低温保存

最小容量冷却法により保存融解後に75%の生存胚が得られてた。しかし、胚細胞が透明体(卵の殻に相当)を脱出する能力が不十分であり、移植による受胎が困難であると考えられた(表2)。

表2 透明帯未切開胚の保存融解後の培養での生存性

	供試胚数	生存数(生存率)	脱殻数
非切開	16	12(75%)	3(18.9%)

\*カッコ内は出現率

透明帯を未切開で保存融解後に移植した場合、受胎率は低かった(2/15,13.3%)。しかし、胚の透明体を予め切開して発育を促進する処理を検討したところ、統計的に有意ではないが、受胎成績の向上(4/9,44.4%)が認められた。(表3)

表3 凍結融解胚の移植後の受胎成績

試験区	供試胚数	受胎頭数	(受胎率)
非切開	15	2	(13.3%)
透明体切開	9	4	(44.4%)

\*カッコ内は出現率

### 試験Ⅲ：性別別胚などのためバイオプシーされた胚

耐凍剤種類別の移植後受胎成績を表1に示す。データ数が少ないが、受胎率では混合区が45.5%でEG単独区が71.4%で、EG単独区のほうが若干受胎率が高かった。しかし、流産がEG単独区で28.6%発生し、分娩率では両区に差は認められなかった(表4)。ガラス化保存の発展形であるMVC法ウシ性別別胚でも利用が可能なが示唆された。

表4 耐凍剤種類別の移植後受胎成績

区分	移植頭数	受胎頭数	流産数	分娩頭数
混合区	11	5(45.5)	0(0)	5(45.5)
EG単独区	7	5(71.4)	2(28.6)	3(42.9)
計	18	10(55.5)	2(20.0)	8(44.4)

\*カッコ内は出現率、単位%

## 考察

ウシ胚をクライオトップを用いて最小容量冷却法により保存する方法は、緩慢冷却法と比べて作業時間が短いこと、また高価なプログラムフリーザーが不要なので設備コストが低いなどの利点がある。

クライオトップを用いた、体外受精胚の凍結利用の可

能性においては、胚の生存率が 30%CPA 区で 83.0%と高率に生存胚が得られたことから、実用有望な方法であると考えた。

MVC 法は透明体を予め切開した後に、超低温保存を実施すれば、ウシ低品質胚でも利用が可能なが示唆された。

ウシ性判別胚の超低温保存における今後の課題としては、受胎率を向上させる必要が有ると共に、現在の性判別胚の超低温保存では、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。今後は最小容量冷却法により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。

## 謝 辞

本研究の実施に当たり、株式会社鳥取県食肉センターには卵巣の提供を得た。また鳥取県食肉衛生検査所の方々には卵巣の採取、卵巣の一時処理及び保存等において多大な協力を戴いた、ここに深く感謝する。

## 参 考 文 献

- 1) 福島護之ら、体外受精由来胚盤胞の凍結能についての特性、J. Reprod. Dev.,38,49-54 (1992)
- 2) 福島護之ら、体外受精・体外培養法で作出された牛胚盤胞の凍結融解後の受胎性、繁殖技術会誌、14.1-5 (1992)
- 3) 窪田力ら、牛胚のガラス化凍結法の検討、鹿児島肉改研報、5,15-18 (2000)
- 4) 富永敬一郎ら、ゲル・ローディング・チップを用いたウシ体外受精由来初期胚のガラス化保存 J. Reprod. Dev. 47: 267-273, (2001)

5) Kasai M.,etal: Effects of Various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos. J.Reprod.Fert.63,175-180 (1981)

6) 福島護之ら、凍結保護物質にエチレングリコールを用いたウシ体外受精由来凍結胚のストロー内希釈・移植法の検討、兵庫農技セン報、31,1-6 (1995)

7) (株)機能性ペプチド研究所製「エンブリオパック」裸化受精卵無血清培養法 (低酸素培養) Ver.1.2 (1997)

8) Kuwayama M, Kato O,All-round vitrification method for human oocytes and embryos. J.Assist Reprod.and Genet.17.8.477 (2000)