

# ガラス化保存による牛性判別胚の簡易融解技術の確立（第1報）

永田 麻理子、瀬尾 哲則

## 要 約

ウシ胚において細胞の一部をバイオプシーした胚の凍結保存を改善するため、現場でも融解及び移植が可能なストロー内融解法について検討した。ガラス化液の耐凍剤は4種類を組み合わせで検討した。

### 試験Ⅰ：体外受精胚を用いたガラス化液の検討

ウシ体外受精胚について、4種類のガラス化液の耐凍剤を用いてストロー内でのガラス化保存および融解を行った。ガラス化液の耐凍剤にはエチレングリコール、フィコール、スクロースを含む液（以下 EFS）、グリセリン、フィコール、スクロースを含む液（以下 GFS）、エチレングリコール、グリセリン、フィコール、スクロースを含む液（以下 EGFS）、エチレングリコール、ジメチルスルホキシドを含む液（以下 EGDMSO）を用いた。その結果、融解72時間後の胚の生存率はGFSで75.0%、EFSで36.1%、EGDMSOで20%、EGFSで16.7%であった。ストロー内のガラス化ではGFS及びEFSが適していると考えられた。

### 試験Ⅱ：低品質胚を用いたガラス化液の検討

ウシ体内受精胚のうち低品質胚を、ガラス化液をEFS及びGFSとしてストロー内でのガラス化凍結及び融解を行った。その結果、融解72時間後の胚の生存率はEFSで82.4%、GFSで46.2%であった。ストロー内のガラス化ではEFSが適していると考えられた。

### 試験Ⅲ：性判別胚のためバイオプシーされた胚を用いたガラス化液の検討

体外受精胚及び低品質胚のガラス化で生存率の良好だったEFSを用い、バイオプシーされた胚のガラス化を行った。融解72時間後の生存率は66.7%であり、良好な生存率が確認された。

## 結 言

ウシの雌雄産み分けは農家の経営管理に有用である。雌雄産み分けの方法として、移植する胚の一部をバイオプシーして性別を判定する方法がある。このようなウシ性判別胚の移植における受胎成績は、新鮮胚の移植においては実用的な成績が得られている。しかし、新鮮胚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。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<sup>3) 4)</sup>されている。

ガラス化保存法は、超低温保存時に氷晶が形成されないため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。しかし、ガラス化保存法は高濃度の耐凍剤を

用いるため耐凍剤による細胞毒性が懸念され、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。このようにガラス化保存は融解後に耐凍剤の希釈が必要で直接移植ができないことから、現場での普及が難しいという欠点がある。そこで近年では、ストロー内にガラス化液の層と希釈液の層を作り、融解後に希釈して直接移植出来る方法が報告されている<sup>5)</sup>。

ウシ胚等の凍結保存に用いる耐凍剤の種類としてエチレングリコール（以下 EG）、グリセリン（以下 Gly）、ジメチルスルホキシド（以下 DMSO）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>6)</sup>。

またフィコールはポリエチレングリコール（以下 PEG と略）に比べ毒性や粘性の低い細胞非透過性物質として知られている。このような細胞非透過性物質を高濃度に加え、EG など細胞透過性耐凍剤を低く設定した液では、脱水作用が強いため胞胚腔内への耐凍剤の透過が促進され胚へ毒性が低くなる。さらにスクロースは脱水を促し、細胞内に透過する EG の量を制限することによって毒性の影響を緩和し、同時にエチレングリコールの除去過程の浸透圧的な膨脹も防ぐ。

試験Ⅰではウシ体外受精胚を用い、EFS、GFS、EGFS、EGDMSO をガラス化液の耐凍剤として、ストロー内でのガラス化凍結融解後の胚の生存性を調査した。

試験Ⅱでは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を用い、試験Ⅰで良好な生存率の得られた EFS 及び GFS をガラス化液として、ストロー内でのガラス化凍結融解後の胚の生存性を調査した。

試験Ⅲでは体内胚のうち一部をバイオプシーされた性別判別胚を用い、試験Ⅰ及びⅡで生存率の良好であった EFS をガラス化液の耐凍剤として、ストロー内でのガラス化凍結融解後の胚の生存性を調査した。

## 材料及び方法

### 試験Ⅰ：体外受精胚を用いたガラス化液の検討

#### 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℃～20℃、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) 供試溶液

ガラス化液の耐凍剤は EFS、GFS、EGFS、EGDMSO の 4 種類を用いた。また耐凍剤濃度の低い液を作成し、前処理液とした。希釈液には 0.5M スクロース加 PBS を用いた。胚は 5 % CO<sub>2</sub>、38.5℃条件下、20 % CS 加 TCM199（β-ME 添加）で培養した。

表 1 供試したガラス化液及び前処理液の組成

種別	前処理液	ガラス化液
EFS	20%EG、24%フィコール 0.4Mスクロース 16%ウシ血清アルブミン を含むPBS (+)	40%EG、18%フィコール 0.3Mスクロース、 12%ウシ血清アルブミン を含むPBS (+)
GFS	20%Gly、24%フィコール 0.4Mスクロース 16%ウシ血清アルブミン を含むPBS (+)	40%Gly、18%フィコール 0.3Mスクロース 12%ウシ血清アルブミン を含むPBS (+)
EGFS	10%Gly、10%EG 24%フィコール 0.4Mスクロース 16%ウシ血清アルブミン を含むPBS (+)	20%Gly、20%EG 18%フィコール 0.3Mスクロース 12%ウシ血清アルブミン を含むPBS (+)
EGDMSO	7.5%EG、7.5%DMSO 20%子牛血清 を含むTCM199	15%EG、15%DMSO 20%子牛血清 を含むTCM199

#### 3) 超低温保存

##### (1) 保存溶液への平衡と凍結

20%の耐凍剤濃度に調整した前処理液に 1 分 30 秒浸漬した。ついで凍結溶液に移し 35 秒でストロー内の凍結溶液の層に入れた。ストローは液体窒素蒸気中に暴露し凍結が確認されたら厚さ 5mm の発泡スチロールの板にのせ、3 分間液体窒素蒸気中で保持した。ストローはその後液体窒素に投入した。

##### (2) 保存

ストローの保存は液体窒素中で行った。

### (3) 胚の融解と培養

胚の融解はストローを空中で7秒間保持した後、先端を20℃の水に5秒浸漬した後、全体を水に浸漬し10秒保持し、その後1分30秒ストローを垂直に保持する方法で耐凍剤を希釈した。融解後の胚は培養液中で5% CO<sub>2</sub>、38.5℃条件化で72時間培養した。

### (4) 胚の生存性の判定

ガラス化保存し融解した胚は培養24時間後、48時間後、72時間後に、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：低品質胚を用いたガラス化液の検討

### 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（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日目に胚を回収した。回収されたCランクの胚について、体外で5時間培養後生存が確認されたものを供試した。

### 2) 胚の保存・融解

ガラス化液にはEFSおよびGFSを用い、試験Ⅰと同様に実施した。

## 試験Ⅲ：性判別胚のためバイオプシーされた胚を用いたガラス化液の検討

### 1) 供試胚

試験Ⅱと同様の方法で供胚牛（黒毛和種）から体内受精胚を採取し、回収されたA～Bランクの胚を供試した。

### 2) 胚のバイオプシー

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

ガラス化液にはEFSを用い、試験Ⅰ及びⅡと同様に実施した。

## 結果及び考察

### 試験Ⅰ：体外受精胚を用いたガラス化液の検討

ガラス化液別の胚の生存率を表2に示した。融解72時間後の胚の生存率においては、GFSを用いた場合が75.0%と最も高く、次いでEFSを用いた場合が36.1%と高かった。EGDMSOを用いた場合は20%、EGFSを用いた場合は16.7%であった。

今回用いた耐凍剤の中ではEG、Glyに比べDMSOでは胚の生存率および透明帯脱出率が低くなった。このことから、DMSOは今回用いた液の組成及び保存方法には適さないと考えられた。

体外受精胚ではEFS及びGFSを用いた場合に生存率及び胚盤胞脱出率が高かったため、試験Ⅱにはガラス化液としてEFSおよびGFSを用いた。

表2 体外受精胚を用いたガラス化液別の生存性

区分	供試胚数 (個)	培養時間ごとの生存性			
		24時間後	48時間後	72時間後	
EFS	生存	68	40(58.8)	33(48.5)	28(41.2)
	脱出	68	5(7.4)	17(25.0)	22(32.4)
GFS	生存	8	7(87.5)	6(75.0)	6(75.0)
	脱出	8	0(0.0)	3(37.5)	4(50.0)
EGFS	生存	12	5(41.7)	4(33.3)	2(16.7)
	脱出	12	0(0.0)	1(8.3)	1(8.3)
EGDMSO	生存	10	2(20.0)	2(20.0)	2(20.0)
	脱出	10	0(0.0)	0(0.0)	1(10.0)

数値は胚数、( )は出現率

### 試験Ⅱ：低品質胚を用いたガラス化液の検討

低品質胚を用いたガラス保存法の生存率を表3に示した。融解72時間後の生存率はEFSで82.4%、GFSで46.2%であった。

近年では、緩慢凍結法で胚を凍結する際にも、耐凍剤としてGlyより細胞透過性が高く毒性の低いEGを用いた凍結事例の報告が多い<sup>8)</sup>。今回の試験でもEFSはGFSに比べ生存率及び透明帯脱出率が高かったため、試験Ⅲ

にはガラス化液として EFS を用いた。

表 3 低品質胚を用いたガラス化液別の生存性

区分	供試 胚数 (個)	培養時間ごとの生存性			
		24 時間 後	48 時間 後	72 時間 後	
EFS	生存	29	27 (93.1)	26 (89.7)	24 (82.8)
	脱出	29	0 (0.0)	2 (6.9)	7 (24.1)
GFS	生存	13	8 (61.5)	6 (46.2)	6 (46.2)
	脱出	13	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (15.4)

数値は胚数、( ) は出現率

### 試験Ⅲ：性判別胚のためバイオブシーされた胚を用いたガラス化液の検討

ガラス化液を EFS とした場合の生存率を表 4 に示した。バイオブシーされた性判別胚を用いたガラス化保存法でも、融解 72 時間後の生存率は 66.7 % と良好であった。

表 4 バイオブシー胚を用いたガラス化液別の生存性

区分	供試 胚数 (個)	生存率 (%)			
		24 時間 後	48 時間 後	72 時間 後	
EFS	生存	33	26 (74.1)	23 (70.4)	22 (66.7)

( ) 内は生存率及び透明帯脱出率

今回の試験では、簡易に胚を融解することが出来、バイオブシーされた性判別胚でも EFS をガラス化液として用いたガラス化保存で良好な生存率が得られた。この事から EFS を用いたガラス化法が牛性判別胚の保存に利用可能な事が示唆された。今後の課題としては、EFS を用いたガラス化性判別胚の移植試験を行い、実用的な受胎率が得られるか調査する必要がある。

## 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) 藤田達男ら、牛受精卵の性判別実用化試験、大分畜試成績報告、33, 1-4 (2004)
- 5) Kasai M., et al: 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) 吉羽宣明ら、牛受精卵凍結技術の簡易安定化 エチレングリコールおよびプロピレングリコールを用いて凍結保存した牛受精卵の直接移植、埼玉畜試研報、31, 1-5 (1993)