

ガラス化保存によるウシ性判別胚の簡易融解技術の確立

永田麻理子*・瀬尾哲則

*現鳥取県倉吉家畜保健衛生所

要約

細胞の一部をバイオプシーしたウシ性判別胚において、実用的な受胎率が期待でき、移植時に現場で簡易に融解、移植が可能なストロー内ガラス化保存・融解法について検討した。まず、4種類のガラス化保存液を用いて体外受精由来胚や生体由来低品質胚及び細胞の一部をバイオプシーした性判別胚のストロー内ガラス化保存・融解後の生存性を確認した。その結果、エチレングリコール、フィコール及びスクロースを含む溶液でのガラス化保存後の生存性が良好であった。そこで、この方法を利用してウシ生体由来の性判別胚を、ストロー内ガラス化保存・融解して胚移植を行い、実用的な受胎率（52%、12頭受胎/23頭移植）を得た。（高知県畜産試験場との共同研究）

緒言

ウシの雌雄産み分け技術は、乳牛の後継用雌や肥育素牛生産など、畜産経営に有用であり、畜産現場からも期待されている。ウシの雌雄産み分け技術として、性判別した胚を移植する方法があり、この場合、胚の一部をバイオプシーして性別を判定し、新鮮胚移植で良好な成績が得られている。しかし、新鮮胚移植には受胎牛の同期化や移植現地までの胚の輸送距離が制限される等の課題がある。

一方、バイオプシーした胚は、正常胚で通常行われる緩慢冷却法で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¹⁾²⁾、この課題を克服すべく、生存性を保持するための方法としてガラス化保存法の有効性が報告³⁾⁴⁾されている。その中で、近年、ストロー内にガラス化液の層とその希釈液の層を作り、現場で融解・希釈後、直接移植できる方法が報告されている⁵⁾。

そこで今回、ストロー内ガラス化保存したバイオプシー胚の簡易融解技術の実用化を目指し、複数のガラス化液の有効性について検討した。

材料及び方法

1 体外受精由来胚を用いたガラス化液の検討（試験1）

1) 供試胚

鳥取県食肉センターでと畜された黒毛和種、交雑種及び乳用種ウシの卵巢を、15℃～20℃で抗生物質（硫酸カナマイシン、100mg力価/L）を添加した生理食塩水中で21～24時間保存した後、未成熟卵子を吸引し、体外受精により胚を作成した。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. 1.2⁷⁾により実施し、体外受精後7～8日に生産された胚盤胞を供試した。

2) 供試溶液

ガラス化保存液として、エチレングリコール、フィコール及びスクロースを含む液（以下、EFS）、グリセリン、フィコール及び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、フィコール及びスクロースを含む液（以下、EGFS）、エチレングリコール及びジメチルスルホキシドを含む液（以下、EGDM）を用いた。

それぞれの溶液の平衡化及びガラス化液の組成は表1、表2のとおりであった。

表1 平衡化液の組成

種別	平衡化液
EFS	20% エチレングリコール
	24% フィコール
	0.4M シュークロス
	0.1% ウシ血清アルブミン in D-PBS
GFS	20% グリセリン
	24% フィコール
	0.4M シュークロス
	0.1% ウシ血清アルブミン in D-PBS
EGFS	10% グリセリン
	10% エチレングリコール
	24% フィコール
	0.4M シュークロス
	0.1% ウシ血清アルブミン in D-PBS
EGDM	7.5% エチレングリコール
	7.5% ジメチルスルホキシド
	20% 子ウシ血清 in TCM199

表2 ガラス化保存液の組成

種別	ガラス化保存液
EFS	40% エチレングリコール
	18% フィコール
	0.3M シュークロス
	0.1% ウシ血清アルブミン in D-PBS
GFS	40% グリセリン
	18% フィコール
	0.3M シュークロス
	0.1% ウシ血清アルブミン in D-PBS
EGFS	20% グリセリン
	20% エチレングリコール
	18% フィコール
	0.3M シュークロス
	0.1% ウシ血清アルブミン in D-PBS
EGDM	15% エチレングリコール
	15% ジメチルスルホキシド
	20% 子ウシ血清 in TCM199

3) 胚の保存・融解・培養及び生存性の確認

胚は、まず平衡化を行い、次にガラス化液のドロップに移してからさらにストローに封入するまでの時間をガラス化時間とした。胚の平衡時間は、EFSでは1分30秒、GFSでは4分、EGFSでは2分、EGDMでは4分であり、ガラス化時間は、EFSでは35秒、GFSでは35秒、EGFSでは1分、EGDMでは35秒であった。

ストロー内での希釈液として0.5M シュークロスを用

い、ストローのカラム構成は図1のとおりとした。

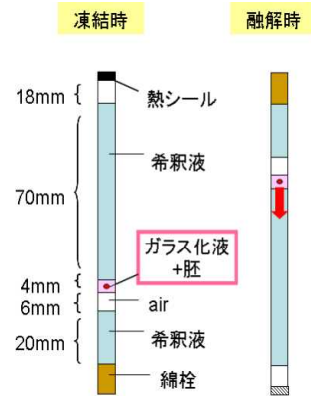


図1 ストローのカラム構成

ストローは先端を封鎖した後、液体窒素ガス中のフロート上で3分保持した後、液体窒素中に投入し、そのまま液体窒素中で保存した。

胚の融解はストローを空中で7秒保持した後、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、20%子ウシ血清加PBSで洗浄後、20%子ウシ血清加TCM199 (β-メルカプトエタノール添加) 中で72時間培養した (5%CO₂, 38.5℃)。ガラス化保存後融解した胚は培養後24時間、48時間、72時間に、胚がより進んだ発育段階になった場合に生存と判定し、また透明体を脱出するか調査した。

2 生体由来低品質胚を用いたガラス化液の検討(試験2)

1) 供試胚

供胚牛は、黒毛和種成雌牛を用い、過剰排卵処理には、FSH20AU (アントリンR・10、川崎三鷹製薬) 及び合成PGF_{2α} 類縁体クロプロステノール0.75mg (エストラメイト、シェリング・プラウアニマルヘルス) を使用し、FSHは3日間の減量投与方法とした。子宮角灌流法により回収した7日目生体由来胚のうち、Cランク以下の胚について、38.5℃、5%CO₂存在下で、5時間培養後、発育が確認されたものを供試胚とした。

2) 胚の保存・融解・培養及び生存性の確認

ガラス化液には試験1の結果から、良好な生存率が期待されたEFS及びGFSを用い、試験1と同様にガラス化保

存・融解後に生存性を確認した。ただし、この場合、GFSでの平衡時間は3分とした。

3 性判別胚を用いたガラス化液の検討 (試験3)

1) 供試胚

試験2と同様の方法で供胚牛から生体由来胚を回収した。回収した胚のうちBランク以上のものを顕微鏡下でマイクロフェザーブレイドK-715 (フェザー安全剃刀) を用いて性判別用試料を採取した。この試料について、Loopamp牛胚性判別試薬キット (栄研化学) 及びLoopampエンドポイント濁度測定装置LA-100 (テラメックス) を用い、LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法により性判別を行った。

性判別用試料を採取後の胚は、38.5℃、5%CO₂存在下で3~5時間の修復培養を行った後、ガラス化保存した。胚の修復時の培養液は、20% (v/v) 子ウシ血清添加TCM 199を使用した。

2) 胚の保存・融解・培養及び生存性の確認

ガラス化液には試験1及び2の結果から良好な生存率が期待できたEFSを用い、試験1及び2と同様にガラス化保存・融解後の生存性を確認した。

4 性判別胚の移植試験

供試した性判別胚は、試験3の1)と同様の方法で作成した。ガラス化液としてEFSを採用し、ストローのカラム構成は図1のとおりとした。

胚の融解方法は図2のとおりとした。

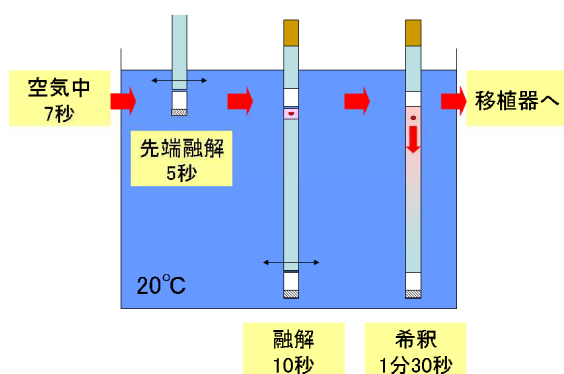


図2 胚のストロー内融解方法

胚移植は、23頭の発情後7日目の卵巢状態が良好な黒毛和種 (経産、未經産) 及びホルスタイン種 (未經産) ウシの黄体存在側の子宮角に1個の胚を注入した。

結果

1 体外受精由来胚を用いたガラス化液の検討 (試験1)

ガラス化液別の胚の生存率を表3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41.2%と高かった。EGDMを用いた場合は20.0%、EGFSを用いた場合は16.7%であった。また、EFS、GFSに比べEGFSやEGDMでは胚の透明帯脱出率が低くなった。このことから、体外受精由来胚 (胚盤胞) のストロー内ガラス化保存溶液としてEFS及びGFSを候補とした。

表3 ガラス化液別の胚の生存率及び脱出率 (試験1)

区分	供試数	出現率 (%)	24時間	48時間	72時間
EFS	68	生存	58.8	48.5	41.2
		脱出	7.4	25.0	32.4
GFS	8	生存	87.5	75.0	75.0
		脱出	0.0	37.5	50.0
EGFS	12	生存	41.7	33.3	16.7
		脱出	0.0	8.3	8.3
EGDM	10	生存	20.0	20.0	20.0
		脱出	0.0	0.0	10.0

2 低品質胚を用いたガラス化液の検討 (試験2)

低品質胚を用いたガラス保存法の生存率を表4に示した。融解72時間後の生存率はEFSで82.8%、GFSで46.2%であり、EFSを生体由来の低品質胚のストロー内ガラス化液の候補とした。

表4 ガラス化液別の胚の生存率及び脱出率 (試験2)

区分	供試数	出現率 (%)	24時間	48時間	72時間
EFS	29	生存	93.1	89.7	82.8
		脱出	0.0	6.9	24.1
GFS	13	生存	61.5	46.2	46.2
		脱出	0.0	0.0	15.4

3 性判別胚を用いたガラス化液の検討 (試験3)

生体由来の性判別胚について、ガラス化液をEFSとした場合の融解後の生存率を表5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5 EFSによる性判別胚のガラス化保存後の生存性

区分	供試数	出現率(%)	24時間	48時間	72時間
EFS	33	生存	74.1	70.4	66.7

4 性判別胚の移植試験成績

23頭のウシに胚移植を行った結果、12頭が受胎し、その受胎率は52%であった。

考察

胚のガラス化保存法は、超低温保存時に氷晶が形成されないため、細胞への物理的障害の発生が低減できるという利点がある。従来、クライオトップ等を利用した最小容量冷却法による胚のガラス化保存の有効性が確認されてきたが、その方法では、高濃度の耐凍剤による細胞毒性、高い浸透圧を持った保存液による急激な浸透圧変化による障害を避けるために融解後に顕微鏡下で耐凍剤の希釈が必要であり、直接移植ができない等の理由から、ウシの胚移植現場での普及が進んでいない。

今回、ガラス化保存したウシ性判別胚の移植技術の普及を図るため、シュークロスとエピクロロヒドリンを共重合した水溶性の合成品であるフィコールを利用したストロー内ガラス化保存・融解方法を検討した。緩慢凍結法で胚を凍結する際にも、耐凍剤として細胞透過性が高く毒性の低いエチレングリコールを用いた凍結事例の報告が多い⁸⁾。今回の試験でもEFSは胚の生存率及び透明帯脱出率が高く、フィコールと組み合わせる耐凍剤としてエチレングリコールを採用した。

今回の試験では、移植現場で簡易に胚を融解することができ、バイオブシーされた生体由来の性判別胚移植でもEFSを用いたガラス化保存で良好な受胎率が得られた。このことからEFSを用いたウシ性判別胚のストロー内凍結保存・融解法は、有効な技術であると思われた。

謝辞

本試験の実施に当たり、高知県畜産試験場には共同研究として多大な御助言をいただき、株式会社鳥取県食肉センターにはウシの卵巣の提供、鳥取県食肉衛生検査所には卵巣の採取、卵巣の一時保存等において多大な御協力をいただきました。ここに関係諸氏に深謝します。

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)