

## 超急速ガラス化保存したウシ体外受精胚の生存性

福原順子・吉川克郎・中本和弘

和歌山県農林水産総合技術センター畜産試験場

The Survival and Development of *In Vitro* Produced Bovine Embryos After Cryopreservation

Junko Fukuhara, Katsuro Kikkawa, Kazuhiro Nakamoto

*Livestock Experiment Station*

*Wakayama Research Center of Agriculture, Forestry and Fisheries*

### 緒 言

ウシの胚移植技術は高能力家畜を効率的に増産し、家畜改良を進める上で非常に有用な技術であり、現在、国内における移植頭数は年間約 58,000 頭となっている。特に種雄牛を持たず、飼養頭数の少ない和歌山県においては胚移植技術の果たす役割は大きい。しかし、和牛産地間競争激化の中、供卵牛となりうる高能力雌牛の導入は困難であり、限られた県内飼養高能力供卵牛からより効率的に胚を生産することが必要である。

超急速ガラス化保存法は高濃度の耐凍剤を用いて細胞内の氷晶形成を抑制する細胞の超低温保存法で、一般に体内受精胚と比べ耐凍能が低いとされる体外受精胚や、一部を物理的に切断した性判別胚等へ応用し、保存後の胚の生存性の向上が多く報告されている(森安ら, 2005) (稲葉ら, 2008)。

本研究では体外受精胚の効率的利用を目的に、融解後の生存性が高いとされる超急速ガラス化法を用いてウシ体外受精胚の生存性の調査と生体卵子吸引-体外受精(OPU-IVF)胚を用いて保存後の受胎能の確認を実施した。

### 材料および方法

#### 1. 供試胚

培養試験には食肉処理場で採取したウシ卵巣より作出した体外受精胚を用いた。採取したウシ卵巣を 20°C 生理食塩水中に 24 時間保存後、注射器により卵胞を吸引し、未成熟卵子を回収した。回収した未成熟卵子は 5% 子牛血清、抗生物質(ペニシリン、ストレプトマイシン)を添加した TCM-199 を成熟培地とし、38.5°C、5%CO<sub>2</sub>、95% air の条件で 22~24 時間成熟培養した。成熟培養後、媒精液(IVF100;機能性ペプチド研究所)を用いて、添付説明書に沿って体外受精を行った。媒精後、ピペッティングにより卵丘細胞を剥離し、

0.25mg/ml リノール酸アルブミン, 5%牛胎子血清, 抗生物質添加 CRIaa または裸化受精卵培養液 (IVD101; 機能性ペプチド研究所) を培地とし, 38.5°C, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% air の条件で発生培養を行った。発生培養7~8日目に認められた胚盤胞期以降の A および B ランクの胚を供試した。

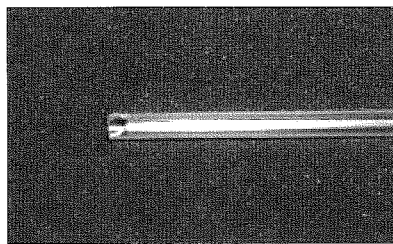
移植試験には当場で飼養している供卵牛より OPU を実施して得られた未成熟卵子を用い, 培養試験と同じ条件で成熟培養, 体外受精および発生培養を実施して作出した体外受精胚を用いた。

## 2. 緩慢凍結

緩慢凍結は当場において通常行っている方法で行った。すなわち, 20%子牛血清, 4%ウシ血清アルブミン, 抗生物質を添加したダルベッコ PBS を基本液とし, 1.5M エチレングリコール, 0.1M シュクロースを添加したものを凍結媒液とした。平衡時間は 15 分とし, プログラムフリーザーを用いて -0.3°C/分の速度で -30°C まで冷却し, 液体窒素中に保存した。

## 3. 超急速ガラス化

超急速ガラス化は2種類の手法を用いて行った。1つは笠井らの方法(笠井ら, 2001)に改良を加えた手法で, 0.25ml のストローの先端約 2mm をカットし, スプーン状に加工したものを(以下, S 法) (第1図), もう一つは直接移植を想定した笠井らの方法(以下, F 法) (笠井ら, 2006)を用いた。



第1図 加工した 0.25mm ストローの先端部

ガラス化液の組成は 20%グリセロール, 20%エチレングリコール, 0.3M スクロース, 0.3M キシロース, 3%ポリエチレングリコール, 抗生物質を添加したダルベッコ PBS とし, ガラス化液への浸漬時間は 30 秒とした。また, 1 平衡液として 10%グリセロール, 0.1M シュクロース, 0.1M キシロース, 1%ポリエチレングリコール, 抗生物質を添加したダルベッコ PBS, 第2平衡液として 10%グリセロール, 10%エチレングリコール, 0.2M スクロース, 0.2M キシロース, 2%ポリエチレングリコール, 抗生物質を添加したダルベッコ PBS を用い, 平衡時間はそれぞれ 5 分とした。

希釈液は 0.5M シュクロース, 20%子牛血清, 抗生物質を添加したダルベッコ PBS とした。S 法においては顕微鏡下で胚がシャーレ内へ落ちることを確認しながら, シャーレ中の希釈液にストローの先端部を浸漬した。希釈液中に 5 分間室温で静置後, 38.5°C の 20%子牛血清, 抗生物質を添加したダルベッコ PBS 中 5 分間静置し, 洗浄した後, 培養液に移した。F 法においては既報(笠井ら, 2006)のとおりストロー内で希釈し, S 法と同様に洗浄し, 培養液に移した。

## 4. 融解後生存性調査

加温融解後の胚は 0.1mM  $\beta$ メルカプトエタノール, 20%子牛血清, 抗生物質を添加した TCM199 を培地として 38.5°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% air の条件で 72 時間培養を行った。24, 48, 72 時間後の生存率と透明帯脱出率を調査した。

## 5. 移植

加温・融解後の OPU-IVF 胚を当場飼養交雑種未経産受卵牛(のべ 12 頭)の子宮内に移植した。受胎牛は

あらかじめホルモン剤により発情同期化し、発情から7～8日目に直腸検査を実施し、移植可能な黄体が存在する個体に実施した。

S 法により保存した胚は、培養試験と同様に加温希釈し、移植液で胚を洗浄した後、ストローに吸引し、移植した。F 法により保存した胚は野外でストロー内希釈した後、胚を洗浄することなく直接移植を行った。

受胎の確認は胎齢 40～50 日で超音波診断装置により実施した。

## 6. 統計処理

培養試験で得られたデータは Stat View5.0(SAS Institute inc. 1992)を用いて、Fisher の PLSD テストを実施した。

# 結 果

## 1. 培養試験成績

加温・融解後の生存率および透明帯脱出率を第1表および第2表に示した。培養 24, 48, 72 時間における超急速ガラス化S法およびF法における生存率は、有意差は認められなかったものの、緩慢凍結法よりも高い傾向にあった。透明帯脱出率は培養 24, 48 時間においては顕著な差は認められなかったが、培養 72 時間においては超急速ガラス化S法およびF法で  $57.7 \pm 10.6(\%)$  および  $57.1 \pm 6.6(\%)$  となり、緩慢凍結法の透明帯脱出率  $26.2 \pm 10.2(\%)$  に対して有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ )。

## 2. 移植成績

OPU-IVF 胚の移植成績を第3表に示した。緩慢凍結法における移植成績は受胎 1 頭 / 移植 3 頭、超急速ガラス化S法における移植成績は受胎 2 頭 / 移植 5 頭、超急速ガラス化F法における移植成績は受胎 2 頭 / 移植 4 頭であった。緩慢凍結法で保存した胚を受胎していた 1 頭は移植後約 120 日の直腸検査で流産していることが確認された。超急速ガラス化S法およびF法においてはそれぞれ 2 頭および 1 頭の産子が得られた。得られた産子の生時体重はそれぞれ 24, 32 および 34kg であった。

第1表 加温・融解後の生存率

保 存 法	供試 胚数	生存胚数(%) <sup>z</sup>						
		培養時間(h)						
		24		48		72		
緩慢凍結法	25	18	(74.7±12.7)	16	(66.9±6.6)	16	(66.9±6.6)	
超急速ガラス化	S 法	29	25	(84.7±6.1)	25	(84.7±6.1)	24	(78.5±10.8)
	F 法	31	27	(79.8±8.3)	23	(75.6±7.4)	23	(75.6±7.4)

z: 平均±標準誤差

第2表 加温・融解後の透明帯脱出率

保存法	供試 胚数	透明帯脱出胚数(%) <sup>z</sup>						
		培養時間(h)						
		24		48		72		
緩慢凍結法	25	0	(0.0±0.0)	7	(23.7±7.7)	8	(26.2±10.2) <sup>a</sup>	
超急速ガラス化	S法	29	1	(2.8±2.8)	8	(24.0±15.1)	17	(57.7±10.6) <sup>b</sup>
	F法	31	3	(6.4±4.4)	14	(33.1±14.3)	19	(57.1±6.6) <sup>b</sup>

z: 平均±標準誤差

a-b: P&lt;0.05

第3表 移植成績

保存法	移植頭数	受胎頭数	流産頭数	受胎中頭数	産子頭数	生時体重
緩慢凍結法	3	1	1	0	0	
超急速ガラス化	S法	5	2	0	0	24kg、32kg
	F法	4	2	1	1	34kg

## 考 察

超急速ガラス化はガラス化液の容量を最小限にすることで、冷却速度を速め、胚の生存性を向上させる方法で、open pulled straw (OPS) 法(Vajtaら, 1998), マイクロドロップレット法(Papisら, 2000), ゲルローディングチップ法(Tominagaら, 2001)等, 多数の報告がある。

本研究では超急速ガラス化は手技が簡便で扱いやすいと思われる手法(S法)と直接移植を想定した方法(F法)の2種類の手法で試験を行った。S法は笠井らの報告したストローカット法(笠井ら, 2001)を参考に、0.25mlのストローの先端約2mmをカットし、スプーン状に加工したものを用いて行った。図1のように先端を2mm程度斜めにカットすることで、液体窒素中にそのままストローごと保存するための耐久性を確保しつつ、胚をストロー内壁に置く際の操作性も十分であり、操作中の胚の紛失も認められなかった。また、0.25mmストローは大変安価で特別な道具も必要ないため、他の方法より容易に実施可能であると考えられた。

直接移植を想定した超急速ガラス化法はマイクロドロップレット法を応用した方法(本多ら, 2003)や、ナイロン糸に金属管を装着して作成したガラス化用具を利用した方法(笠ら, 2006)などが報告されており、本研究では後者を用いた(F法)。この方法ではガラス化時に胚を乗せるガラス化用具は磁石を用いてストロー外部から操作することが可能であり、加温・融解時に用具をストロー内から取り除くことが出来る。しかしながら、F法においては顕微鏡下で長さ1cm程度の小さなガラス化用具を扱わなければならないが、本研究においてもガラス化操作中および加温・融解時に約5%の割合で胚の紛失が認められ、技術が安定するまでにかかなりの熟練が必要であった。

笠井らはストローカット法によるウシ体外受精胚の超急速ガラス化において90%以上の生存率および培養

72 時間において 77.8%透明帯脱出率が得られ(笠井ら, 2001), 笠井らもナイロン糸を用いた超急速ガラス化において 90%以上の生存率と培養 72 時間において 89%の透明帯脱出率が得られたと報告している(笠井ら, 2006). 本研究の培養試験では, S法およびF法のどちらの手法においても, 緩慢凍結法と比較して高い透明帯脱出率が得られたものの, 既報に比べ, 生存性および透明帯脱出率ともに低い結果となった. 笠井らはストローを切断せずに液体窒素中に投入すると切断した場合よりも冷却速度が遅くなることも報告しており, 今回用いたストローにおいても, 切断部分が小さいため, 冷却速度が遅くなっている可能性も推察された.

移植試験においては緩慢凍結保存胚を直接移植した受胎例1頭で, 流産が認められたが, 原因は不明であった. 超急速ガラス化保存においては, S法で保存した胚は実験室内で加温・融解・洗浄後に移植し, 移植した5頭中2頭の受胎例が得られた. また, F法においても移植した4頭中2頭の受胎例が得られた. 移植頭数が少ないため, 各保存法が受胎率に及ぼす影響は明らかにできなかったものの, 直接移植を想定したF法においても, 現場普及への可能性が期待される結果となった. また, いずれの方法で生まれた産子においても, 産子の体重は黒毛和種の一般的な生時体重と同等であった.

以上の結果から, 超急速ガラス化保存(S法およびF法)はウシ体外受精胚の生存性向上に有用であり, F法については現場普及への可能性が期待される結果となった. 一方, 他の報告に比べ, さらなる生存性向上の余地があること, また, F法においては胚の紛失が認められた等の課題も残った. 今後は, 技術の熟練に加え, 他の超急速ガラス化保存法, 希釈液の組成や希釈時の温度等さらに検討を加えて, 体外受精胚の生産性向上, 効率的利用を目指していきたい.

## 摘 要

ウシ体外受精胚の効率的利用を目的に, 緩慢凍結法, 手技が簡易な超急速ガラス化法(S法), 直接移植を想定した超急速ガラス化法(F法)を用いて, ウシ体外受精胚の保存後の生存性の調査と OPU-IVF 胚を用いた保存後の受胎能の確認を実施した. その結果, 透明帯脱出率は超急速ガラス化S法およびF法において, 緩慢凍結法に対して有意に高くなり(培養 72 時間:57.7% vs 57.1% vs 26.2%), 融解後の生存性が向上することが示唆された. また, S法およびF法で保存した胚を受胎牛に移植したところ, 2 頭/5頭および2頭/4頭の受胎例が得られた.

## 引用文献

- 稲葉ら. 2008. Cryotop を用いてガラス化した牛体外受精胚のストロー内加温・希釈方法の検討 第 23 回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会要旨 62-63
- 笠井裕明ら. 2001. ストローカット法による牛体外受精由来胚のガラス化凍結 家畜人工授精 205 15-21
- 笠 正二郎ら. 2006. ナイロン糸を用いてガラス化したウシ体外受精胚の生存性 第2報 ストロー内ガラス化希釈報の開発 福岡県農総試研究報告 25 99-103
- 森安悟. 2005. 受精卵移植普及定着化事業におけるウシ胚の性別別実施状況 第 12 回日本胚移植研究会大会要旨 P27
- Papis ら. 2000 Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. Theriogenology 54 651-658
- Tominaga K and Hamada Y. 2001 Gel-loading tip as container for vitrification of *in vitro* produced bovine embryos.

J. Reprod. Dev.47:267-273

Vajta 〇. 1998 Open pulled straw (OPS) vitrification : A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos.

Mol.Reprod Dev. 51 53-58