

保存方法がウシ受精卵の融解後の生存性に及ぼす影響

後藤洋人・高田広達・谷口俊仁¹

和歌山県畜産試験場

Effect of the Cryopreservation Method on Survivability of Thawed Bovine Embryo

Hiroto Gotoh, Hirotatsu Takada and Shunji Taniguchi¹

Livestock experiment station of Wakayama prefecture

緒 言

ウシ受精卵(以下 受精卵)を凍結保存する方法であるダイレクト法(Voelkel and Hu, 1992; Dochi et al. , 1995)は, 凍結受精卵融解後に 0.25ml プラスチックストロー(以下 ストロー)外で凍結保護剤を希釈するなどの複雑な作業が必要な従来の方法と異なり, 人工授精と同様の感覚で農家の庭先で凍結受精卵を融解し直接移植できるため, 国内に広く普及している(堂地・今井, 2016). しかし, ダイレクト法で受精卵を凍結保存するには受精卵凍結器(以下 プログラムフリーザー)が必要となるため, 和歌山県のようにプログラムフリーザーを野外で運用できる設備がない地域では農場でダイレクト法による凍結受精卵を作製することが困難である. 現在, 本県では, 農家所有の牛から採卵する場合, 農家に当场まで牛を運搬してもらい場内で採卵・凍結を行っているため, 牛の積み降ろし作業, 運搬, 採卵・凍結中の待機時間(120~180分)などが農家の負担となっている.

また, ガラス化保存(Ishimori et al. , 1993)は高濃度の凍結保護剤を凍結媒液に添加し, 短時間で凍結することで受精卵への障害を抑制する凍結法で, 凍結に液体窒素を用いるためプログラムフリーザーが不要である. しかし, 人工授精やダイレクト法のような庭先融解・直接移植への対応技術が確立されていないことから, 普及性の高いガラス化保存法の開発が望まれている. 一方, プログラムフリーザーが不要という点では, 農場での受精卵凍結に適していると考えられるため, ガラス化保存卵の庭先融解・直接移植でダイレクト法と同程度の受胎率を得ることが可能となれば, 農場で受精卵をガラス化保存することで農家負担軽減に繋がる可能性がある. 農家負担軽減により採卵回数が増えることによって, 受精卵移植実施数の増加につながり, 本県特産品である熊野牛素牛の改良速度向上も期待できる.

そこで, Ishimori らのガラス化保存法(以下 VSED 法)でストロー内でガラス化保存・希釈した受精卵の生存性を, ダイレクト法で保存した受精卵と比較し, 保存方法が受精卵の融解後の生存性に及ぼす影響を検討すると共にストロー内でガラス化保存・希釈した卵を当场牛に移植し受胎性を検討した.

¹現在:和歌山県紀南家畜保健衛生所

材料および方法

試験1 保存方法が受精卵の融解後の生存性に及ぼす影響

1) 供試材料

受精卵は、当场繁養の交雑種雌牛に過剰排卵処置し、人工授精後7日目に回収した後期桑実胚から胚盤胞のA、Bランク卵を用いた。

2) 過剰排卵処置

過剰排卵は任意の性周期の供試牛に対し臍内留置型黄体ホルモン製剤（家畜改良事業団）を臍内挿入し、挿入後3から5日後の朝に酢酸フェルチレリン（インターベツト）を25 μ g筋肉内投与、その3日後の朝に卵胞刺激ホルモン（共立製薬）20AUを皮下単回投与、その2日後の朝、臍内留置型黄体ホルモン製剤を抜去しクロプロステノール（あすかアニマルヘルス）0.75mgを筋肉内投与、さらに2日後の朝、酢酸フェルチレリン25 μ g筋肉内投与し同日夕方に人工授精した。人工授精後7日目に子宮内灌流法により受精卵を採取後、実体顕微鏡下で形態を観察し、正常卵、変性卵および未受精卵に分類した。正常卵についてはさらに変性部位の割合によりAランク、BランクおよびCランクの3段階に分類した。Aランクは変性部位10%以下、Bランクは変性部位10-30%、Cランクは変性部位30-50%とした。

3) 保存方法

(1) ダイレクト法

受精卵は20%子牛血清を加えた修正ダルベッコリン酸緩衝液（以下 mPBS（小林，2007））に8.3%エチレングリコールと0.1Mスクロースを添加した溶液で15分間平衡し、ストローに充填した。プログラムフリーザー（富士平工業，ET-1N）の-7 $^{\circ}$ C冷却槽にストローを投入し、2分後に植氷し、8分間保持後、-30 $^{\circ}$ Cまで0.3 $^{\circ}$ C/分で冷却して液体窒素中に保存した。

(2) VSED 法

ガラス化保存には0.4%牛血清アルブミン加mPBSを基礎媒液とし25%エチレングリコールと25%ジメチルスルホキシドを添加した溶液〔以下 VSED (Vitrification Solution consist of Ethylene glycol and Dimethyl sulfoxide)〕を用いた。ストロー内の希釈液として5%エチレングリコール、0.15Mスクロース、17.4%牛胎子血清を添加したmPBSを用いた。凍結は引田ら（2009）の方法を参考にした。プラスチックシャーレ上の50%VSED小滴（VSEDを基礎媒液で等量希釈、100 μ l）中で受精卵を室温60秒平衡したのち、100%VSED小滴（100 μ l）中に受精卵を移し平衡液を洗浄後、直ちに次の100%VSED小滴（11 μ l）に移した。あらかじめ希釈液とVSED11 μ lを吸引しておいたストローへ小滴ごと受精卵を吸引し、平衡終了から30秒以内に図1の構成のストローを作成した。ストローは液体窒素蒸気中に2分静置してから液体窒素中へ浸漬し保存した。



図1 VSED 法のストロー構成

4) 融解方法

(1) ダイレクト法

ストローを液体窒素から取り出し、室温空气中で10秒間保持し、35℃の水中で氷晶が消えるまで融解後、内容をシャーレに取り出し洗浄後培養した。

(2) VSED 法

ストローを液体窒素から取り出し、空气中で10秒間保持後、20℃の水中に静置し氷晶が消えるまで融解した。ストローのシール部を持ち、綿栓部を下にしてストローを振って液層を混和し、ふたたび20℃の水中に綿栓部を上にして垂直に5分間静置後、内容をシャーレに取り出し洗浄後培養した。

5) 融解卵の培養

融解した受精卵は100 μ M β -メルカプトエタノールを添加した20%牛胎子血清加TCM-199(GIBCO)を用いて5%CO₂, 95%空気, 38.5℃, 湿度飽和の気相条件で72時間培養を行った。融解後24時間および72時間の受精卵の生存数, 72時間の脱出胚盤胞数を実体顕微鏡下で観察した。

6) 試験区分

凍結保存せず培養した新鮮卵を陽性対照区とし、ダイレクト法およびVSED法の凍結卵を試験区とした。

7) 試験期間

2015年11月から平成2016年7月に試験を行った。

8) 統計処理

受精卵の生存率および脱出胚盤胞率は χ 二乗検定により解析をおこなった。

試験2 VSED法凍結・融解卵の場内移植試験

1) 供試材料

受精卵は畜産試験場繫養の黒毛和種雌牛に過剰排卵処置し、人工授精後7日目に回収した後期桑実胚から胚盤胞のA, Bランク卵を用いた。過剰排卵処置は試験1と同様に行った。凍結保存, 融解は試験1のVSED法と同様に行った。受卵牛として畜産試験場繫養の交雑種雌牛を供試した。妊否は直腸検査法で判定した。

2) 試験期間

2016年11月から2017年1月に試験を行った。

結 果

試験1

新鮮卵(非凍結卵), ダイレクト法凍結卵とVSED法凍結卵の融解後の24時間生存数, 72時間生存数, 72時間脱出胚盤胞数を表1に示した。各試験区の保存前および融解・培養後の胚の形態の推移を図2に示した。24時間生存率は, 新鮮卵100%(12/12), ダイレクト法86%(12/14), VSED法93%(14/15)で, 陽性対照区および両試験区間で差はなかった。72時間生存率は, 新鮮卵100%(12/12), ダイレクト法79%(11/14), VSED法93%(14/15)で, 陽性対照区および両試験区間で差はなかった。72時間脱出胚盤胞率は, 新鮮卵92%(11/12), ダイレクト法50%(7/14), VSED法73%(11/15)で, 陽性対照区に対しダイレクト法が5%水準で有意に胚盤胞脱出率が低く, 陽性対照区とVSED法および両試験区間で差はなかった。

試験 2

VSED 法凍結卵を当场交雑種雌牛へ延べ 6 回移植し、うち 3 回で受胎した。交雑種雌牛のうち、1 頭は分娩前に事故死したが、2 頭は正常に分娩し子牛も正常に発育した(表 2)。

表 1 保存方法が受精卵の生存性などに及ぼす影響

試験区	供試卵数	24 時間生存数 (%)	72 時間生存数 (%)	72 時間脱出数 (%)
新鮮 (非凍結)	12	12 (100)	12 (100)	11 (92) ^a
ダイレクト法	14	12 (86)	11 (79)	7 (50) ^b
VSED 法	15	14 (93)	14 (93)	11 (73) ^{a, b}

^{a, b}: 異符号間に有意差あり ($p < 0.05$)

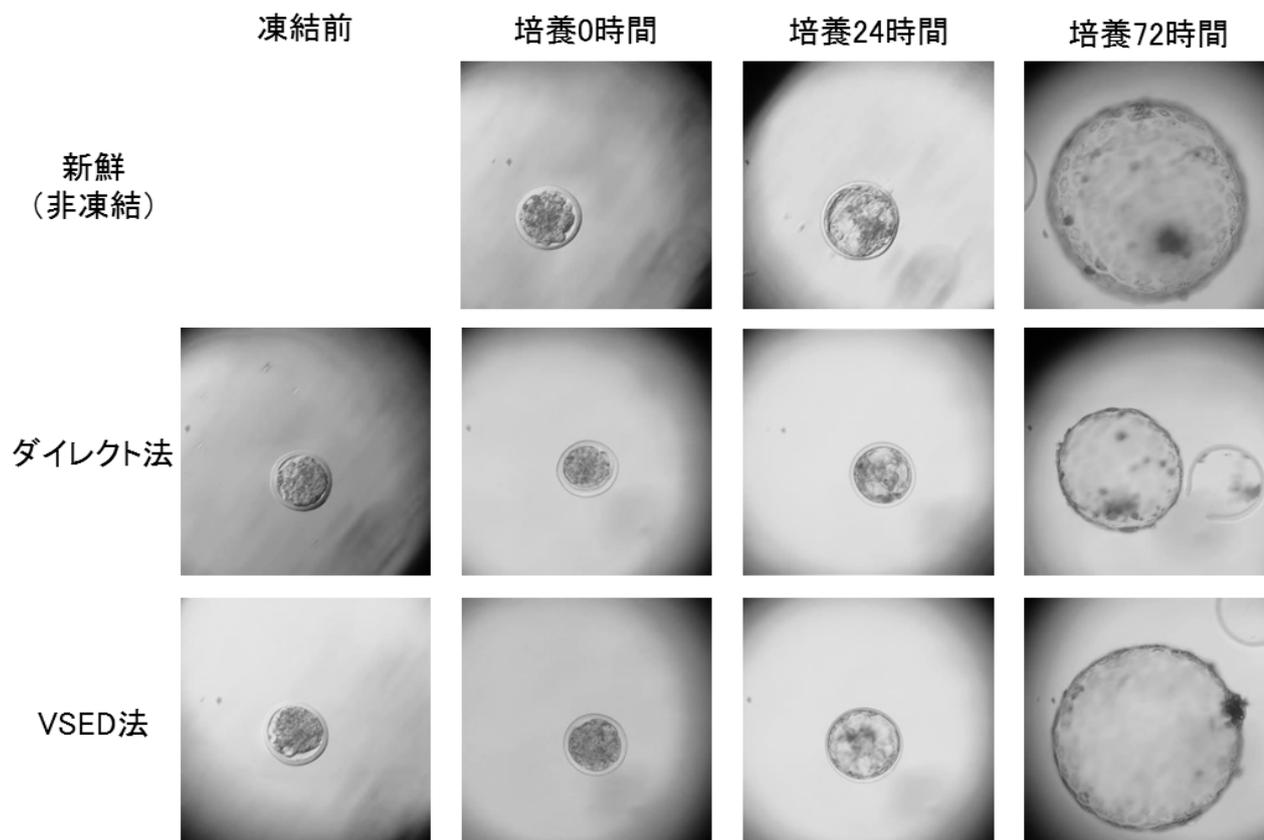


図 2 各試験区の保存前および融解・培養後の胚の形態の推移

表2 VSED 法凍結卵の移植成績

移植 No.	移植年月日	妊否	分娩年月日	産子
1	2016. 11. 10	-		
2	2016. 11. 25	-		
3	2016. 11. 25	+	2017. 8. 31	雄、生時体重 30kg
4	2016. 11. 25	+	(分娩前に事故死)	
5	2016. 12. 28	-		
6	2017. 1. 23	+	2017. 10. 30	雌、生時体重 35kg

考 察

受精卵の凍結保存には、受精卵の脱水と蛋白質の変性抑制のため、受精卵を含む溶液に凍結保護剤が添加される。高張の凍結保護剤を含んだ溶液は、融解時に受精卵へ高浸透圧衝撃を与えるため、かつては融解時に段階希釈による凍結保護剤除去やストローへの再充填など複雑な作業が必要であり、一般普及の障害となっていた(金川ら, 1984)。現在, 国内では, 融解後の凍結保護剤除去の必要がなく, そのまま移植器にセッティングして移植可能なダイレクト法が広く普及しており, 人工授精と同様の感覚で農家の庭先で凍結受精卵を融解し直接移植ができるようになった。しかし, ダイレクト法では, 細胞内の氷晶形成を最小限に抑えるため, 受精卵の凍結にプログラムフリーザーが必要である。高額で大きいプログラムフリーザーを野外で運用するには, 専用車両などさらに高額の設備投資が必要であるため, 現在, 本県では農家の庭先で受精卵を凍結保存することが困難である。

ガラス化保存法の一つである VSED 法は, プログラムフリーザーが不要であること, 凍結に特殊な資材を必要とせず凍結受精卵作製コストが低いこと, 融解から移植までの作業感覚がダイレクト法と近いことなどから, プログラムフリーザーの野外運用が困難で, かつダイレクト法が広く用いられている本県における普及性が高いと考え試験を行った。VSED 法以外にも液体窒素を用いる凍結方法として, GL-Tip 法(Tominaga and Hamada, 2001), オープンプルドストロー法(Vajta ら, 1998), マイクロドロップレット法(Papis ら, 1999), クライオトップ法(Kuwayama ら, 2005)などに代表される超急速ガラス化保存法が存在する。超急速ガラス化法は, 凍結媒液を微量化し凍結時間を短縮することで, 細胞を障害する凍結保護剤の濃度を VSED 法より低くすることが可能だが, 実験室内で顕微鏡を用いての融解およびストロー詰めしたうえで移植に供する手法が一般的であり, 融解後直接受胎牛に移植ができないことが現場普及への弊害となっている。

VSED 法凍結卵は, 培養後 24 時間生存率 93% (14/15), 72 時間生存率 93% (14/15), 72 時間脱出胚盤胞率 73% (11/15)と, ダイレクト法と同等かそれ以上の生存性を示した。また, 場内移植試験で 50% (3/6) の受胎率を示した。現在, 国内の受精卵移植受胎率は, 凍結体内受精卵移植で 45% 程度(大竹, 2018)であり, 野外応用可能な水準の成績であったと言える。他県でも VSED 法で同程度またはそれ以上の受胎率を示したとの報告があり, 高ランク体内受精卵で 86.7% および低ランク体内受精卵で 65.0% (藤井ら, 2009), 性判別受精卵で 40.0% (秋山ら, 2005), 44.0% (小田ら, 2008), 60.0% (小川ら, 2006) などの成績を示しているが, VSED 法の野外応用はいまだ国内普及が進んでいるとは言い難い。VSED 法は平衡終了からストロー充填し凍結するまでの 30 秒間に繊細で素早い作業が要求されるた

め、凍結の失宜で凍結不適卵が発生する可能性があるなど、難度の高い手法であることが一因と考えられる。野外でVSED法で凍結作業することを想定した場合、農家庭先は環境条件が一定でないため、季節・場所や技術者によらず安定して作業可能になるよう準備する必要がある。

また、低ランク受精卵(国際胚移植学会 IETS マニュアルにおけるFairランク)ではダイレクト法よりVSED法の方が受胎率が高い可能性があるとする報告(藤井ら, 2009)もあり、従来のダイレクト法では凍結に適さないとして廃棄されていた低ランク受精卵を、VSED法で有効活用できる可能性もある。

摘 要

ガラス化保存法の一つであるVSED法で凍結したウシ受精卵の融解後に培養した場合の生存性はダイレクト法と同等かそれ以上だった。また、VSED法凍結卵は場内牛への移植試験で50%の受胎率を示した。これにより、プログラムフリーザーなしで県内農家の庭先で凍結受精卵を作製できる可能性が示唆された。

引用文献

- 秋山清. 橋村慎二. 坂上信忠. 中澤慶紀. 岸井誠男. 2005. 牛性判別胚のガラス化保存方法の検討. 神奈川県畜産研究所研究報告. 90 : 11-15
- Dochi, O. K. Imai and H. Takakura. 1995. Birth of calves after direct transfer of thewewd bovine embryos stored frozen in ethyleneglycol. Anim. Reprod. Sci, 38 : 179-185.
- 堂地修. 今井敬. 2016. エチレングリコールを用いた牛胚のダイレクト法の技術開発. 日本胚移植学雑誌. 38 : 23-27
- 藤井陽一. 竹下和久. 引田久美子. 稲吉洋裕. 2009. ガラス化保存したウシ低ランク胚の生存性向上技術の確立. 山口県畜産試験場報告. 24 : 6-10
- 引田久美子. 藤井陽一. 竹下和久. 稲吉洋裕. 2009, ガラス化保存したウシ性判別胚のストロー内希釈法による移植試験. 山口県畜産試験場報告. 24 : 11-14
- Ishimori, H, K. Saeki, M. Inai, Y. Nagao, J. Itasaka, Y. Miki, N. Seike and H. Kainuma. 1993. Vitrification of bovine embryos in a mixture of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. Theriogenology. 40 : 427-433
- 金川弘司. 高橋芳幸. 井上忠恕. 福井豊. 1987. 牛の受精卵(胚)移植. p114
- 小林修司. 2007. ウシ生体卵子吸引・体外受精卵技術マニュアル. pp61-63
- Kuwayama, M. , G. Vajta, O. Kato and SP. Leibo. 2005. Highly efficient vitrification method for cryopresevation of human oocytes. Reproductive BioMedicine Online . 11 : 300-308.
- 小田頼政. 中原仁. 有安則夫. 2008. ウシバイオプシー胚のガラス化保存方法. 岡山県総合畜産センター研究報告. 19 : 20-23
- 小川賀雄. 藤井陽一. 川崎友子. 2006. ガラス化保存したウシ性判別胚の移植試験. 山口県畜産試験場報告. 21 : 9-11
- 大竹匡巳. 2018. 平成29年度受精卵移植関連新技術全国会議要旨. p13
- Papis, K. , M. Shimizu and Y. Izaike. 2000. Factors affecting the survivality of bovine oocytes vitrified in droplets. Theriogenology. 54: 651-8.

- Tominaga, K. and Y. Hamada. 2001. Gel-Loading Tip As Container for Vitrification of In Vitro-Produced Bovine Embryos. *J. Reprod. Dev.* 47: 267-273.
- Vajta, G. , P. Holm, M. Kuwayama, P.J. Booth, H. Jacobsen, T. Greve and H. Callesen. 1998. Open Pulled Straw(OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev.* 51: 53-8.
- Voelkel, S. A. , and Y. X. Hu. 1992. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology.* 37 : 23-37

