

バイオプシーしたウシ胚の保存方法に関する試験

生物工学部

佐田竜一・飛田府宣・佐藤克彦・雫田容子・岸善明*

* 現 県央家畜保健衛生所

要 約

性判別を行うためにバイオプシーしたウシ胚をガラス化保存法または超急速ガラス化保存法で保存し、加温・希釈後の生存性および移植後の受胎性を検討した。また、ガラス化保存法の加温・希釈操作を簡易化したストロー内希釈法によりウシバイオプシー胚を保存し、加温・希釈後の生存性および移植後の受胎性を検討した。

- 1) ガラス化保存または超急速ガラス化保存したバイオプシー胚の生存率は、ガラス化区 100% (4/4)、超急速ガラス化区 100% (11/11)であった。
- 2) ガラス化保存または超急速ガラス化保存したバイオプシー胚の受胎率は、ガラス化区 25.0% (1/4)、超急速ガラス化区 54.5% (6/11)であった。
- 3) ガラス化保存したバイオプシー胚の生存率は、段階希釈区 100% (11/11)、ストロー内希釈区 83.3% (5/6)であった。
- 4) ガラス化保存したバイオプシー胚の受胎率は、段階希釈区 27.3% (3/11)、ストロー内希釈区 33.3% (1/3)であった。

目 的

家畜において必要な性別の産子を計画的に生産することができれば、家畜の改良増殖の効率化と経営の安定化に対する効果は極めて大きい。

近年、胚の一部を顕微操作によって切除し(バイオプシー)、Polymerase Chain Reaction (PCR)法や Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)法によって高い精度で雌雄を判定する技術が確立されている¹⁻³⁾。

特に乳用牛では、牛群内の高能力牛から採取した胚を性判別することによって雌仔牛の選択的生産が可能となるため、雌雄産み分け技術の早急な普及が望まれている。

一方、バイオプシーによる物理的ストレ

スを受けた性判別胚は、新鮮胚移植では一定の受胎率が得られているが、通常の緩慢凍結保存法では生存性が低下し、インタクト胚に比べて低い受胎率しか得られていない^{2,4)}。性判別胚の広域的かつ計画的な移植を可能とするには保存技術の確立が必要不可欠である。

現在、バイオプシー胚の保存には、細胞内外の氷晶形成を抑制する効果の高いガラス化保存法が用いられておりその有効性が示されている。しかし、ガラス化保存法は、高い濃度の耐凍剤を用いるために保存操作や加温・希釈操作が煩雑であり、速やかに生産現場へ技術を普及させることは難しい。雌雄産み分け技術を生産現場へ普及する上で、簡易な操作で保存や加温・希釈が可能

なガラス化保存法を確立する必要がある。

そこで本試験では、バイオブシー胚をガラス化保存法または超急速ガラス化法で保存し、加温・希釈後の生存性および移植後の受胎性を検討した。

材料および方法

1. 供試胚

当場で繫養するホルスタイン種供胚牛に過剰排卵処理および人工受精を施して、発情後 7.5 日目に子宮灌流により胚を回収した。回収した胚のうち、発育ステージが後期桑実胚から拡張胚盤胞で、国際胚移植学会マニュアル⁵⁾における品質コード 1 および 2 の胚について、金属刃 (BIO-CUT BLADES, FEATHER) を装着したマニピュレーターにより胚の 10~30% をバイオブシーしたものを供試胚とした。なお、発育ステージが初期胚盤胞以降の胚については内部細胞塊を避け、栄養膜細胞の一部をバイオブシーした。

2. 供試胚の培養

供試胚は、100 μ M β -メルカプトエタノール (β -ME) を添加した 20%ウシ胎子血清 (FBS) 加 TCM199 を用いて 5%CO₂, 38.5 の気層条件で 3~5 時間修復培養を行った。

3. 供試胚の保存法および加温・希釈法

試験 1

(1) VSED 法

石森らの方法⁶⁾の変法によりガラス化保存を行った。即ち、25%エチレングリコール (EG) および 25%ジメチルスルホキシド (DMSO) を添加した修正リン酸緩衝液

(m-PBS) をガラス化液 (VSED) とした。

供試胚を 50%VSED に 1 分間平衡後、VSED に移して 30 秒以内にストローに吸引し、液体窒素蒸気中に 2 分間静置し、その後液体窒素中に保存した。ストロー内希釈液として 6%グリセリン (Gly) および 0.3M スクロースを添加した m-PBS を用いた。

加温・希釈操作は、ストローを液体窒素から取り出して空気中で 6 秒間保持し、20 の水中で加温した。希釈液部の融解を確認後、ストロー内液を振り混ぜてからシャーレに取り出して 4 分間室温で保持し、その後 4%Gly および 0.3M スクロースを添加した m-PBS、2%Gly および 0.3M スクロースを添加した m-PBS、0.3M スクロースを添加した m-PBS に各 2 分間平衡して耐凍剤の希釈を行った。

(2) 超急速ガラス化法

Vajta らの方法⁷⁾の変法により超急速ガラス化保存を行った。即ち、20%EG、20%DMSO および 0.6M スクロースを添加した 20%子牛血清 (CS) 加 TCM199 をガラス化液とした。供試胚を 10%EG および 10%DMSO を添加した 20% CS 加 TCM199 培地に 90 秒間平衡後、ガラス化液に移してオープンプルドストロー (OPS) またはゲルローディングチップ (GL-Tip)⁸⁾ に吸引し、30 秒後に液体窒素に直接投入して保存した。

加温・希釈操作は、OPS または GL-Tip を液体窒素から取り出して直ちに 0.25M スクロースを添加した 20%CS 加 TCM199 に先端を浸漬して胚を取り出して 1 分間平衡し、0.17M スクロースを添加した 20%CS 加 TCM199 培地に 5 分間平衡して耐凍剤の

希釈を行った。

試験 2

(1) 段階希釈法

試験1のVSED法によりバイオプシー胚の保存および加温・希釈を行った。

(2) ストロー内希釈法

小田らの方法⁹⁾によりVSEDをガラス化液として、VSED法で用いたストロー内希釈液を5%EGおよび0.15Mスクロースを添加したm-PBS(EGS)に置き換えてVSED法と同様の手法で保存した。

加温・希釈操作は、ストローを液体窒素から取り出して空気中で5秒間保持し、20℃の水中で加温した。

EGS部の融解を確認後、ストロー内液を振り混ぜて再び水中に戻して3分間平衡し、その後100μMβ-MEを添加した20%FBS加TCM199で3分間平衡して耐凍剤の希釈を行った。

4. 保存胚の加温・希釈後の培養

加温・希釈した供試胚は、100μMβ-MEを添加した20%FBS加TCM199を用いて5%CO₂、38.5℃の気層条件で3~5時間培養し生存確認を行った。培養後に胞胚腔を再形成したものを生存と判定した。

5. 胚の移植

生存胚は、100μMβ-MEを添加した2

20%FBS加TCM199でストローに再封入し、受胎牛の黄体側子宮角に1胚ずつ移植した。受胎牛は当场で繋養するホルスタイン種未経産牛および経産牛とし、発情後7~8日目に頸管経由法により移植を行った。

妊娠鑑定は発情日を0として60日前後に直腸検査法で行った。

結 果

試験 1

バイオプシー胚をガラス化保存または超急速ガラス化保存法で保存し、加温・希釈後の生存率を表1に示した。生存率はガラス化区100%(4/4)、超急速ガラス化区100%(11/11)であった。

また、各試験区の生存胚を移植した受胎率を表2に示した。受胎率はガラス化区25.0%(1/4)、超急速ガラス化区54.5%(6/11)であり超急速ガラス化区がガラス化区に比べて高い傾向がみられた。

試験 2

バイオプシー胚を段階希釈法またはストロー内希釈法でガラス化保存し、加温・希釈後の生存率を表3に示した。生存率は段階希釈区100%(11/11)、ストロー内希釈区83.3%(5/6)であった。

各試験区の生存胚を移植した受胎率を表4に示した。受胎率は段階希釈区27.3%(3/11)、ストロー内希釈区33.3%(1/3)であった。

表1 ガラス化保存または超急速ガラス化保存したバイオブシー胚の生存率

| 試験区 | 供試胚数 | 生存胚数 | 生存率 |
|---------|------|------|------|
| ガラス化 | 4 | 4 | 100% |
| 超急速ガラス化 | 11 | 11 | 100% |

表2 ガラス化保存または超急速ガラス化保存したバイオブシー胚の受胎率

| 試験区 | 移植頭数 | 受胎頭数 | 受胎率 |
|---------|------|------|-------|
| ガラス化 | 4 | 1 | 25.0% |
| 超急速ガラス化 | 11 | 6 | 54.5% |

表3 ガラス化保存したバイオブシー胚の生存率

| 試験区 | 供試胚数 | 生存胚数 | 生存率 |
|---------|------|------|-------|
| 段階希釈 | 11 | 11 | 100% |
| ストロー内希釈 | 6 | 5 | 83.3% |

表4 ガラス化保存したバイオブシー胚の受胎率

| 試験区 | 移植頭数 | 受胎頭数 | 受胎率 |
|---------|------|------|-------|
| 段階希釈 | 11 | 3 | 27.3% |
| ストロー内希釈 | 3 | 1 | 33.3% |

考 察

本試験では、性別のために胚の一部をバイオブシーした胚をガラス化保存法または超急速ガラス化保存法で保存し、加温・希釈後の胚の生存性および生存胚の受胎性について検討した。ガラス化保存法で100%の生存率が得られたことから有効性が示された。

しかし、VSED法によるガラス化・加温後のバイオブシー胚を発情7日後の受胎牛に1胚移植した受胎率（試験1：25.0%、試験2：27.3%）は、小田ら⁹⁾の成績（52.3%）に比べて低く、飛田ら⁴⁾の報告したエチレングリコールを用いたダイレクト法で凍結保存した性別胚の受胎率（25.0%）と同等の受胎率であった。加温・希釈後の生存率は100%であったが、受胎率が低かったことから、受胎牛の選定や手技の向上等により受胎率の向上を図る必要があると考えられた。

また、本試験ではガラス化保存法に比べて、冷却速度を向上させ、耐凍剤の濃度を下げることによって細胞への毒性を軽減した超急速ガラス化保存法のバイオブシー胚への有効性を検討した。超急速ガラス化保存法もガラス化保存法と同様に加温・希釈後の胚の生存率は100%を示した。また、生存胚を発情後7日後の受胎牛に1胚移植したところ54.5%の受胎率が得られた。これらの結果から、超急速ガラス化保存法がウシバイオブシー胚の保存に有効であることが示された。

ガラス化保存法および超急速ガラス化保存法は、ダイレクト法に比べて高濃度の耐凍剤を用いるために保存操作および加温・希釈操作が煩雑であり、顕微鏡下で胚の正確なピペッティング操作等の技術が要求される。また、ガラス化保存法または超急速ガラス化保存法で保存した胚を移植する際にも顕微鏡下での操作が必要であり、ダイレクト法のように速やかに生産現場へ普及するのは難しいと思われる。このことから本試験では、ガラス化保存法を改良し、加温後にストロー内で耐凍剤を希釈できる手法についてもその有効性を検討した。バイオプシー胚をストロー内希釈法で保存し、加温・希釈後に顕微鏡下で胚をストローから取り出して培養して生存性を検討したところ、83.3%の生存率が得られた。ガラス化保存法および超急速ガラス化保存法と比較するとやや低い傾向が見られたが同等の生存率が得られた。また、5個の生存胚のうち3個を受胎牛に移植し、受胎例を得ることができた。胚が加温・希釈後に死滅した原因については、バイオプシー前後の品質や耐凍剤の細胞毒性等複数の要因が考えられる。

本試験では、加温・希釈後のバイオプシー胚の生存性を検討するためにストロー内希釈法についても顕微鏡下での加温・希釈操作を行った。その結果、高い生存性が示されたことから、今後は野外で加温・希釈操作を行い受胎牛への移植試験を実施する予定である。

本試験の結果、ガラス化保存法および超急速ガラス化保存法は、性判別のためにバイオプシーした胚の保存に有効であることが示された。しかし、受胎率については超急速ガラス化法で高い受胎率が得られたが、ガラス化保存法ではダイレクト法と同等の受胎率であった。手技の向上、胚の品質および受胎牛の選定等により受胎率の向上に努める必要がある。

バイオプシーを伴う性判別胚の移植を生産現場へ普及させるためには、移植前の操作が簡易な保存技術が求められる。本試験で実施したガラス化保存法のストロー内希釈は、移植前に顕微鏡下の操作を必要としない手法であり、バイオプシー胚の保存に有効であった。今後はストロー内希釈法の例数を重ねることで技術の安定化を図ると共に、より毒性の低い耐凍剤をガラス化液に使用した保存方法の検討や、受胎率向上につながる新技術の導入についても検討を行う必要があると考える。

参考文献

- 1) 吉羽宣明ら (1996)、日本胚移植学雑誌、18: 139-145
- 2) D. Bousquet et al. (1999), Theriogenology 51: 59-70
- 3) B. F. Shea (1999), Theriogenology 51: 841-854
- 4) 飛田ら (2000)、栃木酪試研報、124: 3-6
- 5) 胚の衛生的取り扱いマニュアル (国際胚移植学会 IETS マニュアル) 第3版、畜産技術協会: 164-167
- 6) H. Ishimori et al. (1993), Theriogenology 40: 427-433
- 7) G. Vajta et al. (1998), Mol Reprod Dev 51: 53-58

8) 濱田由佳子、富永敬一郎 (2001) 家畜人工授精、205: 8-14

9) 小田頼政ら (2005)、日本胚移植学雑誌、27: 65-71

Vitrification methods of bovine embryos that have been biopsied for sexing

We investigated the influence of different vitrification methods, VSED and ultra-rapid vitrification with OPS, and warming of bovine embryos that had biopsied for sexing with PCR on the survival and pregnancy rates following embryo transfer. We also examined the influence of different dilution methods, step-wised and in-straw dilution for VSED, of the vitrified embryos on the survival and pregnancy rates.

As the results,

- 1) Survival rate of vitrified embryos by VSED and OPS method following warmed were 100% (4/4) and 100% (11/11), respectively.
- 2) Pregnancy rate of vitrified embryos by VSED and OPS method were 25.0% (1/4) and 54.5% (6/11), respectively.
- 3) Survival rate of vitrified embryos following warmed by step-wised dilution and in-straw dilution were 100% (11/11) and 83.3% (5/6), respectively.
- 4) Pregnancy rate of vitrified embryos following warmed by step-wised and in-straw dilution were 27.3% (3/11) and 33.3% (1/3), respectively.