

ガラス化保存胚の直接移植法の検討

坂部吉彦・黒岩力也・羽柴一久^{※1}

Investigation of direct transfer method of vitrified embryos

Yoshihiko SAKABE, Rikiya KUROIWA and Kazuhisa HASHIBA

要 約

ウシのバイオプシー胚の保存には、超急速ガラス化法で保存し融解移植する方法により高い受胎率が得られている。その一方で、融解は一般に実験室内で行われ、受胎牛の近くで融解し直接移植を行ういわゆる庭先融解は困難であるとされてきた。既存の器具での直接移植の手法が開発されたものの作業の煩雑さなどから未だ普及には至っていない。近年、ガラス化胚簡易取扱セット「ビトラン-7」が開発、市販されたため、その有用性について検討した。

- 1 ビトラン-7でガラス化保存した体内胚を、実験室内で融解、培養 48 時間後の生存率は、バイオプシーしていないインタクト胚で 100%、バイオプシー胚で 71.4%であった。
- 2 ビトラン-7でガラス化保存した体内胚を当所繋養牛へ融解後直ちに移植したところ、受胎率は 17.9%であった。

以上のことから、更なる受胎率の向上には融解手技の習熟が必要と考えられ、今後、融解手順を中心に習熟することにより受胎率の向上を図ることができれば、バイオプシー胚の直接移植に有用であると思われる。

キーワード：ウシ、バイオプシー胚、ガラス化保存、直接移植、ビトラン-7

緒 言

近年、ウシ胚の雌雄判別やゲノム育種価予測のために胚を分割し少量の細胞をバイオプシーする手法が行われている^{1)~3)}。本県においても、雌雄判別では乳用種で 1996 年度から実用化し県内農家への譲渡を行っている⁴⁾。バイオプシー胚の保存方法については、緩慢凍結法では高い受胎性が得られなかったが^{5) 6)}、高濃度の耐凍剤を用いたガラス化保存法で受胎率の向上がみられた⁶⁾。当所では各種のガラス化保存法を検証し⁷⁾、受胎率が高いクライオトップ法を採用している。ガラス化保存法は、高い受胎性が得られるものの高濃度の耐凍剤を実験室内等で除去しなければいけないことから、保存胚を持ち運び、農場等での融解移植いわゆる庭先融解が困難な方法であり移植の妨げとなっていた。そこで、クライオトップ法による保存胚を移植用ストロー内で融解することで庭先融解が可能となる方法が開発された^{8)~10)}。しか

しながら、この方法も技術的に熟練が必要であることから県内への普及には至っていない。その後、ガラス化保存胚の直接移植が可能な専用の保存器具が市販され、その直接融解器具のうち広島県が開発しミサワ医科工業株式会社から市販されたガラス化胚簡易取扱セット「ビトラン-7」の有用性について検討した。

材料および方法

- 1 体内胚およびバイオプシー胚の作成
試験に用いた体内胚は、当所繋養のホルスタイン種および黒毛和種雌牛から定法により過剰排卵処理を行い、人工授精から 7 日目に子宮内を灌流し回収した。バイオプシーは、回収した胚のうち発育ステージが収縮桑実胚から拡張胚盤胞で、品質が国際胚移植学会 (IETS) の基準で code 1 あるいは code 2 と判定した胚を、回収後 20%ウシ胎子血清 (FCS) および 100 μ M β -Mercaptoethanol (β

※1 現 岡山県営食肉地方卸売市場

-ME) 添加 TCM199 (medium-199, GIBCO) 液で 38.5°C、5%CO₂、95%空気、飽和水蒸気の下で培養後、胚盤胞から脱出胚盤胞に発育した胚を用いた。

バイオプシーは、倒立顕微鏡((株)ニコン)下でマイクロマニピュレーター((株)ナリシゲ)に装着した金属刃(BIO-CUT BLADE、No.730、フェザー安全剃刀株式会社)で栄養膜部分を切断した。切断後の内細胞塊を含む胚は、20%ウシ胎子血清(FCS)および 100 μM β-ME 添加 TCM199 液で 38.5°C、5%CO₂、95%空気、飽和水蒸気の下で 3 から 5 時間培養した。

2 ガラス化保存方法

ビトラン-7 への胚の封入方法については、器具添付文書および広島県の方法¹¹⁾に基づき行った。

ガラス化溶液は、Kawayama らの報告¹²⁾に基づき、TCM199 液を基礎培地とし、15%Ethylene Glycol (EG)、15%Dimethyl Sulphoxide (DMSO)、0.5M Sucrose (Suc) および 20%FCS を添加して調整した。

供試胚のガラス化処理は、TCM199 液に 7.5%EG、7.5%DMSO、および 20%FCS 添加した液で 3 分間浸漬後、ガラス化溶液に浸漬した。その後ビトラン-7 のスティック先端に少量のガラス化液とともに置き、1 分後に液体窒素へ浸漬しガラス化した。

ビトラン-7 ストロー部には、D-PBS (GIBCO) を基礎培地とし、0.2M Suc、20%子牛血清 (CS) を添加した融解液を充填し凍結した。

ビトラン-7 スティックとストロー部は液体窒素中で接続し、液体窒素保存容器内で保存した。

3 融解方法

融解は、器具添付文書および広島県の方法¹¹⁾を参考に行った。

専用ストローハンガーを用い、38.5°C 温湯にストロー部を浸漬、15 秒後にスティックを刺入、器具全体を温湯中へ入れ 60 秒後に取り出した。

4 試験区の設定

試験 1 直接融解器具保存胚の融解後の生存性の確認

供試胚は、切断していないインタクト胚およびバイオプシー胚を用いた。融解後、移植時間を想定し 38.5°C で 5 分間放置した後、胚をシャーレ内に押し出し、20%FCS および 100 μM β-ME 添加 TCM199 液または 5%FCS 添加 CR1aa (自家調整) で数回洗浄後、同液で 38.5°C、5%CO₂、95%空気、飽和水蒸気の下で培養した。培養開始から 24、48 および 72 時間後に倒立顕微鏡下で生存性を確認した。

試験 2 直接融解器具保存胚の融解後直接移植における受胎性の確認

当所繁殖のホルスタイン種および黒毛和種に、2021 年 8 月から 2022 年 11 月の期間に移植を行った。移植は、融解後直ちに人工授精用ウォーマーバッグ(アニマルジェネティクスジャパン株式会社)で保温した動物用受精卵注入カテーテル モ 4 号(ミサワ医科工業株式会社)へ移し替えた後、黄体側子宮角深部へ注入した。

妊娠診断は、移植後 53 日(胎齢 60 日)以降に直腸検査法および超音波診断装置により受胎の有無を確認した。

受胎性は、2021 年度から 2021 年度の当所の成績と比較しカイ二乗検定を行った。

結果および考察

試験 1 直接融解器具保存胚の融解後の生存性の確認

融解後の生存性について表 1 に示した。黒毛和種のインタクト胚では、融解後 48 時間までで 100%(5/5)、72 時間で 80%(4/5) と高い生存性であった。バイオプシー胚では、融解後 48 時間までで 71.4%、72 時間では 57.1% で生存性の低下がみられた。

例数が少ないため原因の特定は出来ないが、生存性が低かったホルスタイン種供試バイオプシー胚のうち 3 個は同一ロットであり、そのうち 2 個が 48 時間までに死滅していたことから、このロットの耐凍性が低いなどの要因で死滅し生存率を低下させてしまった可能性もあると思われる。しかしながら、黒毛和種のバイオプシー胚では 100% 生存していること、同一組成の融解液によるクライオトップのストロー内融解法では高い生存性が確認されている⁹⁾¹⁰⁾ ことなどから、バイオプシー胚についてもビトラン-7 によって高い生存性が保てるものと思われる。

表 1 融解試験結果

胚の品種	切断 ステージ	ランク (Code)	融解数	生存数(生存率%)		
				24時間後	48時間後	72時間後
黒毛和種	無 BL~ExB	2	5	5(100)	5(100)	4(80)
黒毛和種	有 BL~ExB	2	3	3(100)	3(100)	3(100)
ホルスタイン種	有 ExB	1	4	2(50)	2(50)	1(25)
合計			12	10(83.3)	10(83.3)	8(66.7)
うちバイオプシー胚			7	5(71.4)	5(71.4)	4(57.1)

試験2 直接融解器具保存胚の融解後直接移植における受胎性の確認

ビトラン-7で保存したバイオペシー胚の直接移植成績を表2に示した。移植は、ホルスタイン種および黒毛和種にそれぞれ14頭ずつに行った。当所のクライオトップ法による保存胚の融解後移植成績と比較すると、ホルスタイン種では差が無いものの黒毛和種では14.3%、合計でも17.9%と低い受胎率であったが統計的に有意な差はみられなかった。なお、受胎牛の産歴および融解から移植までの時間と受胎率には一定の傾向はみられなかった。

表2 バイオペシー胚移植試験結果

受胎牛品種	ビトラン-7			クライオトップ		
	移植	受胎	受胎率(%)	移植	受胎	受胎率(%)
ホルスタイン種	14	3	21.4	14	3	21.4
黒毛和種	14	2	14.3	9	4	44.4
合計	28	5	17.9	23	7	30.4

受胎率が低かった明確な原因は不明であるが、広島県での県内技術者へ向けた技術普及で新規技術者では当初受胎率が低迷していたが、融解技術の習熟指導後に向上したとの報告¹³⁾があり、融解手技に問題があると考えられた。

ビトラン-7の融解方法は、比較的簡易で融解培養試験において高い生存性が認められることから、庭先融解移植への利用には有用であると考えられた。しかしながら、移植試験では高い受胎率が得られなかったため、受胎率に影響を与えるポイントについて融解手技を中心に精査し習熟度を高めることで普及につなげていく必要がある。

文 献

- 1) 中原仁(1996)：牛受精卵の性判別技術について，岡山畜産便り，8月号
- 2) 坪野佳奈子(2017)：黒毛和種由来胚盤胞期胚におけるゲノム育種価予測の試み，日本胚移植学雑誌，Vol. 39, No. 2, 81-89.
- 3) Takashi FUJII(2019)：Potential of preimplantation genomic selection for carcass traits in Japanese Black cattle, Journal of Reproduction and Development, Vol. 65, No. 3, 251-258.
- 4) 中原仁(2012)：岡山県におけるETを活用した乳牛改良への取り組み，日本胚移植学雑誌，Vol. 32, No. 1, 41-45.
- 5) 岩尾健(1998)：PCR法により雌雄判別した牛胚の凍結に関する試験，鳥取県畜産試験場研究報告，27, 5-7.
- 6) 有安則夫(2001)：ガラス化保存による性判別受精卵の凍結保存技術，岡山県総合畜産センター研究報告，12, 9-11.
- 7) 小田頼政(2009)：ウシバイオペ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，18, 20-23.
- 8) 中原仁(2014)：クライオトップを用いて超急速ガラス化保存したウシ性判別胚の直接移植の可能性，岡山県農林水産総合センター畜産研究所研究報告，4, 7-12.
- 9) 佐野文彦(2012)：ウシ性判別胚の超急速保存法ークライオトップ法の直接移植へ向けての検討ー，日本胚移植学雑誌，Vol. 32, No. 3, 113-118.
- 10) 中原仁(2016)：ウシバイオペシー胚のガラス化保存とダイレクト移植，日本胚移植学雑誌，Vol. 38, No. 1, 35-42.
- 11) 保本朋宏(2021)：ガラス化保存胚保存器具「ビトラン-7」の開発，畜産技術，3月号，15-21
- 12) Kuwayama. M , Kato. O(1998)：All-round vitrification method for human oocytes and embryos, Journal of Assist Reproduction and Genetics, 17(8), 477.
- 13) 日高健雅(2022)：広島和牛増産のための体外受精胚の生産・供給体制構築およびガラス化胚のダイレクト移植可能な器具開発に関する研究，畜産技術，8月号，64-66.

- 1) 中原仁(1996)：牛受精卵の性判別技術について，岡山畜産便り，8月号
- 2) 坪野佳奈子(2017)：黒毛和種由来胚盤胞期胚におけるゲノム育種価予測の試み，日本胚移植学雑誌，Vol. 39, No. 2, 81-89.
- 3) Takashi FUJII(2019)：Potential of preimplantation genomic selection for