

ウシバイオペシー胚のガラス化保存方法

小田頼政・中原 仁・有安則夫

Various methods for vitrification of biopsied bovine embryos for sex determination

Yorimasa ODA, Hitosi NAKAHARA and Norio ARIYASU

要 約

ウシの性判別技術の実用化を図るため、生存率および受胎率が高い雌雄判別胚のガラス化保存技術を確立する必要がある。そこで、雌雄判別のために部分切除したバイオペシー胚のガラス化保存法である VSED 法と超急速ガラス化保存法である GL-Tip 法およびクライオトップ法での生存率および受胎率を比較検討した。

- 1 ガラス化保存法別の生存率は、VSED 法が 95.4%(104/109)、GL-Tip 法が 85.7%(18/21)、クライオトップ法が 97.7%(86/88)であり、クライオトップ法が他の 2 法に比べ高い生存率が得られ、クライオトップ法と GL-Tip 法に 5%水準で有意差が認められた。
- 2 ガラス化方法別の融解後のランクの低下率は、VSED 法が 3.9%(4/104)、GL-Tip 法が 5.6%(1/18)、クライオトップ法が 4.7%(4/86)であり、生存率に比べ保存方法での差は認められなかった。
- 3 ガラス化保存法別の受胎率は、VSED 法が 44.0%(44/100)、GL-Tip 法が 44.4%(8/18)、クライオトップ法が 46.2%(36/78)であり、有意差はないもののクライオトップ法が若干高い成績であった。

以上のことから、クライオトップ法は VSED 法や GL-Tip 法と比較して、生存率が高いことから、ガラス化保存技術の手技を熟練することにより受胎率の向上が図られると考えられた。

キーワード：ウシ、バイオペシー、雌雄判別胚、ガラス化保存法

緒 言

近年、ウシ胚の雌雄判別技術としてバイオペシーした少量の細胞に含まれる DNA を診断する PCR (Polymerase Chain Reaction) 法^{1) 2)} や LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法³⁾ が開発され、胚から生産される子ウシの性判別技術が体系化できてきた。また、雌雄判別胚の新鮮移植では、当センターにおいて平成 8 年から 19 年度までのホルスタイン種雌胚で 60%以上の受胎率が得られており(未発表)、実用化に近づきつつある。そこで、更なる性判別技術をフィールドで実用化するためには、雌雄判別胚の保存技術の向上が不可欠である。その保存技術については、一般に Intact の体内胚を対象に行われている緩慢凍結法でのバイオペシー胚の保存では実用化レベルの高位安定的な受胎率が得られない^{4) 5)} ことが指摘されている。最近では、部分切除を行った

バイオペシー胚に対しては、高濃度の耐凍剤を利用したガラス化保存法が多く報告されている^{6) 7) 8) 9) 10)}。しかし、ガラス化保存方法には、一般的には保存容器にストローを用いる VSED 法と Gel-loading tip を用いる GL-Tip 法やクライオトップを用いた最小容量法のクライオトップ法などの超急速ガラス化法など種々の技術が報告されており、フィールドで実用化可能な高い生存率及び受胎率が得られるガラス化保存方法の確立が急がれる。そこで、今回、雌雄判別のために部分切除したバイオペシー胚のガラス化保存法である VSED 法と超急速ガラス化法である GL-Tip 法、クライオトップ法での生存率および受胎率について比較検討したので報告する。

なお、今回の報告は、平成 14 ~ 19 年度までの受精卵移植普及定着化事業・雌雄産み分け技術共同試験での成績を取りまとめたものである。

材料及び方法

1 供試バイオブシー胚の作製

当所で飼養する黒毛和種に過剰排卵処理を施し、人工授精後7日目に胚を採取した。DNA サンプル採取のためのバイオブシーには、発育ステージが後期桑実期から拡張胚盤胞期で、品質がA～Bランクと判定した胚を用いた。バイオブシーは、倒立顕微鏡下で金属製の刃（フェザー工業製：BIO-CUT BLADES）を装着したマイクロマニピュレーターで行った。

バイオブシー後の胚は、100 μ M β -Mercaptoethanol、20%ウシ胎子血清(FCS)を添加した TCM-199 液の小滴中で3～5時間培養し、供試胚とした。ただし、培養時の気相条件は、38.5 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 95%空気とした。

2 各ガラス化処理および加温融解

(1) VSED 法

ガラス化溶液は、Ishimori ら¹¹⁾の報告に基づき調整し、融解方法は一部修正した井上らの方法を用いた。方法は、基礎媒液に0.4%ウシ血清アルブミン加修正 Dulbecco's PBS(m-PBS)を用い、25%Ethylene Glycol (EG: 和光純薬) 及び25%Dimethyl Sulphoxide(DMSO: SIGMA)を添加してガラス化溶液(VSED 液)とした。供試胚のガラス化処理は、VSED 液を基礎媒液で等量希釈した平衡液中で室温で1分間経過後に、VSED 液中に投入、30秒以内にガラス化液とともに0.25ml容量のストローに吸引した。ストローは、直ちに液体窒素に浸漬した。なお、ストロー内のカラム構成は、図1のとおりおこなった。

加温融解は、井上⁹⁾の方法に準じてシール部分を上に、綿栓部を下にて液体窒素中から空気中に取り出し、10秒後に、20 $^{\circ}$ Cの水中に投入することで行った。融解後、ストローのシール側をもって振り、VSED 液層と希釈溶液である6%Glycerol + 10%Sucrose(Suc)層を混合後、シャレードにストロー内の全量を押し出し、4分間保持した。耐凍剤の希釈及び除去は、m-PBS + 10%Sucを基礎媒液とした4%、2%及び0%Glycerol 液で各2分間浸漬して行った。

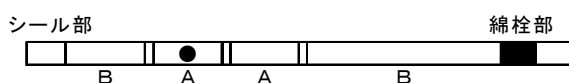


図1 ストロー内の胚および溶液の封入方法

- : 胚
- A: ガラス化溶液(25%Ethylene Glycol + 25%Dimethyl Sulphoxide)
- B: 希釈溶液(6%Glycerol + 10%Sucrose)

(2) GL-Tip 法

ガラス化溶液は、濱田ら¹⁰⁾の報告に基づき調整した。方法は、基礎媒液に20%胎児血清(FCS)加 TCM-199 を用い、20%EG、20%DMSO 及び0.6MSucを添加してガラス化液とした。供試胚のガラス化処理は、基礎媒液で等量希釈した平衡液中で37 $^{\circ}$ Cで90秒間経過後にガラス化液に投入、30秒後にガラス化液とともにGL-Tip(Quality 社)に吸引し、30秒後に液体窒素に浸漬した。なお、GL-Tip は、先端の極細部分を約1/3切断して使用した。加温融解は、37 $^{\circ}$ Cに加温した0.25MSucを含む基礎媒液にGL-Tip の先端を浸漬後、同液中で1分間放置し、次いで0.17MSuc を含む基礎媒液に5分間浸漬後、Suc を含まない基礎媒液に5分間浸漬して行った。



(3) クライオトップ法

ガラス化溶液は、Kuwayama ら¹²⁾の報告に基づき調整した。方法は、基礎媒液に20%胎児血清(FCS)加 TCM-199 を用い、15%EG、15%DMSO 及び0.5MSuc を添加してガラス化液とした。供試胚のガラス化処理は、基礎媒液に7.5%EG、7.5%DMSO を添加した平衡液に3分間浸漬後、ガラス化液に投入し1分間後クライオトップ(北里サプライ社)のシート先端部に最小液量(1 μ l以下)とともに胚を置き、液体窒素に浸漬した。加温融解は、37 $^{\circ}$ Cに加温した0.5MSucを含むTCM-199 またはm-PBSの基礎媒液にシート先端部を浸漬後、軽く揺り動かしシート部分から胚を離脱させ、5分間浸漬して行った。



3 生存性の判定

胚の生存性は、38.5 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 95%空気の気相条件で20%胎児血清(FCS)加 TCM-199 液内または、

クライオトップ法において一部 20%胎児血清 (FCS)加 PBS で30分間～5時間経過後の形態観察(輪郭、変性部位のサイズ)で判定した。生存と判定した胚は、培養液と同様な液に移し、1胚ずつストローに吸引封入後、受胚牛に移植し、胎齢40日経過後に妊娠診断を行った。

4 統計処理

データの統計処理は、 χ^2 検定により行った。

表1 ガラス化保存方法別の融解成績 個, %

区分	融解胚数	生存胚数	死滅胚数	紛失数	生存率
VSED法	109	104	4	1	95.4
GL-Tip法	21	18	2	1	85.7 a
クライオトップ法	88	86	1	1	97.7 b

a - b 間に有意差有り ($p < 0.05$)

表2 ガラス化保存方法別融解後のランクの変化 個, %

区分	生存胚数	維持胚数	低下胚数	低下率
VSED法	104	100	4	3.8
GL-Tip法	18	17	1	5.6
クライオトップ法	86	82	4	4.7

結果及び考察

保存方法別の融解成績を表1に示した。保存方法別の生存率は、VSED法が95.4%(104/109)、GL-Tip法が85.7%(18/21)、クライオトップ法が97.7%(86/88)とクライオトップ法が他の2法に比べ生存率が高い成績であり、特に、GL-Tip法とクライオトップ法に5%水準で有意差が認められた。

木下^{1,3)}は平成15年度の受精卵移植普及定着事業・雌雄産み分け技術の18県で実施した共同試験において、移植供試率は、VSED法が88.8%、GL-Tip法やOPS法の超急速ガラス化保存法が87.3%と報告しており、今回の本報告の成績とほぼ同等であり、超急速ガラス化保存法のクライオトップ法の生存率が高い理由として、超急速ガラス化保存法であるGL-Tip法やOPS法に比べ、耐凍剤濃度が低いガラス化液を用いることと、直接LN2に投入するため冷却速度が早いことにより、科学的毒性及び浸透圧障害が少ないことが考えられた。また、GL-Tip法の生存率が低かった原因は、オートピペットを用いてチップ内に胚を吸引する際、手間取り時間超過することがあり、手技の熟練度が影響したと考えられた。胚の粉失数は、各方法において1胚のみ見られ差がなかった。胚の粉失の原因は、VSED法は不明であるが、クライオトップ法は、シートの先端部に最小液量とともに胚を置き、直接液体窒素に浸漬後、0.25mlプラスチックストロー内に収納して保存する際か、液体窒素内で

保存中にクライオトップのシート部分からプラスチックストローが外れており、シート部分に加わった機械的な衝撃等により、胚が剥がれたことが予想された。また、GL-Tip法は、チップの先端が非常に細く、LN2中でGL-Tipを0.5mlプラスチックストローに差し込み際に折れたものであり、ガラス化作業時、加温時等での取り扱いに注意する必要があると考えられた。

保存方法別の融解後のランクの変化を表2に示した。加温融解後のランクの低下率は、VSED法が3.9%(4/104)、GL-Tip法が5.6%(1/18)、クライオトップ法が4.7%(4/86)であり、生存率に比べ、保存方法での融解後のランク低下率には差がなかった。

表3 ガラス化保存方法別の移植成績 個, %

区分	移植頭数	受胎頭数	受胎率
VSED法	100	44	44.0
GL-Tip法	18	8	44.4
クライオトップ法	78	36	46.2

保存方法別の移植成績を表3に示した。保存方法別の受胎率は、VSED法が44.0%(44/100)、GL-Tip法が44.47%(8/18)、クライオトップ法が46.2%(36/78)であり、有意差はないもののクライオトップ法の受胎率が若干ではあるが、高い成績であった。

木下^{1,3)}は平成15年度の受精卵移植普及定着事業・雌雄産み分け技術の18県で実施した共同試験において、VSED法の受胎率が44.3%と報告して

いる。また、北山ら¹⁴⁾、斎藤ら¹⁵⁾、福見ら¹⁶⁾は、ウシバイオペシー胚を VSED 法でガラス化保存した時の受胎率は、34.8%～43.8%と報告しており、本報告でも、ほぼ同等もしくはやや高い受胎率であった。また、木下¹³⁾は GL-Tip 法や OPS 法の超急速ガラス化保存法の受胎率が、42.9%と報告しており、北山ら¹⁴⁾は GL-Tip 法の受胎率が 32.0%と報告し、本報告でも、ほぼ同等もしくはやや高い受胎率であった。クライオトップ法では、本報告は生存率及び受胎率が他の2法に比べ若干ではあるが高かったものの、斎藤ら¹⁵⁾が報告している受胎率 59.4%に比べやや低い受胎率であった。このことは、クライオトップ法は、シート先端部に 1 μ 以下の最小ガラス化液量とともに胚を置く¹⁵⁾ 必要があり、また、手早い処理が必要とされることから技術の手技に更なる熟練を要すると考えられた。

実用化に向けてのウシ雌雄判別胚の保存方法として、クライオトップ法は VSED 法や GL-Tip 法と比較して融解後の生存率が高いことから、今後、手技の熟練を重ねることにより更なる受胎率の向上が図られると考えられた。

謝 辞

稿を終えるに当たり、本試験の移植試験を実施していただきました家畜保健衛生所の関係各位に深謝致します。

引用文献

- 1) Charies. M. Herr, Neil A. Holt, Klaus I. Matthaei and Ken . C. Reed(1990) : Sex progeny feom bovine embryos sexed with a rapid Y-chromosome-detection assay. Theriogenology, 33, 247.
- 2) 佐伯和弘(2001) : PCR 法による胚の性判別とその実用化. 畜産技術, 11, 5-8.
- 3) 平山博樹(2005) : 新しい遺伝子増幅法(LAMP)の応用と展開. 日本胚移植学雑誌, 27, 21-26.
- 4) 有安則夫・小田頼政・中原 仁・坂部吉彦(2000) : ガラス化保存法による性判別受精卵の

- 凍結保存技術. 岡山総畜セ研報, 11, 1-3.
- 5) 藤田達男(2003) : 牛性判別胚のダイレクト法とガラス化保存法の比較ならびに性判別精度. 畜産技術, 2, 26-29.
- 6) 堂地 修・高倉宏輔・今井 敬(1990) : ガラス化による超低温保存したウシ胚の移植. 家畜繁殖学雑誌, 36, 69-72.
- 7) 小渕祐子・川島敬二・須藤慶子・砂川政広(2001) : フィールド活用した牛ガラス化胚の移植試験. 日本胚移植学雑誌, 28, 32-35.
- 8) 山崎慎一郎・野村康宏・川井昭雄・葛西孫三郎(2000) : EFS40 を用いた牛性判別胚のガラス化保存法の検討. 第7回日本胚移植研究会大会 第11回西日本胚移植研究会大会講演要旨, 41.
- 9) 井上直弘・大山真二・谷之木精悟・佐藤友治(1999) : 牛操作胚のガラス化保存及び希釈方法の検討. 第10回西日本胚移植研究会大会講演要旨, 31.
- 10) 濱田由佳子・富永敬一郎(2001) : ゲル・ローディング・チップを用いたウシ胚のガラス化保存. 家畜人工授精, 205, 8-14.
- 11) Ishimori. H, Y. Miki, M. Kishi, K. Saeki, N. Seike and H. Kainuma(1992) : Vitrification of bovine embryos. Theriogenology, 37, 228.
- 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) 木下政健(2006) : ウシ性判別胚の凍結条件が受胎率と分娩率に及ぼす影響. 12. 7-11.
- 14) 北山智広・吉村義久・林 登・高井尚治(2004) : 牛バイオペシー胚の保存方法と受胎性. 岐阜畜研報, 4, 36-34.
- 15) 斎藤美英・土屋智子・佐野文彦・手塚弘樹・井上 保・三宅晃次(2004) : クライオトップ法を用いたウシバイオペシー胚のガラス化保存. 静岡畜研報, 30, 25-29.
- 16) 福見善之・片山正敏・立川 進(2003) : バイオペシー後の牛胚におけるガラス化保存法の比較. 徳島畜研報, 3, 23-26.