

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

中原 仁・小田頼政・小田 亘*

Possibility of direct transfer for bovine biopsied embryos vitrified with
ultra-rapid cooling and minimum volume technique

Hitoshi NAKAHARA, Yorimasa ODA and Wataru ODA

要 約

クライオトップを用いた超急速ガラス化法で保存したウシ性判別胚を農家の庭先で直接移植する方法を確立するため、希釈液の基礎媒液及び添加する Sucrose (Suc) 濃度、希釈液での保持時間が融解後のバイオプシー胚の生存性および受胎性に及ぼす影響を検討するとともに、農家に庭先での直接移植による受胎性も検討した。

- 1 希釈液の基礎媒液に TCM199 と PBS を用いて希釈融解後の生存率、受胎率を比較したが差はなく、TCM199 の代わりに PBS が利用できることが明らかになった。
- 2 希釈液に添加する Suc 濃度を 0.5M と 0.2M で比較したところ、生存率、受胎率に差がなく、Suc 濃度を 0.2M に下げても問題はなかった。
- 3 0.2M Suc を添加した希釈液で保持できる時間を検討した結果、30 分間保持しても生存性に影響はなかった。
- 4 クライオトップ法で保存したバイオプシー胚をストロー内希釈後農家に庭先で直接移植した結果、融解後生存性を確認して移植を行った場合と同等の受胎率が得られた。

以上のことから、0.2MSuc を含む 20 % CS 加 PBS を希釈液に用いて、クライオトップ法で保存したバイオプシー胚のストロー内希釈法は農家に庭先で直接移植ができる方法として有効と思われる。

キーワード：バイオプシー胚、ガラス化保存、クライオトップ、直接移植

緒 言

ウシの雌雄産み分け技術として胚をバイオプシーし、少量の細胞に含まれる雄特異的 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、実用化している。

しかし、バイオプシーした胚の凍結保存は、Intact の体内胚で実用化されている緩慢凍結法では高位安定的な受胎率が得られない⁴⁾ ことが報告されている。このため、高濃度の耐凍剤を用いて胚を短時間平衡後、液体窒素中で冷却するガラス化保存法が検討され、移植用のストローで保存する VSED 法⁵⁾ や保存容

器にゲル・ローディング・チップ (GL-Tip 法)⁶⁾、クライオトップ⁷⁾ を用いる超急速ガラス化保存法が開発されている。筆者ら⁸⁾ は、これらの方法を用いてバイオプシー胚の保存後の生存性並びに受胎性を検討した結果、クライオトップ法が有効であることを報告している。

ただ、超急速ガラス化法は高濃度の耐凍剤が使われているため実験室内での融解が前提となっており、希釈媒液や Sucrose (Suc) 濃度は希釈融解後の炭酸ガス培養器での修復培養に適したものが用いられている。また、保存容器として移植器に装着可能なストローが用いられおらず、農家の庭先での希釈融解、移植を実用化する上での課題となっている。

そこで、クライオトップ法を用いて保存し

たバイオブシー胚について農家の庭先での直接移植技術の開発を目指し、希釈液の基礎媒液及び添加する Suc 濃度、希釈液での保持時間が融解後のバイオブシー胚の生存性および受胎性に及ぼす影響を検討するとともに、その結果をもとにクライオトップによる農家の庭先での直接移植を試み、受胎性についても併せて検討した。

材料及び方法

1 バイオブシー胚の作製

性判別に用いた胚は、当所繋養牛に過剰排卵処理を行い人工授精後 7 日に回収した。性判別用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、品質は国際胚移植学会 (IETS) の数字コードに準じ、コード 1 から 2 と判定した胚を用いた⁹⁾。バイオブシーは、倒立顕微鏡下でマイクロマニピュレーターに装着した金属製の刃 (BIO-CUT

BLADES、フェザー工業)で行った。バイオブシー後の胚を $100 \mu\text{M}$ β -Mercaptoethanol、20%ウシ胎子血清 (FCS) を添加した TCM199 (medium-199、GIBCO) 液の小滴内で 38.5°C 、5% CO_2 、95%空気の気相条件下で 3 ~ 5 時間培養し、供試胚とした。

2 ガラス化処理方法

ガラス化溶液は、Kuwayama ら⁷⁾の報告に基づき、基礎媒液に 20%ウシ子牛血清 (CS) 加 TCM199 を用い、15% Ethylene Glycol (EG)、15% Dimethyl Sulphoxide (DMSO) 及び 0.5M Suc を添加して調整した。

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胚を 3 分間浸漬後、ガラス化液に移し 1 分後にクライオトップ (Cryotop-ag、北里バイオファルマ) のシート先端部に最小液量とともに置き、液体窒素に直接浸漬した (図 1)。

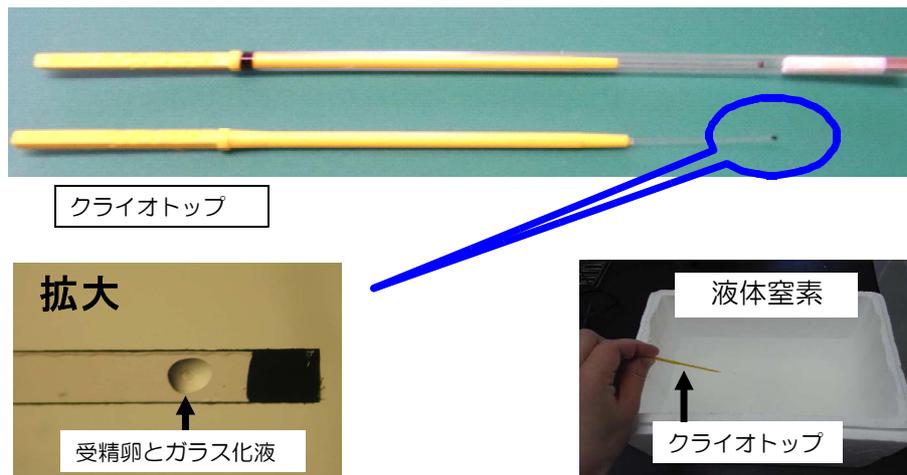


図 1 クライオトップを用いた超急速ガラス化法

3 希釈方法

1) 実験室内希釈法

融解は、 38.0°C に加温した 500ul の希釈液ドロップにシート先端部を浸漬後、軽く揺り動かしてシート部分から胚を離脱させ、5 分間浸漬することにより、実験室内一段階希釈法でガラス化液を除去した (図 2)。なお、希釈液には 0.2M または 0.5M の Suc を添加した 20%CS 加 TCM199 および 20%CS 加 PBS (D-PBS、SIGMA) を用いた。

融解後の培養は、 38.5°C 、5% CO_2 、95%空気の気相条件下で、希釈液と同様の基礎媒液 (20%CS 加 TCM199 または 20%CS 加 PBS) で、

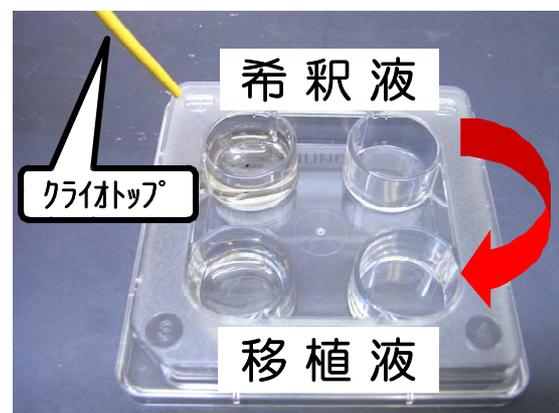


図 2 実験室内希釈法

30分～5時間培養し、形態観察（輪郭、変性部位のサイズ）により生存を判定した。また、生存胚の一部は、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、受胚牛に移植した。

2) ストロー内希釈法

希釈液に 0.2M Suc を添加した 20%CS 加 PBS を用いた。これを充填した 0.25ml ストローを 38℃ に加温し、シート部をストロー内の希釈液層に投入、30 秒間シート部を上下すること

により胚を希釈液層に移行させ、ガラス化液を除去した（図3）。

移植は、ストロー内希釈後実験室内希釈法と同様にストローから胚をいったん取り出し、培養を行い、胚の生存を確認した後に移植する方法（培養後移植）およびシート部投入から2分後にストローから取り出すことなく直接移植器に装着し、直ちに移植する方法（直接移植）で行った。

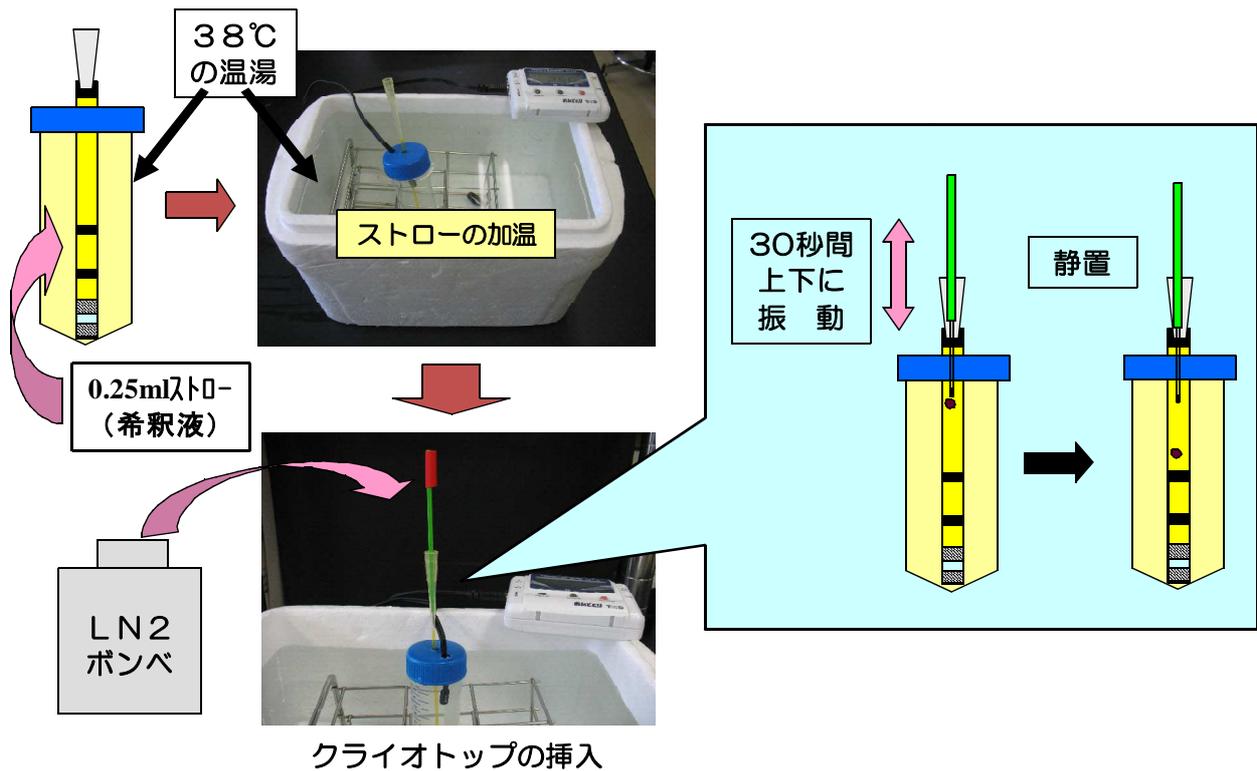


図3 ストロー内希釈法

5 試験区の設定

試験1 希釈液の基礎媒液の検討

クライオトップの融解は、炭酸ガス培養器での融解後の培養を前提としているため炭酸ガス培養に適した TCM199 液が用いられているが、農家の庭先融解では空気中での胚の保持に適している PBS の利用が一般的である。このため、希釈液の基礎媒液の違いが、胚の生存性に及ぼす影響を検討するため、組成の異なる TCM199 と PBS を用い、実験室内希釈後の生存率および移植後の受胎率について検討した。なお、希釈液に添加する Suc 濃度は、ともに 0.5M とした。

試験2 希釈液に添加する Suc 濃度の検討

実験室内希釈では高濃度耐凍剤を急速に除去し、移植液で洗浄培養するため高い浸透圧

の 0.5M Suc が用いられているが、農家での庭先融解を考えた場合、移植終了時点までの間、高浸透圧の希釈液中に留まることとなり胚の生存性に影響することが考えられる。このため、緩慢凍結で用いられている Suc 濃度に近い希釈液で胚の生存性に及ぼす影響を検討するため、0.2M および 0.5M Suc を添加した希釈液で融解し、生存率、移植後の受胎率について検討した。なお、基礎媒液には、20%CS 加 PBS を用い、希釈は実験室内一段階希釈法を用いた。

試験3 希釈液中での保存時間の検討

試験2の結果から低濃度 Suc 溶液でも希釈可能であることがわかったが、直接移植を行う場合、移植終了時までの最大約 30 分間程度希釈液中に胚が保持されることになる。そ

ここで、希釈液中での保時時間が胚の生存性に及ぼす影響を検討するため、5～30分間ストロー内の希釈液(0.2M Sucを含む20%CS加PBS)で保持し、生存率について検討した。なお、希釈はストロー内希釈法を用いた。

試験4 ストロー内希釈による直接移植法の検討

クライオトップ法による保存胚の農家の庭先での直接移植法による受胎性を検討するため、ストロー内希釈法を用いて希釈融解した胚を直接移植する方法(直接移植区)とストロー内希釈後胚を取り出し、生存を確認した後に移植する方法(培養後移植区)を設定し、移植後の受胎率について検討した。

6 統計処理

統計処理はカイ二乗法を用いて行った。

結果及び考察

試験1 希釈液の基礎媒液の検討

融解時の希釈液の基礎媒液の違いと生存性については表1に、受胎性は表2に示した。胚の生存率は、PBS区では96.2%(25/26)、TCM199区では100%(29/29)と両区に差はみられなかった。また、受胎率は、PBS区52.6%(10/19)、TCM199区45.8%(11/24)とPBS区が若干高い傾向にあったが、有意な差はなかった。

表1 希釈液の基礎媒液の違いと生存性

区分	融解胚数	生存胚数	死滅胚数	生存胚率(%)
PBS	26	25	1	96.2
TCM199	29	29	0	100.0

一般に牛胚の培養には炭酸ガス培養器内でpHが安定するTCM199が用いられている。クライオトップによる超急速ガラス化法で保存したバイオブシー胚も希釈後に修復培養を行うため、これまで希釈液の基礎媒液にはTCM199を用いていた。しかし、農家の庭先での希釈融解に炭酸ガス培養器を用いないので、空气中でpH変動が少ないPBSの利用が有効と思われる。確かに基礎媒液にPBSを用いた場合の受胎率は、TCM199よりもやや高い傾向にあっ

たことから、基礎媒液にPBSを用いることは有効であり、炭酸ガス培養器を必要としない農家の庭先で移植を普及するうえで活用できると考えられる。

表2 希釈液の基礎媒液の違いと受胎性

区分	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
PBS	19	10	52.6
TCM199	24	11	45.8

試験2 希釈液に添加するSuc濃度の検討

希釈融解時の希釈液に添加するSuc濃度別の胚の生存性を表3に、受胎率を表4に示した。生存率は、0.2M区では100%(27/27)、0.5M区では94.9%(37/39)と両区に差はみられなかった。また、受胎率は、0.2M区では51.9%(14/27)、0.5M区では45.9%(17/37)であり、0.2M区が高い傾向にあったが、有意な差はなかった。

表3 希釈液のSuc濃度別の生存性

区分	融解胚数	生存胚数	死滅胚数	生存胚率(%)
0.2M	27	27	0	100.0
0.5M	39	37	2	94.9

希釈液に添加するSucは胚にダメージが少なく、かつ耐凍剤が効率的に除去できる濃度が望まれる。実験室内希釈法では短時間(5分間)に急速に耐凍剤を除去し、その後移植液で修復培養を行うため高濃度(0.5M Suc)の希釈液が用いられている。しかし、農家の庭先でのストロー内希釈法を想定した場合、希釈後Sucを含まない移植液に移し替えることができないので移植が終了するまでの間(5分間以上)希釈液中に保持されることとなり、高濃度Sucによる脱水が進行し、胚への影響を考慮する必要がある。今回用いたSuc濃度は、胚への影響が少ないと考えられ、一般的に緩慢凍結によるダイレクト移植でも利用されている。これと同程度の0.2M Suc濃度で短時間に希釈融解を行っても生存率や受胎率に差がないことから、効率的に耐凍剤の除去が可能であることがわかった。高濃度Suc液で長時間(5分以上)保持された場合の胚への

影響はわからないが、農家の庭先での希釈融解を行う場合、影響が少ないと考えられる0.2M Sucの利用が適していると考えられた。

表4 希釈液のSuc濃度別の受胎性

区分	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
0.2M	27	14	51.9
0.5M	37	17	45.9

試験3 希釈液中での保存時間の検討

ストロー内希釈法で希釈融解した場合の希釈液中での保持時間が生存性に与える影響を表5に示した。生存率は、5分保持区90.0%(36/40)、15分区91.7%(33/36)、30分区91.4%(32/35)であり、すべての区で有意な差はみられなかった。

試験1および試験2の実験室内希釈法と異なり、液量の少ない(250u1以下)ストロー内に、耐凍剤並びにSucとともに移植が終了するまで胚が浸漬されたままとなるストロー内希釈法では、希釈方法による胚への影響が考えられる。一概に比較できないが、試験1および2の生存率に比べ、試験3では生存率が5~10%程度低下しており、ストロー内希釈による影響とも考えられる。しかし、0.2M Sucを含んだ希釈液で30分間ストロー内に胚を保持しても保持時間による生存性に影響がなかったことから30分以内の移植であれば希釈液による胚へのダメージはなく、農家の庭先でのストロー内希釈法に有効であると考えられた。

表5 希釈液中での保持時間と生存性

区分	融解胚数	生存胚数	死滅胚数	生存胚率(%)
5分	40	36	4	90.0
15分	36	33	3	91.7
30分	35	32	3	91.4

試験4 ストロー内希釈による直接移植法の検討

ストロー内希釈による直接移植と培養後移植の受胎率を表6に示した。直接移植区の受胎率は48.6%(17/35)、培養後移植区は50.0%(10/20)で、両区間に有意な差は認められなかった。

表6 ストロー内希釈法の受胎性

移植方法	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
直接移植	35	17	48.6
培養後移植	20	10	50.0

ウシのバイオプシー胚をVSED法でガラス化保存し、実験室内融解後の受胎率は34.8%~43.8%であると報告^{10)~12)}されている。また、同様に木下¹³⁾は超急速ガラス化法であるGL-Tip法やオープン・ブルド・ストロー法(OPS法)の受胎率が42.9%、北山ら¹⁰⁾はGL-Tip法の受胎率が32.0%と報告している。筆者ら⁸⁾も実験室内融解によるVSED法、GL-Tip法、クライオトップ法の受胎率がそれぞれ44.0%、44.4%、46.2%であることを報告した。今回のストロー内希釈による培養後移植の受胎率は、これまでの超急速ガラス化法による移植成績と遜色のない結果であり、ストロー内希釈の有効性が認められた。また、ストロー内希釈による直接移植においても培養後移植と同等の受胎率が得られたことから農家の庭先で直接移植ができる方法として有効と思われる。また、本法は、一般的に農家の庭先移植に利用されている緩慢凍結によるダイレクト移植法に比べ、融解方法が煩雑であり、融解に時間がかかるなど普及に向けては、なお改良が必要である。今後は、希釈時間の短縮、希釈液の温度維持法の簡略化を検討し、緩慢凍結によるダイレクト移植に近い方法で移植できる手技を考案したいと考えている。

引用文献

- 1) Charies. M. Herr, Neil A. Holt, Klaus I. Matthaedi and Ken. C. Reed(1990): Sex progeny from 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) 藤田達男(2003): 牛性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別判定精度. 畜産技術, 2, 26-29.
- 2) H. Ishimori, Y. Miki, M. Kishi, K. Saeki and

- H. Kainuma. (1992) : Vitrification of bovine embryos. Theriogenology, 37, 228.
- 3) 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.
- 4) Kuwayama, M., Kato, O. (1998) : All-round vitrification method for human oocytes and embryos. Journal of Assist Reproduction and Genetics. 17(8), 477.
- 8) 小田頼政, 中原仁, 有安則夫 (2009) : ウシバイオプシー胚のガラス化保存法. 岡山県総合畜産センター研究報告, 18, 20-23.
- 5) Stringfellow DA and Seidel SM (1998) Manual of the International Embryos Transfer Society. third edition, 167-170.
- 6) 北山智広・吉村義久・林 登・高井尚治 (2004) : 牛バイオプシー胚の保存方法と受胎性. 岐阜畜研報, 4, 34-36.
- 11) 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プシー胚のガラス化保存. 静岡畜研報, 30, 25-29.
- 12) 福見善之・片山正敏・立川 進 (2003) : バイオプ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.
- 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. 畜産技術, 12, 7-11.