

胚移植の普及・実用化技術の確立

中川邦昭¹，瀬田剛史¹，篠川 温²，中川 浩，内山保彦³，田村祐一
現：¹新潟県中央家畜保健衛生所佐渡支所，²新潟県妙法育成牧場，
³新潟県下越家畜保健衛生所，新潟県農業総合研究所畜産研究センター

Establishment of spreadable and practical bovine embryo transfer method

Kuniaki NAKAGAWA¹，Takeshi SETA¹，Tazunu SASAGAWA²，Hiroshi NAKAGAWA，
Yasuhiko UCHIYAMA³ and Yuichi TAMURA

¹ Niigata Sado Substation of Chuo Livestock Hygiene Service Center

² Niigata Prefectural Agricultural College

³ Niigata Kaetsu Livestock Hygiene Service Center

Niigata Agricultural Research Institute Livestock Research Center

要約 生産現場における胚移植技術のニーズは高いものの、不安定な受胎率を改善するため、生産現場における採胚から凍結までの手技等の実態調査および改善の取り組みを実施。生産現場での採胚開始から検卵・凍結処理（凍結処理）施設までの搬入時間は90分以内が6割、90分から150分に及ぶ場合が4割あることが判明。採胚から凍結処理までの時間経過と受胎率の関係では、150分程度の時間経過の影響は認められなかったものの、凍結処理施設の違いによっては受胎率に影響することが認められた。また、バイオプシーした性別別胚移植を普及させるため、融解時に実験室内での耐凍剤希釈作業を必要とする従来のガラス化保存法から、庭先融解が可能なGlycerolを耐凍剤としたダイレクト凍結法を検討。融解後の胚の生存率は83.3～92.3%で、対照区のガラス化保存法95.8%との差はなく、庭先融解による移植によって52.3%、対照区45%の受胎率が得られた。このことからGlycerolを用いたダイレクト凍結法は、バイオプシー胚移植に実用性の高い方法であることが確認された。

胚移植技術は生産現場での実用性を重視した工夫（鈴木ら1983，Suzukiら1989，Voelkelら1992，中川ら1996）が進展し、現在では人工授精と同様な必須の繁殖技術の一つとなり、生産現場での採胚が日常化する技術水準にまで至っている。しかし、経営体によっては不安定な受胎率のために、本技術を必要としながらも技術活用を回避したままであり、受胎率の安定化は普及上の課題となっている。そこで、生産現場での採胚から凍結処理までの過程を調査し、統一されていない手技や改善点を明確にして、胚移植が広く普及するための安定した受胎率確保を図る必要がある。

また、生産現場で長年望まれている子牛の産み分け技術は、胚の一部を切断（バイオプシー）し遺伝子判定によって高い精度の技術段階に発展した（景山ら2003）。しかし、バイオプシーによって胚を損傷させるため胚の耐凍能が低く（Picardら1985）、バイオプシー胚に有効なガラス化

保存法が一般的に用いられている（Ishimoriら1993，斉藤ら1998）。ガラス化保存法は高濃度な耐凍剤を使用するため、移植時には、実験室内で顕微鏡下の希釈（加温）処理が必要であるため、活用できる地域に限られ普及上の妨げになっている。そこで、生産現場において庭先融解で移植が可能な、性別別胚のダイレクト凍結法（小出ら2008）を実用化技術として確立する必要がある。

材料および方法

1. 採胚から凍結処理までの時間が受胎性に及ぼす影響

1) 生産現場採胚および凍結施設での実態調査

調査は新潟県中越地域において実施した。調査期間は1998年から2007年の10年間を遡り、生産現場で採胚を実施している獣医師および凍結処理を実施している所轄

の中越家畜保健衛生所(家保)からの聞き取りで実施した。調査内容は採胚の頭数、灌流液の種類、フィルター処理の有無、凍結方法、採胚から凍結処理までの経過時間および凍結保存胚の移植成績との関係を調査した。

2) 凍結処理施設および凍結基礎液の違いが受胎率に及ぼす影響

凍結胚の受胎率改善のために、生産現場採胚後の凍結処理を家保と畜産研究センター(畜研)の2カ所で実施した。凍結基礎液は各施設とも20%非働化ウシ胎血清(FCS)加のD-PBS(+)(PBS)またはHEPES緩衝Medium 199(HEPES-199)を用いて、畜研の常法(中川ら1997)により1.5M Ethylene glycol(1.5MEG)のダイレクト凍結法で採取胚を液体窒素に保存した(それぞれPBS区および199区)。保存した胚は融解後、ウシに移植して受胎成績を比較した。採胚は2008年に、移植は2008年から2010年の3年間に、1名の技術者によって受胎牛1頭に凍結胚1個を移植した。移植の供試胚数は以下のとおりとした。

- (1) 家保凍結処理はPBS区125個、家保199区28個
 - (2) 畜研凍結処理はPBS区13個、畜研199区13個
- 数値の統計処理は χ^2 検定によって行った。

2. 性別別胚のダイレクト融解法の確立

畜研で繋養している黒毛和種に常法(中川ら2011)によるFSH漸減投与方法による過剰排卵処置後、人工授精し7日目に回収した後期桑実期から拡張胚盤胞期の細胞変成部分が10%以下の胚を供試し、バイオプシー割合は約10%とした。

1) バイオプシー胚の凍結方法

バイオプシー胚は、あらかじめ38.5°C、5%CO₂、95%空気の条件下で培養したミネラルオイル重層の5%FCS加Medium199 Earle's(m-199)で形態の修復を確認した後、凍結液には0.25M Sucrose加10% Glycerolの20%FCS加HEPES-199(10%Gly)で24個、0.13M Sucrose加5% Glycerol加HEPES-199(5%Gly)で13個を用いて凍結・融解後の生存性を比較した。修復したバイオプシー胚を室温で10%または5% Glycerol加20%FCSHEPES-199に10分間浸漬し、胞胚腔の再拡張を確認後、15分以内に凍結液に移し0.25mlのストローに封入した。ストロー内の溶液構成は胚層を約30 μ l、両側を5mmの空気層および10%または5%Glyで3層にした。その後、10%Glyは-6°C、5%Glyは-4°Cにセットしたプログラムフリーザーにストローを浸漬、1分後に植氷した。植氷から9分間保持後、毎分-0.33°Cで-25°Cまで冷却後、-25°Cで5分間保持し、液体窒素に投入し保存した。

対照区はバイオプシー胚96個をGESX法(齊藤ら1998)に準じてガラス化保存とした。胚を室温下でVS1液(10% Glycerol+0.1M Sucrose+0.1M Xylose+1% Polyethylene

glycol / PBS)、VS2液(10% Glycerol+10% EG+0.2M Sucrose+0.2M Xylose+2% Polyethylene glycol / PBS)に各5分間の平衡後、VS3液(20% Glycerol+20% EG+0.3M Sucrose+0.3M Xylose+3% Polyethylene glycol / PBS)へ投入、1分以内にストロー封入し液体窒素に保存した。

2) バイオプシー胚の凍結後の生存性

凍結胚の融解は液体窒素から凍結ストローを取り出し、空中で5秒保持後、30°Cの温水中でストロー内の気泡を確認(約5秒)したら、凍結ストローから溶液と共に胚をシャーレに滴下、胚を5%FCS加m-199で数回洗浄後に同液中上記培養条件下の24時間の観察を行った。

対照区は液体窒素から凍結ストローを取り出し、空気中に5秒保持後20°Cの水中で加温、ストロー内溶液と共に胚をシャーレに滴下し、胚を0.5M Sucrose / 20%FCS PBS、0.25M Sucrose / 20%FCS PBSに各5分間平衡(加温処理)後に、上記の培養条件で生存性を観察した。

3) バイオプシー胚のダイレクト凍結法による移植

試験区は胚をバイオプシー後に10%Glyで凍結し、17個をダイレクト移植した。対照区はバイオプシーをしない胚を同様な方法で凍結し、25個をダイレクト移植した。GESX区は胚をバイオプシー後にGESX法でガラス化保存し、移植時は実験室内で上記の加温処理および培養条件下で数時間観察し、生存確認後に20個を移植した。移植は畜研近隣の酪農場のホルスタイン種(経産および未経産牛)に1頭1胚で実施した。

数値の統計処理は χ^2 検定によって行った。

結果および考察

1. 採胚から凍結処理までの時間が受胎性に及ぼす影響

1) 生産現場採胚および凍結施設での実態調査

(1) 採胚現場における実態調査成績

調査地域は本県の中で、生産現場採胚の最も盛んな中越地域を選択した。採胚頭数は1998年から2007年の10年間に312頭で実施され、凍結胚数は2,326個であり、1頭当たりの平均凍結胚数は7.5個と、同期中の県内平均5.2個(新潟県受精卵推進会議資料抜粋:凍結12,645個/採胚2,432頭)に比べ良好な採胚成績が認められた。

採胚時の灌流液は、全て市販のエンプリオテック(日本全薬工業、東京)が利用されていた。

採胚によって回収される子宮灌流液は、胚と共に粘液物や血液成分等の異物が含まれるため、採胚後は直ちにこの異物を取り除くフィルター処理が実施される。フィルター処理は、試験機関等の採胚ではマニュアル化されているものの、今回の調査では全頭でフィルター処理は未実施となっていた。フィルター処理は、異物による胚の生存性の影

響を最小限にするために、必要な処理と考えるが、生産現場での無菌作業や、限られた技術者の状況下では困難性も多く、採胚後は直ちに検卵施設へ搬入することを優先していると考えられた。

(2) 検卵・凍結処理施設における実態調査成績

① 採胚から凍結施設搬入までに要する時間

採胚開始から凍結施設搬入までの経過時間を図1に示す。採胚312頭中90分以内が190頭(60.9%)、90~120分が88頭(28.2%)、120~150分が34頭(10.9%)であった。生産現場での採胚は90分までに6割が処理施設への搬入を終了するものの、90分を超え150分に及ぶ長距離輸送が4割認められ、検卵までに長時間を要する事が判明するとともに、生産現場での採胚ニーズの高さも窺われた。

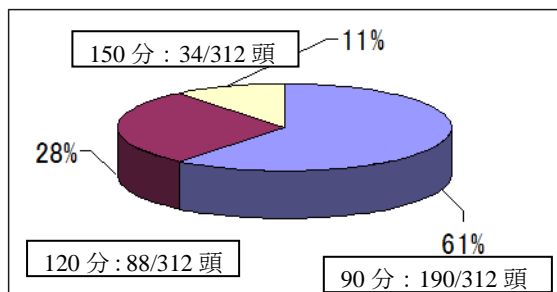


図1 採胚から処理施設搬入までの時間割合

② 採胚から凍結処理までの経過時間と受胎成績

採胚から凍結処理までの経過時間と受胎成績を表1に示す。凍結胚を移植した受胎頭数は、搬入まで90分以内の90分区分で移植795頭中289頭(36.4%)、90分から120分までの120分区分で390頭中132頭(33.8%)、120分から150分の150分区分で55頭中15頭(27.3%)、計1,240頭中、受胎436頭(35.2%)であった。

表1 採胚から処理までの経過時間と受胎成績

区分	凍結個数	移植頭数	受胎頭数	受胎率
90分	1,491	795	289	36.4%
120分	626	390	132	33.8%
150分	209	55	15	27.3%
合計	2,326	1,240	436	35.2%

有意差なし

採胚から凍結処理施設への搬入時間の経過とともに、受胎率は低下傾向にあるものの、各区での有意差は認められず、150分以内の時間経過は受胎率に大きな影響を及ぼさないことが判明した。但し、調査地域の採胚に当たる技術者が採胚に習熟しており、短時間で、出血が少なく終了している事が受胎成績に影響を及ぼさなかった事も要因として考えられた。

家保における凍結ストロー作成には、5種類の液層パター

ーンが用いられていた。凍結胚2,326個のうち、上述のPBSを基礎液に1.5M EG(家保PBS区)が1,058個(45.5%)、これにPBSを1層加えたものが839個(36.1%)、胚層を2層のPBSで挟んだものが295個(12.7%)、家保PBS区の胚層のみに0.1MのSucroseを加えた92個(3.9%)、計2,284個(98.2%)が耐凍剤にEthylene glycolを使用したダイレクト凍結法、その他に耐凍剤にGlycerolを使用した1段階ストロー法42個(1.8%)が用いられていた。1.5MのEthylene glycolによるダイレクト凍結法が、生産現場で広く普及していることが確認されるとともに、地域の凍結処理を担う家保においては、ストロー内の液層パターンを工夫して、受胎率改善への試みがなされていることが窺われた。

2) 凍結処理施設および凍結基礎液の違いが受胎率に及ぼす影響

生産現場採胚から凍結処理のため畜研への搬入時間は、約120分間を要し、家保への搬入時間とほぼ同様であった。凍結施設別の移植成績を表2に示す。

家保処理PBS区は移植125頭中、受胎42頭(33.6%)、家保処理199区は移植28頭中、受胎11頭(39.3%)と両区とも同様な受胎成績であった。一方、畜研処理PBS区は移植13頭中、受胎8頭(61.5%)、199区は移植13頭中、受胎6頭(46.2%)と両区同様な受胎成績であり、凍結基礎液による受胎成績に差は認めなかった。しかし、凍結処理施設別には畜研処理PBS区が、家保処理PBS区に較べて有意に高い受胎率が得られ、199区においても畜研処理の方が高い傾向が認められた。このことから、受胎率を不安定化させる要因は凍結溶液ではなく、凍結施設の差にあり、その施設内で胚の取り扱い方法および器具を含む環境整備等の点検、並びに畜研と家保との技術交流を、より密にしていける必要があると考える。

表2 凍結施設別の移植成績

凍結処理	試験区	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
家保	PBS区	125	42	33.6 ^b
	199区	28	11	39.3
畜研	PBS区	13	8	61.5 ^a
	199区	13	6	46.2

異符号間に有意差有り (a, b: p<0.05)

2. 性別別胚のダイレクト融解法の確立

1) バイオプシー胚の凍結・融解後の生存成績

バイオプシーした胚を、Glycerolを用いたダイレクト法で凍結保存し、融解後の生存判定した形態を図2に示す。融解直後は、細胞質の収縮と明瞭なICMの形態が確認でき、培養2.5時間後には細胞質が拡大し生存性の判定が可能となり、培養20時間後には、さらに胚は拡大し脱出し

た透明帯の2倍以上に発育しているのが観察される。EGを用いたダイレクト法では、バイオプシーをしていない(intact)胚の生存性判定にも24時間を要するケースがあるのに対し、本法は2~3数時間の短時間判定が可能な方法と言える。凍結・融解後の生存成績を表3に示す。10% Gly区は小出ら(2008)の方法に準じ、さらに耐凍剤濃度を1/2にした5%Gly区を試みた。生存率は10% Gly区で凍結24個中20個83.3%、5%Gly区で13個中12個92.3%、GESX区で96個中92個95.8%であり、10%区および5%区ともにGESXのガラス化保存法と同程度の高い生存性が確認された。

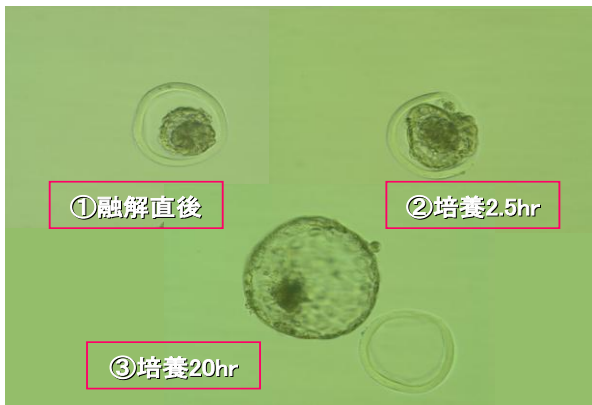


図2 バイオプシー胚の凍結・融解後の形態

表3 バイオプシー胚の凍結・融解後の生存成績

区分	供試胚数	生存胚数	生存率
10%GLY	24	20	83.3%
5% GLY	13	12	92.3%
GESX	96	92	95.8%

有意差なし

2) バイオプシー胚のダイレクト凍結法による移植成績

バイオプシー胚を10%Glyのダイレクト凍結法により保存後、庭先融解で移植した移植成績を表4に示す。

10%Gly区で移植17頭中9頭(52.3%)受胎、対照区として同じ凍結法(10%Gly)でバイオプシーをしていないintact区で移植25頭中12頭(48%)受胎、GESX区で移植20頭中9頭(45%)受胎し、試験区である10%Glyが、他の対照区に較べて良好な受胎成績が得られた。

表4 バイオプシー胚の移植成績

区分	移植頭数	受胎頭数	受胎率
10%GLY	17	9	52.3%
同(intact)	25	12	48.0%
GESX	20	9	45.0%

有意差なし

バイオプシー胚は性判定サンプル採取による損傷のダメージから、従来の緩慢凍結法(一段階希釈法、ダイレクト凍結法等)での耐凍性の低下が知られ(Picardら1985)、ガラス化保存法の検討がなされてきた(Papisら2000、Kuwayamaら2005)。ガラス化保存法はバイオプシー胚に対し高い生存率性を有するものの、煩雑な手技のため習熟が必要であり、さらに移植時は実験室内における希釈操作が必要なため、普及上の妨げとなっている。今回の実験で行ったGlyを耐凍剤とした凍結方法は、高い生存性と、移植による高い受胎性が確認された。凍結手技においては現在普及しているEGのダイレクト法と大きな違いはなく、融解操作も同様な庭先融解であることから、実用性の高い手法であることが確認された。

今後は生存性の高かった5%Glyの移植成績を追試すると共に、従来の凍結方法で生存性の低下する低ランク胚への適応性を検討したいと考えている。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、現地調査等にご協力いただいたNOSAI魚沼の広井信人獣医師、中越家畜保健衛生所の皆様に感謝申し上げます。

引用文献

- Ishimori H, Saeki K, Inai M, Nagao Y, Itasaka J, Miki Y, Seike N, Kainuma H. 1993. Vitrification of bovine embryos in a mixture of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. *Theriogenology*, 40, 427-33.
- 景山聡一, 平山博樹. 2003. 新しい遺伝子増幅(LAMP法)による牛胚の性別判別. *日本胚移植学雑誌* 23 (3), 136-140.
- 小出章子, 宮村元晴, 土屋秀樹, 井上洋一, 市岡秀明, 浜野清三. 2008. バイオプシーした牛体外受精胚の凍結保存および受胎性. 第23回東日本受精卵移植研究会大会報 24, 54-55.
- Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. 2005. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of

- human oocytes. *Reproductive BioMedicine Online* 11 (3), 300-308.
- 中川邦昭. 1997. 実用化に向けた牛胚移植技術. 日本畜産学会北陸支部会報 75, 1-5.
- 中川邦昭, 明日川寛道, 本間暁子, 浅間康代, 佐藤義政, 木部文夫. 1996. ウシ胚におよぼす Ethylene Glycol の影響. 日本畜産学会北陸支部会報 72, 26-28.
- 中川邦昭, 瀬田剛史, 篠川温, 中川浩, 田村祐一. 2011. ホルスタイン種未経産牛における反復採胚技術の検討. 新潟県農業総合研究所畜産研究センター研究報告 17, 54-57.
- Papis K, Shimizu M, Izaik Y. 2000. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology*, 56, 1383-1392.
- Picard L, King WA, Betteridge KJ. 1985. Production of sexed calves from frozen-thawed embryos. *Veterinary Record* 117, 603-608.
- 齊藤則夫, 今井敬. 1998. ガラス化溶液への種々の単糖類添加による牛体外受精由来胚の生存性への影響, 低温生物工学学会誌 43 (1), 34-39.
- Suzuki T, Ishida T and Sakai Y. 1989. Cryopreservation of Bovine Embryos in Medium with Glycerol (1.4M) and Sucrose. *The Japanese journal of animal reproduction* 35 (3), 125-129.
- 鈴木達行, 下平乙夫, 藤山正照. 1983. ウシ凍結受精卵の1段階ストロー法による移植. 家畜繁殖学雑誌 29, 162-163.
- Voelkel SA, and Hu YX. 1992. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 37, 23-37.