

グリセリンを耐凍剤とした性判別胚の直接移植法の検討

佐藤義政, 中川浩, 中川邦昭¹, 瀬田剛史², 安野僚太郎, 福留信司, 篠川温³, 大矢俊行
現: ¹新潟県中央家畜保健衛生所佐渡支所, ²新潟県中央家畜保健衛生所, ³新潟県農業大学校

Direct transfer of sexing embryos cryopreserved in glycerol as cryoprotectant

Yoshimasa SATO, Hiroshi NAKAGAWA, Kuniaki NAKAGAWA¹, Takeshi SETA², Ryotaro YASUNO, Shinji
FUKUDOME, Tazunu SASAGAWA³ and Toshiyuki OYA

Niigata Agricultural Research Institute Livestock Research Center

¹Niigata Sado Substation of Chuo Livestock Hygiene Service Center

²Niigata Chuo Livestock Hygiene Service Center, ³Niigata Prefectural Agricultural College

要約 性判別するために一部の栄養膜細胞をバイオプシーしたウシ胚を、グリセリンおよびシュークロースを耐凍剤として、希釈液と共に受精卵用ストローに封入して緩慢凍結を行った。ストローを加温後、ウシの子宮内に、ストロー内容と共に胚の移植を行った。グリセリンおよびシュークロースの濃度を変えた試験区で受胎率を調査した結果、耐凍剤に 10%グリセリンと 0.25M シュークロース、5%グリセリンと 0.1M シュークロースおよび 5%グリセリンと 0.2M シュークロースを使用した場合の受胎率は、それぞれ 35.7% (5/14), 31.3% (5/16) および 45.5% (10/22) であった。

ウシ胚の性判別による雌雄産み分け技術は、農場の後継牛となる雌ウシの計画的生産を可能にする技術として、畜産経営上重要な技術である。胚の性判別は、過剰排卵処置をしたウシの生体から回収した胚の一部の細胞を、顕微鏡下でバイオプシーした後 DNA や染色体の解析を行う。

ウシ胚の長期保存技術には緩慢凍結法とガラス化保存法が用いられており、いずれもストローに胚を耐凍剤とともに封入して、液体窒素内で保存する。直接移植法はストローを加温後、胚を耐凍剤とともに雌ウシの子宮内にストローから直接注入する方法をいい、緩慢凍結法で普及している。しかし、性判別のためにバイオプシーした胚は緩慢凍結法での受胎率が低く (秋山ら 2001)、胚の保存にはガラス化保存法が用いられている。しかし、ガラス化保存法は耐凍剤濃度が高いためストローを加温した後、耐凍剤を除去する必要があるため、一般的な農場内ではこの操作ができない。そのため、農場での移植作業における利便性から、耐凍剤の除去操作を行う必要がない、直接移植が可能なバイオプシー胚の保存方法の開発が望まれている。

直接移植を行う緩慢凍結法には、耐凍剤として一般的にはエチレングリコールを用いているが (中川 1997, 堂地 2007)、耐凍剤にグリセリンを使用する方法 (堂地 2007, 小出ら 2008) も研究されている。この方法は、バイオプ

シー胚の緩慢凍結法としての応用が期待できる。

そこで、耐凍剤にグリセリンを用いてバイオプシー胚を凍結保存し、融解後の生存性と直接移植法による受胎率を検討した。

材料および方法

1. 供試胚

当センター飼養の黒毛和種およびホルスタイン種から、多排卵処置後の体内受精により採取した品質コード 1 の胚を供試した。採胚に使用した灌流液は 1%子ウシ血清加リンゲル液で、灌流終了後 30 分以内にフィルターで濾過、灌流液で洗浄し、鏡検により回収した。回収した胚は Medium199 を基質に 100 μ M 2-メルカプトエタノール、20%新生子ウシ血清 (以下、NCS) および抗生物質を加えた培養液 (以下 β ME199) のマイクロドロップに投入し 5%CO₂、湿度 100%および 38.5°C の気相下でバイオプシーを行うまで保存した。

2. 胚のバイオプシー

バイオプシーは Dulbecco PBS(-)のマイクロドロップ内において、鏡検下で金属製のマイクロプレード (フェザー

製)により栄養膜細胞側を切断した。バイオブシーする細胞の量は、胚の直径に対して10~30%とし、栄養膜細胞側の性判別用細胞片と内細胞塊側のバイオブシー胚は1%ポリビニルピロリドン加 Dulbecco PBS(-)をかけて直ちに回収した。バイオブシー胚はβME199に移した後バイオブシー前と同様の気相下で凍結保存まで2~5時間修復培養を行った。対照区はバイオブシーしない胚(以下、通常胚)とし、バイオブシー胚と同様の条件下で培養を行った。

なお、培養後に細胞の増殖がみられると判断された胚のみを試験に供した。

3. 凍結保存方法

[10%グリセリンバイオブシー区 (10%GlyBP)]

バイオブシー胚および表1-1および表1-2に示した凍結液を用い、受精卵凍結用ストローは0.25ml容量(IMV製)を使用した(以下、ストロー)。室温下でバイオブシー胚を平衡液に10分間浸漬し、凍結液に移動後直ちに図1に示したカラム構成でストローに吸引、ヒートシールを行った。胚の凍結液への移動から15分以内にプログラムフリーザーの-6°Cエタノールバス内で植氷を行い10分間保持した後、-0.33°C/分で-25°Cまで冷却、-25°Cを5分間保持してから液体窒素に投入した。

[10%グリセリン通常胚区 (10%Gly 通常胚)]

通常胚を使用して10%GlyBPと同様に行った。

[5%グリセリン 0.1M シュークローズバイオブシー区 (5%Gly0.1SucBP)]

バイオブシー胚および表1-3に示した凍結液を用い、10%グリセリン試験区と同様の方法でストローを作成した。植氷温度は-4°Cとし、以降の温度管理は10%GlyBPと同様に行った。

[5%グリセリン 0.1M シュークローズ通常胚区 (5%Gly0.1Suc 通常胚)]

通常胚を使用して5%Gly0.1SucBPと同様に行った。

[5%グリセリン 0.2M シュークローズバイオブシー区 (5%Gly0.2SucBP)]

バイオブシー胚およびシュークローズ濃度を0.2Mとした表1-4の凍結液を用い、5%Gly0.1SucBPと同様に行った。

[5%グリセリン 0.2M シュークローズ通常胚区 (5%Gly0.2Suc 通常胚)]

通常胚を使用して5%Gly0.2SucBPと同様に行った。

4. 融解培養試験

ストローを液体窒素から取り出し、10秒間室温に保持した後、30°Cの微湯で氷晶がなくなるまで融解した。ストローを開封した後、室温下のシャーレ上にストロー内液の全量を排出し、凍結液と希釈液を混合した状態で3分間静置し、βME199に移した後バイオブシー前と同様の気相下で48時間培養を行い形態による生存判定を行った。

表1-1 基礎液(m-TCM199)の組成(/1000ml)

TCM199パウダー(Gibco)	1L用1袋
NaHCO ₃ (半井)	0.35g
HEPES(Sigma)	2.62g
HEPES Sodium Salt(Sigma)	2.35g
Penicillin(明治)	10万単位
Streptomycin(明治)	0.1g

表1-2 10% Gly(BP、通常胚)の凍結液の組成

m-TCM199に対する割合	平衡液	凍結液	希釈液
グリセリン(Sigma)	1.36M (10%)	1.36M (10%)	—
シュークローズ(半井)	—	0.25M	0.25M
非働化子牛血清(Gibco)	20%	20%	20%

表1-3 5% Gly0.1MSuc(BP、通常胚)の凍結液の組成

m-TCM199に対する割合	平衡液	凍結液	希釈液
グリセリン	0.68M (5%)	0.68M (5%)	—
シュークローズ	—	0.1M	0.1M
非働化子牛血清	20%	20%	20%

表1-4 5% Gly0.2MSuc(BP、通常胚)の凍結液の組成

m-TCM199に対する割合	平衡液	凍結液	希釈液
グリセリン	0.68M (5%)	0.68M (5%)	—
シュークローズ	—	0.2M	0.2M
非働化子牛血清	20%	20%	20%

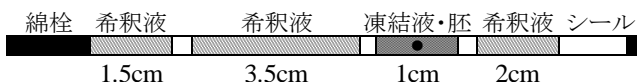


図1 受精卵凍結ストローのカラム構成

5. 移植試験

受胎牛は当センター繋養の黒毛和種、フィールドの黒毛和種、またはホルスタイン種の未経産牛を用いた。ストローの融解は培養試験と同様の方法で行った。ストローを開封した後、頸管經由法により、凍結液と共に胚を子宮角内に直接移植を行った。

結果および考察

1. 培養試験

試験区の凍結融解後48時間の胚生存率は、10%GlyBPの胚生存率は57.1%(16/28)、5%Gly0.1SucBPの胚生存率は67.7%(21/31)と低い生存率であった。生存胚の多くは形態学的に移植に適さないと判断された。胚の融解、希釈液混合後、βME199に胚を移すと胚の急激な縮小がみられた。また、死滅胚の多くはその形態をとどめず粉々に

なった。グリセリンを用いた他の方法の予備試験でも同様であったことから、融解培養試験を中止した。

グリセリンの分子量は 92.09 とエチレングリコールの 62.07 に比較して大きいため、細胞膜の通過速度が遅く、凍結保存後の融解にステップワイズ法ないストロー内ワンステップ法が用いられてきた(中川 1997, 堂地 2007)。今回試験した凍結融解後の希釈方法では、希釈液内で細胞からのグリセリン排出が不完全で、 β ME199 に移したときに、水が急激に流入して細胞が破裂した可能性がある。Tominaga ら (2007) は体外胚を用い、グリセリンを耐凍剤とした凍結融解後の生存率が高いと報告しているが、体外胚と体内胚では細胞膜の透過性に違いがある可能性がある。

2. 移植試験

各試験区の移植後の受胎率を表 2 に示した。各区の受胎率は 10%グリセリンを使用した、10%GlyBP と 10%GlyBP 通常胚でそれぞれ 35.7% (5/14) および 41.7% (5/12)。5%グリセリンと 0.1M シュークローを使用した 5%Gly0.1SucBP と 5%Gly0.1Suc 通常胚ではそれぞれ 31.3% (5/16) および 71.4% (5/7)。5%グリセリンと 0.2M シュークローを使用した 5%Gly0.2SucBP と 5%Gly0.2Suc 通常胚ではそれぞれ 45.5% (10/22) および 70.0% (7/10) であった。各区間に有意差は認められなかった (χ^2 検定)。

表2 各区における受胎率

試験区	移植数	妊	否	受胎率
10%GlyBP	14	5	9	35.7%
10%Gly通常胚	12	5	7	41.7%
5%Gly0.1MSucBP	16	5	11	31.3%
5%Gly0.1MSuc通常胚	7	5	2	71.4%
5%Gly0.2MSucBP	22	10	12	45.5%
5%Gly0.2MSuc通常胚	10	7	3	70.0%

移植試験においては培養試験と異なり、良好な受胎率であった。これは凍結液と希釈液を子宮内で混合し、それが子宮乳により緩やかに希釈されたからであると考えられた。つまり、グリセリン濃度が低い方が細胞内のグリセリン濃度低下が速く、シュークロー濃度が高い方が胚周囲の希釈液の濃度低下がゆるやかになり、細胞内からグリセリンをより確実に排出できるため、受胎率が安定する可能性があると考えられた。バイオブシー胚では 10%Gly または 5%Gly0.2MSuc の受胎率が高く、安定した受胎率を得られる可能性がある。

有意差はないものの、いずれのグリセリン濃度とシュークロー濃度の耐凍剤でも、バイオブシー胚の受胎率は通常胚よりも低かった。秋山ら (2001) も同様の結果を得

ており、バイオブシーにより胚にダメージを与えたために耐凍性が低下したと考えられた。

試験期間の平成 20~25 年度の間、当センター繋養牛由来の通常胚 (コード 1) を使用して、当センターの常法である D-PBS(+)を基礎液とした 1.5M エチレングリコール、0.1M シュークロー、0.25mg/ml リノール酸アルブミン、20% 子ウシ血清を凍結液とした緩慢凍結法の受胎率が 44.9% (118/263) であった。耐凍剤にグリセリンを使用した緩慢凍結法は、バイオブシー胚でもこれと同等の受胎率が得られる可能性がある。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、胚移植にご協力頂いた妙法育成牧場、長岡市営牧場、加茂農林高等学校ならびに和牛繁殖農家の皆様に深謝致します。

引用文献

- 秋山清, 仲沢浩江, 仲沢慶紀, 岸井誠男. 2001. 牛性別判定受精卵の凍結融解後の生存性. 神奈川県畜産技術センター研究報告 88, 10-14.
- 堂地修. 2007. 牛凍結胚のダイレクト法による移植技術の現状. 家畜診療 54(8), 457-465
- 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. バイオブ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.
- 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.
- Tominaga K, Iwaki F, Hochi S. 2007. Conventional Freezing of In Vitro-Produced and Biopsied Bovine Blastocysts in the Presence of a Low Concentration of Glycerol and Sucrose. Journal of Reproduction and Development, 53(2), 443-447.