

# ウシバイオプシー胚の最小容量冷却法において耐凍剤にエチレングリコールを用いた場合の移植成績

米村 功・大下雄三・妻由道明

## 要 約

ウシ性判別胚など比較的凍結に弱い胚の凍結保存改善のため、ガラス化保存の発展法である最小容量冷却法（以下 MVC 法と略す）に用いる耐凍剤について検討した。胚の保存器具にはクライオトップを用いた。

耐凍剤種別の移植後の受胎率では混合区が 45.5% で EG 単独区が 71.4% で、EG 単独区のほうが若干受胎率が高かった。しかし、流産が EG 単独区で 28.6% 発生し、分娩率では両区に差は認められなかった。また、ウシ性判別胚の作成、保存の各過程において損耗が起している、胚の損耗率は 29.8 % に達しており改善の必要がある。

ウシ性判別胚の凍結保存における今後の課題としては、さらに受胎率を向上させる必要があり、また現在の性判別胚の凍結保存では胚の融解は顕微鏡下での段階希釈が必要であるため庭先での直接移植に対応しにくい問題点が残されている。今後はガラス化保存された胚の農家の庭先での利用性を向上させるため、簡便な融解方法及び移植のシステムを構築するための技術開発が必要であると考えられた。

## 緒 言

ウシ性判別卵の移植における受胎成績は、新鮮卵の移植においては実用的な成績が得られている。しかし、新鮮卵で移植するためには受卵牛の発情同期化が必要であり、さらに移植実施場所が試験場等から遠くない範囲に限定される。これらの問題の解決のため、距離や時間の影響を受けない雌雄判別卵の凍結保存卵の実用化が望まれている。

卵子あるいは雌雄判別のためバイオプシーされたウシ胚を緩慢冷却法による凍結保存した場合、その生存性が大きく減じることが知られており<sup>1) 2)</sup>、これらの超低温保存法としてガラス化法の有効性が報告されている<sup>3) 4) 5)</sup>。

ガラス化保存法は、超低温保存時に氷晶が形成されないため氷晶による細胞への物理的障害の発生が低減出来る。また細胞などにとって危険とされる温度域に曝される時間を短縮することが可能となる点などの有効性を持っている。一方、ガラス化保存法は高い耐凍剤濃度の保存溶液を用いるために、耐凍剤による細胞毒性が懸念さ

れる。また高い浸透圧を持った保存液による大きい浸透圧変化の障害などの欠点が指摘されている。

近年、急速なガラス化冷却法としてマイクロドロップレット、オープンプルドストロー及びクライオループなどの器具等によるガラス化保存が開発され、従来凍結保存が困難であった卵子や性判別ウシ胚などの超低温保存で成果を得ている。さらに最近ゲルローディングチップ及びクライオトップなどの器具を用いた最小容量冷却法（以下、MVC 法と略す）により、およそ-20,000 /分と極めて高速な冷却速度を実現した超低温保存法が開発されている<sup>6)</sup>。これら MVC 法の開発により、従来のガラス化保存法よりも低い濃度の耐凍剤での保存が可能となってきた。

一方、ウシ胚等の凍結保存に用いる耐凍剤の種類として EG は胚に対する毒性の低さ及び細胞内への浸潤、希釈の早さ等からその有効性が広く知られている<sup>7) 8) 9)</sup>。

そこで本研究では、MVC 法に適した耐凍剤を検討するために、ウシ性判別胚を用い、15% (V/V) EG 及び 15% (V/V) DMSO を混合し耐凍剤濃度を合計で 30% にした場合と EG 単独で耐凍剤濃度を 30% (V/V) にした場合

の超低温保存後の胚の生存率を調査した。

## 材料及び方法

### 1 供試ウシ胚

発情後9～14日の供胚牛（黒毛和種）に、卵胞刺激ホルモン（FSH）の20AU減量投与による過剰排卵処理を行い、処理開始から3日目の午前中にプロスタグランジン製剤（PGF<sub>2</sub>）にて発情を誘起した。5日目の午後と6日目の朝に人工授精を実施し受精後7日目に回収した。回収されたA～Bランクの胚を供試した。

### 2 試験方法

胚を取り扱う基礎培養液には、10%（V/V）ウシ胎子血清（FBS）を含む25mM HEPES緩衝TCM-199（インビトロジェン）を用いた。移植に用いる胚は、各試験区の処理後、短時間培養し、生存している胚を発情後7日目の黒毛和種雌牛に移植することにより受胎率を調査した。胚のバイオプシーは、金属刃（バイオカットフェザー）を用いて行った。胚はバイオプシー後、器具にクライオトップ（北里サプライ）を用いたMVC法により超低温保存した。耐凍剤の種類はエチレングリコール及びジメチルスルホキシド混合区（混合区）と新たに試みるエチレングリコール単独区（EG単独区）を比較した。

### 2 凍結保存器具

最小量冷却法が可能な器具としてクライオトップ（北里サプライ、静岡市）を用いる。

### 3 凍結溶液

基礎凍結溶液は、基礎培養液に0.5M シュークロース（SU）を添加し、耐凍剤を試験区分の濃度に従って調整した。耐凍剤別の試験区分には、kuwayama<sup>8)</sup>の報告している15%（V/V）EG及び15%（V/V）DMSOを混合し耐凍剤濃度を合計で30%（V/V）にした試験区（30%CPA区）及び基礎凍結溶液に耐凍剤にEG単独で用い、耐凍剤濃度を30%（V/V）にした試験区（30%EG区）で比較した。

## 3 胚の凍結

### (1) 凍結溶液

基礎凍結溶液は、基礎培養液に0.5M シュークロース（SU）を添加し、耐凍剤を試験区分の濃度に従って調整した。耐凍剤別の試験区分には、kuwayama<sup>8)</sup>の報告している15%（V/V）EG及び15%（V/V）DMSOを混合し耐凍剤濃度を合計で30%（V/V）にした試験区（30%CPA区）及び基礎凍結溶液に耐凍剤にEG単独で用い、耐凍剤濃度を30%（V/V）にした試験区（30%EG区）で比較した。

### (2) 凍結溶液への平衡と凍結

15%の耐凍剤濃度に調整した一次平衡液に4分間浸漬する。ついで凍結溶液に移し30秒以上～45秒以内に、極少量（約0.4マイクロリットル）の凍結溶液とともにクライオトップの先端部に滴下し、液体窒素に先端部を投入する。

### (3) 保存

クライオトップの先端部にキャップを取り付け全体を液体窒素に投入し、液体窒素中で保存する。

### (4) 胚の融解と培養

クライオトップの先端部を1MSUを含む培養液に1分浸漬し、ついで0.5MSUを含む培養液に3分間浸漬した後、培養液中で5%CO<sub>2</sub>、38.5℃、1時間～3時間培養する。融解培養した胚が保存以前の発育段階以上になった場合に生存と判定し、移植に供した。

### (5) 胚の移植

自然に発情を発現した黒毛和種雌牛を用い、発情後7日目に定法により移植した。

## 結果

耐凍剤種別の移植後受胎成績を表1に示す。データ数が少ないが、受胎率では混合区が45.5%でEG単独区が71.4%で、EG単独区のほうが若干受胎率が高かった。しかし、流産がEG単独区で28.6%発生し、分娩率では両区に差は認められなかった。ガラス化保存の発展形である最小容量冷却法（MVC法）は各種動物の卵子、ウシ体外受精胚及びブタ体外受精胚等で既往の報告があるがウシ性判別胚でも利用が可能なが示唆された。

ウシ性判別胚の作成、保存の各過程において損耗が発

している、発生状況を表2に示した。本試験全体での胚の損耗率は29.8%に達しており改善の必要がある。

表1 耐凍剤種別の移植後受胎成績

区分	移植頭数	受胎頭数	流産数	分娩頭数
混合区	11	5(45.5)	0(0)	5(45.5)
EG単独区	7	5(71.4)	2(28.6)	3(42.9)
計	18	10(55.5)	2(20.0)	8(44.4)

表2 胚の判別、凍結処理による損耗発生数

区分	供試 胚数	損 耗 発 生 理 由				
		切断	判別	紛失	凍結	小計
混合区	30	2	3	3	3	11(36.7%)
EG単独区	17	1	2	0	0	3(17.6%)
計	47	3	5	3	3	14(29.8%)

\*カッコ内は出現率

## 考 察

ウシ性判別胚をクライオトップを用いて最小容量冷却法により保存する方法は、緩慢冷却法と比べて作業時間が短いこと、また高価なプログラムフリーザーが不要なので設備コストが低いなどの利点がある。

ウシ性判別胚の凍結保存における今後の課題としては、受胎率を向上させる必要が有ると共に、現在の性判別胚の凍結保存では、胚の融解は顕微鏡下での段階希釈が必要であるため庭先での直接移植に対応しにくい問題点が残されている。今後は最小容量冷却法により保存された胚の農家の庭先での利用性を向上させるため、簡便な融解方法及び移植のシステムを構築するための技術開発が必要であると考えられた。

## 参 考 文 献

1)福島護之ら、体外受精由来胚盤胞の凍結能についての特性、J. Reprod. Dev.,38,49-54(1992)  
 2)福島護之ら、体外受精・体外培養法で作出された牛胚盤胞の凍結融解後の受胎性、繁殖技術会誌、14.1-5(1992)

3)窪田力ら、牛胚のガラス化凍結法の検討、鹿児島肉改研報、5,15-18(2000)  
 4)大下雄三ら、ウシ性判別におけるバイオプシー前後のガラス化が胚の生存性に及ぼす影響、鳥取畜試研報、32、5-8(2004)  
 5)大下雄三ら、ウシ性判別胚のガラス化保存における保存液の種類・バイオプシーと保存処理の順序・保存前培養時間の有無が保存後の受胎性に及ぼす影響、鳥取畜試研報、33、5-7(2005)  
 6)富永敬一郎ら、ゲル・ローディング・チップを用いたウシ体外受精由来初期胚のガラス化保存 J. Reprod. Dev. 47: 267-273,(2001)  
 7)Kasai M.,etal: Effects of Various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos. J.Reprod.Fert.63,175-180(1981)  
 8)福島護之ら、凍結保護物質にエチレングリコールを用いたウシ体外受精由来凍結胚のストロー内希釈・移植法の検討、兵庫農技セン報、31,1-6(1995)  
 9)米村功ら、ウシ体外受精胚の最小量冷却法に用いる耐凍剤の選定、鳥取畜試研報、34、5-7(2006)  
 10)Kuwayama M, Kato O,All-round vitrification method for human oocytes and embryos. J.Assist Reprod.and Genet.17.8.477(2000)