

ウシ低品質胚の低温保存及び最小容量冷却法による凍結保存の検討

米村 功・瀬尾哲則・妻由道明

要 約

牛胚を過剰排卵処理により採取すると約 20 %程度低品質な胚が発生する。低品質な胚は、新鮮胚で移植すれば正常な子牛として生産できる。しかしこれを凍結等により保存することは困難であり多くの場合廃棄されていた。一方、低品質胚を低温保存または凍結保存出来れば、受胎牛の確保が容易になり優良子牛の生産頭数を増加させることが可能となる。

試験 : 低温保存試験

低温保存での48時間保存後の胚の生存率は、-1 では0%・0 では20%・5 では100%であり、低品質胚を5 以下で長期に保存することは困難であった。

試験 : 最小容量冷却法による凍結試験

低品質胚のガラス化保存の発展法である最小容量冷却法について胚の保存器具にクライオトップを用いて検討した。最小容量冷却法による凍結保存後に 75 %の生存胚が得られたが、胚細胞が透明体を脱出する能力が不十分であった。

試験 : 透明体を切開した胚の凍結試験

透明体を切開しないで最小容量冷却法により凍結、融解・移植した場合の受胎率は(2/15,13.3%)低かった。しかし、胚の透明体を予め切開して発育を促進する処理を検討したところ、比較的高い受胎率(4/8,50 %)が得られた。

ウシ低品質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、また現在の保存方法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で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技術開発が必要であると考えられた。

緒 言

ウシの過剰排卵処理により胚を採取する場合、20 %程度発生する。低品質な胚は、新鮮胚で移植すれば、実用的な成績で正常な子牛に発生する。しかし、新鮮卵で移植するためには、あらかじめ受胎牛の発情同期化が必要であり、また移植実施場所が試験場等から短時間で輸送出来る範囲に限定され、多くの場合廃棄されていた。これらの問題の解決のため、低品質胚の保存の実用化が望まれている。低品質胚を低温保存または凍結保存出来

れば、受胎牛の確保が容易になり、移植胚の数が増加し優良子牛の生産頭数増加が可能になる。

ウシ卵子あるいはバイオプシーされたウシ胚等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¹⁾²⁾、これらの凍結保存法としてガラス化法の有効性が報告されている³⁾⁴⁾⁵⁾。

最近ゲルローディングチップ⁶⁾及びクライオトップ⁷⁾などの器具を用いた最小容量冷却法(以下MVC法)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凍結保存法が開発されている⁷⁾。また、ウシ胚等の凍結保存に用いる耐凍剤の種類としてエチレングリコ

ール（以下 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おり^{8) 9) 10)}、ウシパイオプシー胚の最小容量冷却法に利用可能なことも示されている。¹²⁾

そこで本研究では、ウシ低品質胚について、0 から 5 までの低温での 48 時間以上の保存及び最小容量冷却法による超低温保存後の胚の生存性を調査した。

材 料 及 び 方 法

1 共通な項目

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（PGF₂）にて発情を誘起した。処理開始後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日目に回収されたB～Cランクの胚を供試した。

2) 胚を取り扱う基礎培養液

胚を取り扱う基礎培養液（以下培養液）及び低温での保存に用いる保存液には、20%（V/V）ウシ胎児血清（FBS）を含む 25mM Hepes 緩衝 TCM-199、Hanks（インビトロジェン）を用いた。

2 試験：低温保存試験

低温保存は-1、0及び5の恒温器、気相は空気下で48時間保存した。胚を保持した後、38.5に再加温し、24時間後に胚の発育段階の進行している胚を生存胚とした。保存及び培養はプラスチックシャーレを用いた微少滴培養法により実施した。

3 試験：最小容量冷却法による凍結試験

1) 凍結保存方法

クライオトップを用いた最小容量冷却法により超低温保温を行った。基礎凍結溶液は、基礎培養液に0.5M シュークロース（以下 SU）を添加し、耐凍剤には EG を単

独で用い、耐凍剤濃度を 30%（V/V）にした。

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。つぎに凍結溶液に移し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（北里サプライ、静岡市）の先端部に滴下し、液体窒素に先端部を投入した。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、液体窒素中で保存した。

(3) 胚の融解と培養

クライオトップの先端部を0.5M SUを含む培養液に3分浸漬し、つぎに0.25M SUを含む培養液に3分間浸漬した後、20%（V/V）ウシ胎児血清（FBS）を含む25mM Hepes 緩衝 TCM-199、（インビトロジェン）中で5%CO₂、38.5、24時間培養した。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た。生存胚は培養を継続し透明体を脱出するか調査した。

3 試験：透明体を切開した胚の凍結試験

1) 透明体の切開

顕微鏡下において、バイオカットブレード（フェザー）を用いて透明体の一部を切開した。

2) 胚の移植

胚を融解後に1時間～3時間培養し、自然に発情を発現した、発情後7日目の黒毛和種雌牛に定法により移植し受胎率を調査した。

結 果

試験：低温保存試験

低品質胚を-1から5で48時間以上保存する目的で低温保存技術を検討したが、48時間保存後の胚の生存率は、-1では0%・0では20%・5では100%であり、低品質胚を5以下で保存することは困難で、長期保存

は出来なかった。(表1)

表1 各種の低温保存での低品質胚の48時間後の生存性

保存温度	供試胚数	生存胚数	生存率
-1	8	0	0%
0	10	2	20%
5	4	4	100%

試験 : 最小容量冷却法による凍結試験

最小容量冷却法により凍結融解後に 75 % の生存胚が得られてた。しかし、胚細胞が透明体 (卵の殻に相当) を脱出する能力が不十分であり、移植による受胎が困難であると考えられた (表2)。

表2 透明帯未切開胚の凍結融解後の培養での生存性

	供試胚数	生存数 (生存率)	脱殻数
非切開	16	12 (75 %)	3 (18.9%)

* カッコ内は出現率

3 試験 : 透明体を切開した胚の凍結試験

透明帯を未切開で凍結融解後に移植した場合、受胎率は低かった (2/15, 13.3%)。しかし、胚の透明体を予め切開して発育を促進する処理を検討したところ、統計的に有意ではないが、受胎成績の向上 (4/8, 50.0 %) が認められた。(表3)

表3 凍結融解胚の移植後の受胎成績

試験区	供試胚数	受胎頭数 (受胎率)
非切開	15	2 (13.3 %)
透明体切開	8	4 (50.0 %)

* カッコ内は出現率

考 察

低温保存での48時間保存後の胚の生存率は、5 度では100%であったが、5 度では48時間以上の保存は困難であることが知られており、長期保存とはならない。さらに長期間の保存の可能性を検討するために-1 及び0 度の保存を試みたが保存は出来なかった。ウシ胚を4 度保存すると、細胞の変成とDNAの断片化が起こるとの報告¹⁰⁾もあり、低品質胚を5 度以下で長期に保存することは困難であった。

ガラス化保存の発展形であるMVC法は各種動物の卵子、ウシ体外受精胚、ウシ性判別胚及びブタ体外受精胚等で既往の報告があるが、透明体を予め切開した後に、凍結を実施すれば、ウシ低品質胚でも利用が可能なが示唆された。

また、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こと、作業が容易であること、などの利点もある。

ウシ低品質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・バイオブ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)Kuwayama M, Kato O,All-round vitrification method for human oocytes and embryos. J.Assist Reprod.and Genet.17.8.477(2000)

8)Kasai M.,etal: Effects of Various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos. J.Reprod.Fert.63,175-180(1981)

9)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)

10)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)

11)音井威重ら、低温保存時間が体外受精胚の発育と胚細胞の生存性に及ぼす影響、徳島肉畜研報 27,1-6,1999

12)米村功ら、ウシバイオブ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、鳥取畜試研報、35、4-6(2007)