

# 受精卵移植簡易化技術の確立

(簡易凍結融解技術の開発)

福見 善之, 岩佐 隆範, 立川 進<sup>※)</sup>

## 要 約

近年、加藤らの報告により凍結液に (EFS20, 40) を用い、融解液と凍結液の比重を利用した重層法によるガラス化凍結ストロー内希釈法が開発され、今回我々はその方法を参考に、体外受精胚を用いてガラス化保存された牛受精卵のストロー内融解による生存性について検討した。

(試験1) ガラス化凍結前処理時間 (30, 60, 90 秒) 後の凍結融解処理後の生存性 (試験2) 2種類の融解液 (0.3M Suc - 20%FCS - PBS, 20%FCS - PBS) による融解時間 (0, 5, 10, 15 分) 後の凍結融解処理後の生存性について検討を行い、(試験3) 試験1, 2の結果を踏まえて各発育ステージ間 (CM, e - Bla, Bla, Ex - Bla) における凍結前処理時間及び凍結融解処理後の生存性について検討を行った。

さらに、野外での実用化を目的に、過剰排卵処理により回収された体内受精卵を用いてストロー内融解によるダイレクト移植による受胎性について検討した。

結果、試験1では、凍結前処理時間90秒区が最も生存性が高く、生存率83.3% (25/30)、脱出率73.3% (22/30) であった。試験2では、融解液に0.3M Suc - 20%FCS - PBSを用いることにより融解後5分以内であれば生存率86.7% (26/30)、脱出率83.3% (25/30) であった。試験3では胚の発育ステージが高まるほど凍結融解後の生存率が高くなる傾向であった。最後に、移植試験結果については13頭に移植した結果、5頭受胎確認され、38.5%の受胎率が得られ、低率であるが受胎性が確認することができた。今後更に受胎率向上を図るために、今回の方法に改良を加え、野外での実用化に結びつけたい。

## 目 的

牛胚の凍結保存方法には、数種類の方法があり、凍結保護物質としてグリセロール (以下:GL) は広く用いられているが、現場での簡易な融解には適していないのが現状である。葛西ら<sup>1)</sup>によりマウス胚においてGL同様、エチレングリコール (以下:EG) が凍結保護物質として有効という報告以来、牛胚においてもEGを用いた凍結保存・直接希釈・ダイレクト移植により高い受胎率を得られ、簡易かつ生存性の高い凍結方法として現場で広く用いられている。

しかし、近年ダイレクト法より生存性の高い凍結方法としてガラス化保存法が報告<sup>2)</sup>され、ガラ

ス化保存した胚のダイレクト移植できる簡易な融解方法についての研究が進められており、中でも加藤ら<sup>3)</sup>は胚を含む比重の重いガラス化液層に比重の軽い直接希釈液を重層してガラス化保存を行い、加温と同時にストローを反転させることによりストロー内で希釈させ、直接移植できる方法を開発し、高い生存率及び受胎率を報告している。

そこで、今回我々は加藤らの方法を参考にガラス化保存後の胚の生存性及び受胎性について検討した結果、若干の知見を得たのでその概要について報告する。

\* 徳島県畜産課

## 材料及び方法

供試胚には、食肉処理場で採取した牛卵巢内卵子から当所常法により得られた体外受精胚を用い、ガラス化前処理、融解液による希釈時間、発育ステージ間におけるガラス化凍結後の生存性の試験に用いた。

また、移植試験については、当所繫養の黒毛和種に過剰排卵処理・人工授精を施し、発情後7日目に回収した体内受精卵を用いた。

ガラス化液として40% EG + 18% フィコール（以下 Ficol） + 0.3M シュクロース（以下：Suc）を組成とするEFS40と20% EG + 24% Ficol + 0.4MSuc 組成とするEFS20を添加したPBS（－）を用いた。

ガラス化凍結処理法として、0.25ml のストローに希釈液を吸引して綿栓を塞ぎ、90mm のカッパ針を用いて綿栓近くにEFS40を5mm 注入した。25℃の室温下でEFS40より比重の大きいEFS20で（30～90秒間）前処理後、EFS40に移し、ピペッティング処理した後、ストロー内のEFS40に導入し30～35秒間保持した。

次に綿栓側を下に立て氷水に浸し、空気層を介さず直接希釈液を重層し、充填終了後先端部分をシーリングし、液体窒素ガス中で冷却した後、液体窒素に投入して凍結保存した。

融解処理法は、空気中で15秒間保持した後、ストローのシール側を下に希釈液部分の先端数mmを20～25℃の水に5秒間浸し、次にストロー全体を浸して全体を融解し、希釈液に比重の重いEFS40が落下することによりストロー内で融解処理した。移植は、凍結融解終了後、移植器にセットして受卵牛の黄体側子宮角に移植した。

### （試験1）

ガラス化凍結前処理時間における凍結融解後の生存率について体外受精により作出した胚盤胞期胚（以下：Blast胚）を供試胚として用い、EG、Ficol、Sucを組成としたガラス化凍結液（EFS20、

40）により、EFS20での凍結前処理時間（30、60、90）秒後の凍結融解処理後の生存性について検討した。

### （試験2）

試験1同様Blast胚を用いて、2種類の融解液（20% FCS - PBS, 0.3MSuc - 20% FCS - PBS）によるストロー内融解時間における凍結融解後の生存性について検討した。

### （試験3）

試験1, 2の結果を踏まえ、体外受精胚の各発育ステージ間（以下、桑実期胚：CM, 初期胚盤胞期胚：e - Bla, 胚盤胞期胚：Blast, 拡張期胚盤胞期胚：Ex - Bla）におけるガラス化凍結前処理時間及び融解液におけるストロー内融解時間について凍結融解後の生存性について検討した。

### （試験4）

試験1～3の結果を踏まえて野外においてガラス化凍結後ストロー内融解による受胎性について検討するために、当所繫養牛を用いて移植を実施した。

## 結 果

### （試験1）

ガラス化凍結前処理時間における凍結融解処理後の生存性について検討した結果、表1に示すとおり、前処理浸漬時間90秒区が、30、60秒区に比べ高い生存率83.3%（25/30）脱出率73.3%（22/30）であった。

表1 ガラス化凍結前処理時間における生存性について

浸漬時間	供試胚数	発育ステージ	生存率 (%)	脱出率 (%)
30	30	Blast	15 (50.0)	13 (43.3)
60	30	Blast	18 (60.0)	17 (56.7)
90	30	Blast	25 (83.3)	22 (73.3)

(試験2)

ガラス化凍結保存後の融解液別における融解後の生存性について検討した結果、表2に示すように、融解液に0.3MSuc - 20% FCS - PBSを用いることにより、融解後5分以内であればBlast胚において生存率86.7% (26/30)、脱出率83.3% (25/30)であった。

表2 融解液及び時間における生存性について

融解液	希釈時間	供試胚数	生存率 (%)	
			24h	48h
20%FCS - PBS	0	30	26/30(86.7)	24/30(80.0)
	5	30	22/30(73.3)	20/30(66.7)
	10	30	17/30(56.7)	16/30(53.3)
	15	30	11/30(36.7)	10/30(33.3)
0.3MSuc - 20%FCS - PBS	0	30	29/30(96.7)	28/30(93.3)
	5	30	26/30(86.7)	25/30(83.3)
	10	30	12/30(40.0)	10/30(33.3)
	15	30	8/30(26.7)	8/30(26.7)

(試験3)

試験1の結果により、Blast胚において生存率が高かったガラス化凍結前処理時間90秒において各発育ステージ間における生存性について検討した結果、表3に示すように胚の発育ステージは進むほど凍結融解後の生存率が高くなる傾向であった。

また、試験2の結果により、融解液(0.3MSuc - 20%FCS - PBS)においてストロー内での融解時間5分後の各発育ステージ間における生存性について検討した結果、凍結前処理時間の結果同様

表3 ガラス化凍結前処理(90秒)における発育ステージ間の生存性について

発育ステージ	供試胚数	生存率 (%)	
		24h	48h
CM	30	13/30(47.6)	10/30(33.3)
e - Bla	30	22/30(73.4)	20/30(66.7)
Bla	30	25/30(83.3)	22/30(73.3)
Ex - Bla	30	28/30(93.3)	24/30(80.0)

に、胚の発育ステージが高まるほど凍結融解後の生存率が高くなる傾向であった。

表4 融解液(0.3MSuc - 20%FCS - PBS)における凍結融解処理(5分)後の生存性について

発育ステージ	供試胚数	生存率 (%)	
		24h	48h
CM	30	13/30(43.3)	11/30(36.7)
e - Bla	30	23/30(76.7)	21/30(70.0)
Bla	30	26/30(86.7)	25/30(83.3)
Ex - Bla	30	24/30(80.0)	22/30(73.3)

(試験4)

試験1～3までの結果を踏まえて、表5に示すように13頭の受卵牛に移植した結果、5頭受胎、受胎率38.5%であった。

表5 移植試験結果

移植頭数	受胎頭数	不受胎頭数	受胎率 (%)
13	5	8	38.5

考 察

牛胚の凍結保存技術の開発過程において、種々の凍結保護物質の種類及び濃度の組み合わせによる有効性が試みられてきた。現在では、牛胚の凍結保存に低濃度の凍結保護物質を用いた緩慢凍結法が選択され、融解後にダイレクト法による移植が野外で一般的に用いられている。

ダイレクト法を含めた一般的に用いられている牛胚の凍結方法には高額なプログラムフリーザーが必要である上に、1回の凍結に2時間の時間が必要である。また、その時に使用する凍結液に含まれる耐凍剤濃度では凍結時に氷晶を形成することから胚に物理的ダメージを与える可能性が指摘されている。

緩慢凍結法の開発と実用化に並行してより高濃度の耐凍剤を含んだ凍結液を用い、プログラムフリーザーを必要とせず、直接液体窒素に投入するガラス化凍結保存技術が開発されている。しかし、凍結融解後に高い生存性が期待されるもの

の、高濃度の凍結液を用いることから、移植に際し、耐凍剤を除去する必要があるが、また実験室内での作業という制約があることから、現在ダイレクト法が主流となる野外では普及性には乏しく、ガラス化凍結によるダイレクト移植技術の開発が早くから望まれていた。

しかし、近年、加藤ら<sup>3)</sup>によりガラス化液と融解液の比重の差を利用してストロー内において胚を含むガラス化液層と融解液層に直接重層することにより、加温と同時にストローの反転によりストロー内融解を行い、ダイレクト移植ができる技術が開発され、53～82%の生存率、35～68%の脱出胚盤胞率及び21～71%の受胎率を報告している。

そこで今回我々は、加藤らによるストロー内融解を参考に、1) ガラス化凍結前処理時間、2) 融解処理液及び融解時間、3) 胚の各発育ステージ間における凍結融解後の生存率について検討を行い、1)～3)の結果を踏まえて野外での移植を行い、受胎性について検討した。

今回の凍結胚におけるガラス化凍結前処理時間及び融解処理時間の生存性結果から、融解後5分以内であれば83.3%と高い生存性を得たが、受卵牛に移植するまでに最低でも5分程度は必要であることから、受胎率向上するためには再度ストロー内での融解方法について検討する必要があることが示唆された。

また、胚の発育ステージによる凍結融解後の生存性について、初期胚盤胞～胚盤胞・拡張期胚盤胞へと発育ステージが進むほど凍結融解後の生存率が高く、今回の凍結方法では発育の進んだ胚の凍結に有効であることが示唆された。

移植結果については、野外での移植を念頭に、ガラス化凍結法によるストロー内融解法により過

剰排卵処理により回収された体内受精卵の移植を行った結果、受胎率38.5%であった。

今回の試験結果では体外受精胚における生存性試験で高い生存率を示したものの、体内受精卵を用いた移植試験では高い受胎率は得られなかった。しかし、従来体外受精胚の耐凍能は、体内受精胚より弱いことが解っており、移植試験による受胎性についてはストロー内への充填法または融解処理時の作業上の問題点が考えられ、今後更に改良を加える必要性が伺われた。

以上、今回の結果から、野外での移植の実用化に際し、再度検討を行い、技術的改良を加えることにより、野外においても応用可能な凍結保存技術であることが考えられた。

今後、更に胚の各発育ステージにあった凍結方法の開発を行い、技術的にも簡便に耐凍剤の希釈が行えるガラス化凍結保存・ダイレクト移植技術の開発することにより、牛群改良促進と受精卵移植の普及に貢献できるものと考えられる。

## 参考文献

- 1) Kasai M., Niwa and A., Iritani (1981) : Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos : J. Reprod. Fert. 63, 175-180
- 2) 立川進, 音井威重, 近藤正治, 牛体外受精 (第6報) 牛体外受精胚のガラス化保存, 徳島県肉畜試験場研究報告第20号 (1992) 6-11
- 3) 加藤英生, 中山和彦, 酒井清高, 久保田誠寛, 海老原信子, 葛西孫三郎, ガラス保存したウシ胚の直接移植に関する検討 (2001) 第16回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会講演要旨, 34-35