

ストローカット法による牛性判別胚の ガラス化保存及び融解移植後の受胎性

笠井 裕明, 福見 善之, 立川 進

要 約

ガラス化液に 20% EG-20% DMSO-0.6MSuc-20% FCS-PBS を用い、先端部分を斜めにカットした 0.25ccET 用ストローに胚を含む極少量のガラス化液でドロップを作りガラス化させる保存方法で保存した牛バイオブシー胚を融解後 10% FCS と 100 μ M β -メルカプトエタノールを添加した 199 で 1 時間培養したところ供試胚 20 個全ての生存が確認され、移植により 16 頭が受胎した。この内、2 頭は移植後 40 日前後に流産したが 1 頭が早産し 13 頭が正常分娩した。牛バイオブシー胚の安定保存に対する超急速ガラス化法の有効性が実証された。

1 目 的

ウシ体内受精由来胚の性判別における、判別後の新鮮胚の受胎性はバイオブシーしない胚と同程度の受胎率である¹⁾が、グリセリンを耐凍剤に用いた緩慢凍結融解後の生存性は低く²⁾、性判別技術を普及させる上で、安定した保存技術を開発することは急務の課題であった。

先端技術等地域実用化研究促進事業において開発したストローカット法による超急速ガラス化保存技術は、体外受精由来胚を供試胚として高い生存性と再現性を実証した³⁾。新たに開発したこの保存方法を体内受精由来性判別胚に応用し若干の知見を得たので報告する。

2 材料及び方法

供試胚は当研究所繋養中のホルスタイン種乳用牛から当研究所の慣行に従い実施した過剰排卵処理によって回収した体内受精由来の胚盤胞期～拡張期胚盤胞期胚 (Blast) である (表 1, 2)。性判別は、A. B. Technology 社製プライマーを用いた PCR 法によって実施し、バイオブシー後の胚の回復培養には IVD101 (機能性ペプチド研究所) を用い 38.5°C, 5% CO₂-5% O₂-90% N₂ 条件下で 4～5 時間行った。

回復培養後の胚のガラス化保存は、Vajta ら⁴⁾ の報告にしたがい、ガラス化液に 20% ジメチルスルフォキシド (DMSO) と 20% エチレングリコール (EG) 及び 0.6M シュクロース (Suc) を添加した 20% 牛胎子血清 (FCS) 添加 PBS を用いた。ガラス化の手順は富永ら⁵⁾の方法に準じ実施した。すなわち、10% DMSO-10% EG-20% FCS 添加 PBS のドロップ中に回復培養後のバイオブシー胚を 90 秒間浸漬したのちにガラス化液 (20% DMSO-20% EG-0.6MSuc-20% FCS 添加 PBS) に 30 秒間浸漬し、先端部分を斜めに切断したストロー内に胚を含むガラス化液でドロップ作り、液体窒素中に投入しガラス化させ融解時まで液体窒素中で保存した。

融解は 0.3. MSuc-20% FCS 添加 199 液に、液体窒素よりとりだしたガラス化保存胚を速やかに浸漬し融解させ、同液中で 60 秒間放置した後に 0.1MSuc-20% FCS 添加 199 に移動させて 5 分間保持し、その後、10% FCS と β -メルカプトエタノールを添加した 199 液中でおよそ 1 時間回復培養し移植を行った。なお、保存融解操作は 38.5°C の温度環境下で実施した。

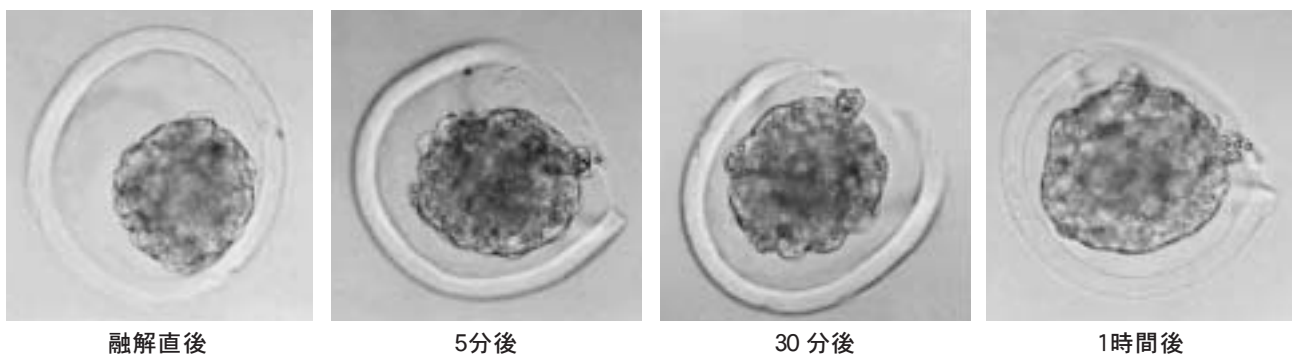
受胎牛はホルスタイン種育成及び経産牛で、フリーストールで飼養管理している経産牛 8 頭、繋留中の育成牛 1 頭、放飼中の育成牛 11 の合計 20 頭である (表 3)。

表1 供卵牛別採卵成績

牛番号	名 号	種雄牛	供試胚数 (♂胚：♀胚)
2	アグリプライス ピースター ニコール ET	レディック (28H583)	10 (5： 5)
24	レーガンクレスト ウインチェスター ドリス1イズミ ET	モーティー (200H0044)	4 (2： 2)
36	アグリプライス イグナイト ネイアマ イズミ	ギブソン (71H1468)	2 (0： 2)
37	レーガンクレスト イグナイター ドリス1イズミ	ストマティック (200H4144)	4 (2： 2)
計			20 (9： 11)

表2 バイオプシー前後の胚のランク

牛番号	胚番号	胚ステージ	ランク	判別結果	修復培養液	培養時間	修復培養後胚ランク	ガラス化後回復培養液	培養時間	回復培養後胚ランク
2	1	Blast	A	♂	IVD101	4h	A	199 β	1h	A
	2	Blast	A	♂	IVD101	4h	A	199 β	1h	A
	3	Blast	A	♀	IVD101	4h	A	199 β	1h	A
	4	Blast	A	♀	IVD101	4h	A	199 β	1h	A
	5	Blast	A	♂	IVD101	4h	A	199 β	1h	A
	6	Blast	A	♂	IVD101	4h	A	199 β	1h	A
	7	Blast	A	♂	IVD101	4h	A	199 β	1h	A
	8	Blast	A	♀	IVD101	4h	A	199 β	1h	A
	9	Blast	A	♀	IVD101	4h	A	199 β	1h	A
	10	Blast	A	♀	IVD101	4h	A	199 β	1h	A
24	11	Blast	A'	♂	IVD101	4h	A'	199 β	1h	A'
	12	Blast	A'	♂	IVD101	4h	A'	199 β	1h	A'
	13	Blast	A'	♀	IVD101	4h	A'	199 β	1h	A'
	14	Blast	A'	♀	IVD101	4h	A'	199 β	1h	A'
36	15	Blast	A	♀	IVD101	4h	A	199 β	1h	A
	16	Blast	A	♀	IVD101	4h	A	199 β	1h	A
37	17	Blast	A	♂	IVD101	4h	A	199 β	1h	A
	18	Blast	A	♂	IVD101	4h	A	199 β	1h	A
	19	Blast	A	♀	IVD101	4h	A	199 β	1h	A
	20	Blast	A	♀	IVD101	4h	A	199 β	1h	A



融解直後

5分後

30分後

1時間後

写真1 融解後の胚の変化

表3 受胎牛の飼養管理および胚の移植成績並びに分娩状況

受胎牛 番号	胚 番号	品種	産歴	黄体 ランク	飼養形態	移植月日	妊否	分娩月日	妊娠 期間	産子 性別	産子生 時体重
1	1	ホルス	未	good	放飼	H15. 5. 3	+	H16. 1. 31	280	♂	43kg
2	2	ホルス	未	good	放飼	H15. 5. 3	-				
3	3	ホルス	未	ex	放飼	H15. 5. 6	+	H16. 1. 3	249	♀	早産
4	4	ホルス	未	ex	繋留	H15. 5. 6	+	H16. 1. 31	277	♀	48kg
5	5	ホルス	経	fair	フリーストール	H15. 5. 6	+	H16. 2. 10	287	♂	53kg
6	6	ホルス	経	good	フリーストール	H15. 5. 9	+	H16. 2. 9	283	♂	56kg
7	7	ホルス	経	good	フリーストール	H15. 5. 9	+	H16. 2. 10	284	♂	61kg
8	8	ホルス	未	ex	放飼	H15. 6. 5	+	H16. 3. 4	280	♀	44kg
9	9	ホルス	未	ex	放飼	H15. 6. 8	+	H16. 3. 5	278	♀	55kg
10	10	ホルス	未	ex	放飼	H15. 6. 9	+	H16. 3. 14	286	♀	57kg
11	11	ホルス	経	good	フリーストール	H15. 5. 1	-				
12	12	ホルス	経	good	フリーストール	H15. 6. 4	-				
13	13	ホルス	未	good	放飼	H15. 6. 5	+	H16. 3. 14	290	♀	42kg
14	14	ホルス	未	good	放飼	H15. 6. 8	+			♀	流産
15	15	ホルス	未	good	放飼	H15. 6. 6	+	H16. 3. 4	279	♀	
16	16	ホルス	未	good	放飼	H15. 6. 1	-				
17	17	ホルス	経	good	フリーストール	H15. 5. 2	+			♂	流産
18	18	ホルス	経	good	フリーストール	H15. 6. 2	+	H16. 2. 25	275	♂	55kg
19	19	ホルス	未	ex	放飼	H15. 6. 5	+	H16. 3. 7	283	♀	45kg
20	20	ホルス	経	good	フリーストール	H15. 6. 30	+	H16. 3. 28	279	♀	52kg

移植は発情終了後7日目の黄体側子宮角へ1胚移植し、移植後14、35、60日前後に定期的に直腸検査を実施し、卵巢における黄体の消長を観察した。

3 結 果

供試胚20個中雄判定胚は9個、雌胚は11個であった。保存した20個の胚を融解したところ全ての胚で胞胚腔の再形成が確認され、生存胚と判断された(写真1)。20頭の受胎牛へ移植した結果、移植後35日目の直腸検査において妊娠と診断されたものは16頭であった。残りの4頭では移植後およそ14日目に発情が回帰した。また、妊娠と診断したものの内移植後60日目までに発情が確認されたものは2頭で、残りの14頭では妊娠を継続した(表3)。

妊娠を継続した14頭のうち正常分娩したのは13頭、早産したものは1頭である(表3)。

4 考 察

極少量の胚を含むガラス化液を液体窒素に浸漬して-20,000℃/分の速度で超急速にガラス化させる保存方法には、Open plliued strow法³⁾、ゲルロードチップ法⁵⁾、クライオループ法、マイクロドロップ法⁶⁾等があるが、いずれの方法も融解後の生存性は高く野外での応用において実績がある。先端技術等地域実用化研究促進事業(バイオテクノロジー実用化型)で開発したストローカット法も今回の試験で野外応用可能であることが実証された。

融解後の生存率が高かった理由には、細胞透過性が高いエチレングリコール及びジメチルスルフォキシドを主成分とするガラス化液を使用し、かつ、38.5℃に加温した状態で胚を浸漬したことが要因としてあげられる。なお、ガラス化液への浸漬時間では5分以内であれば毒性の影響を受け

にくく⁷⁾、また、融解時に用いる希釈液中のシュクロースの影響は希釈液浸漬時間が10分間を越えると生存率が低下することが示されており⁸⁾、ガラス化液の除去にかかる時間は全体で6分以内に留めたことが生存性を保持する要因の1つであると考えられる。

移植後の受胎性について、20頭中14頭で性周期の延長が確認されたが、この内、2頭において妊娠初期での流産が確認された。初期胚死滅と考えられるが、その原因がガラス化法に由来するものかどうか不明であるが、超音波診断装置等を用いて、早期に胎子心拍動を観察し、例数を重ねて検討したい。

以上のことから、ストローカット法による牛バイオプシー胚のガラス化保存後の生存性は非常に高く、また、移植による受胎率、生産率も高いことが確認された。今後は、普及に移しうる成果として受精卵販売事業に技術導入し、生産者へ利益の還元を図りたい。

参考文献

- 1) 後藤充宏, 鴻野文男, 小鹿野義一 PCR法による牛胚の性判別 徳島県畜産試験場研究報告(1993)34:1~4.
- 2) 後藤充宏, 鴻野文男, 近藤正治 性判別した牛胚の凍結保存 徳島県畜産試験場研究報告(1994)35:1~4.
- 3) 笠井裕明, 福見善之, 後藤充宏 ストローカット法による牛体外受精由来胚のガラス化凍結 徳島県畜産試験場研究報告(2000)41:1~6.
- 4) Vajta G, Rindom N, Perua T, Holm P, Greve T, Callesen H The effect of medium, serum and temperature on in vitro survival of bovine blastocysts after open pulled straw (OPS) vitrification. Theriogenology 1999; 52: 939 ~ 948.
- 5) 富永敬一郎, 浜田由佳子, 有吉哲志 エチレングリコールを用いたゲルローディングチップによる牛体外受精由来胚のガラス化保存. 日本繁殖生物学会講演要旨. 2000; 93: 86.
- 6) 今井昭, 尾形康弘, 志水学, 堀内俊考 マイクロドロプレット法で凍結保存したレシピエント卵子による核移植. 日本繁殖生物学会講演要旨. 2000; 93: 76.
- 7) 立川進, 音井威重, 近藤正治 牛の体外受精(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 1992; 20: 6 ~ 11.
- 8) 笠井裕明, 福見善之, 立川進 ガラス化保存胚の簡易移植技術の開発 徳島県立農林水産総合技術センター畜産研究所研究報告(2003)3