

バイオペシー後の牛胚におけるガラス化保存法の比較

福見 善之, 片山 正敏*, 立川 進

要 約

性判別のためにバイオペシーを行った胚の凍結後の受胎率は無処置の胚に比べて低下することが課題となっていた。しかし、近年、バイオペシー胚にはガラス化保存が有効であることが報告されたことから、本試験では2種類の方法を用いてガラス化保存したバイオペシー胚の生存性及び受胎性について比較検討した。

供試胚は、過剰排卵処置した牛から回収後にマイクロブレードを用いてバイオペシーし、3～5時間 20%FCS 添加 100 μ M β -ME - TCM199 により培養したものをを用いた。ガラス化保存法は (独) 家畜改良センターが開発したグリセリン, エチレングリコール, シュクロース, キシロース, ポリエチレングリコールを組成とする GESX 法及びエチレングリコール, DMSO を組成とする VSED 法を用い、2種類の方法による凍結融解後の生存性及び発育ステージ, ランク間における受胎性について比較検討した。

ガラス化凍結保存・融解後の各方法別の生存率 (GESX : 86.9%, VSED : 74.3%), 受胎率 (GESX 法 : 30.6%, VSED 法 : 35.3%), 発育ステージ間における有意差は認められなかったが、供試胚の発育が進むにつれて受胎率が上昇する傾向が認められた。また、ランク間における受胎率は、両試験区ともに A, A' ランク胚は B ランク胚に比べ有意に高い受胎率であった。

以上の結果から GESX, VSED 法共にバイオペシー胚の保存法として有効であることが確認された。

目 的

牛胚の性判別技術は PCR 法や LAMP 法の応用により実用化段階になっている。胚から性判別用試料をバイオペシー (生検) で採取すると、胚の耐凍性が低下し、その結果、移植後の受胎率が低下する。近年開発されたガラス化保存法は、各試験研究機関によって、胚をガラス化液に浸漬するときの温度や時間などの平衡条件および融解時の耐凍剤の除去法が改良され、胚の生存性が向上した。さらに、超急速ガラス化法も開発され、胚の高い生存性を得られるようになった。

平成10年度にスタートした「受精卵移植普及定着化事業 (雌雄産み分け型) の性判別胚の凍結保存技術の開発」では、共同試験参加機関が「ガラス化保存法」を統一課題として、共通した手法で

取り組んでいる。本稿では、平成13年度¹⁾につづき、平成14年度に行った成績から、雪印・宮崎のガラス化 (VSED) 保存法と (独) 家畜改良センターが開発したガラス化 (GESX) 保存法の比較について報告する。

材料および方法

(1) 供 試 胚

過剰排卵処理を行った牛から回収し、性判別を目的として細胞試料をバイオペシーで採取した胚のうち A, A' および B ランクのを供試した。

(2) 胚の発育ステージ

後期桑実期胚 (CM), 初期胚盤胞期胚 (EB), 胚盤胞期胚 (BL), 拡張期胚盤胞期胚 (ExB) の4発育ステージに分類した。

* 徳島県環境局廃棄物対策課

(3) 性判別胚のランク分け

1) 凍結前（バイオプシー・修復培養後）

次の4段階に分け、A～Bの胚をガラス化凍結保存に供試した。

- A : 胞胚腔の再形成(+), 輪郭が明瞭でほとんど変性部位なし
- A' : 胞胚腔の再形成(+), 輪郭が明瞭で変性部位が10%以下
- B : 胞胚腔の再形成(+), 輪郭が明瞭で変性部位が10%以上
- C : 胞胚腔の再形成(-)

2) 凍結後（凍結融解・培養後）

次の4段階に分け、A～Bを生存胚とし、その一部を移植に用いた。

- A : 凍結前の形態を維持し、肉眼的に発育が認められ、形態が良いもの
- A' : 一部細胞の脱落があるが、肉眼的に発育が認められ、形態が良いもの
- B : 一部細胞の脱落があるが、肉眼的に発育が認められ、形態が難であるもの
- C : 一部細胞の脱落があるが、肉眼的に発育が確認できず、形態は維持されているもの

(4) 性判別胚の凍結保存・融解方法

次の2方法の凍結保存・融解について検討した。

性判別用試料をバイオプシーした胚の凍結・融解前後について、胚の生存性と胚移植後の受胎成績を、胚の発育ステージと胚の状態ランク別に検討した。

1) 雪印・宮崎法によるガラス化 (VSED) 保存法

25%エチレングリコールと25%DMSOを組成とするVSEDガラス化液を用い、バイオプシー胚を50%VSEDガラス化液中に入れ、室温で1分間平衡を行った後、この胚をVSEDガラス化液からストローに封入するまでの処理時間は30秒間にした。

次に、ストローを液体窒素容器の上に2分間おいて予備冷却した後に、液体窒素内に投入した。

融解は、凍結保存胚を37.5℃に保温した4%, 2%グリセリン溶液および無グリセリン融解液に各2分間ずつ入れて行った。次いで、20%FCSと100μM-βMEを含むTCM199培養液内で、3～5時間38.5℃、5%CO₂下の気相条件で培養後、生存性が判定されたBランク以上の胚を移植に用いた。

2) 家畜改良センターの開発したガラス化 (GESX) 保存法

表1に示したように、グリセリン、エチレングリコール、ショ糖、キシロース、ポリエチレングリコールの濃度をそれぞれ変えたGESXガラス化液(VS1, VS2, VS3)を用いて検討した。胚を室温でVS1, VS2でそれぞれ5分間ずつ平衡後、VS3に入れてからストローに封入し、液体窒素に投入した。

VS3から液体窒素投入までの処理時間は1分以内で実施した。融解は、凍結保存胚を室温で0.5Mショ糖と0.25Mショ糖にそれぞれ5分間入れて行った。次いで1)と同様に培養後、生存性を判定し、Bランク以上の胚を移植に用いた。

表1 ガラス化溶液 (組成)

	GLY	EG	Suc	Xyl	PEG (w/v)
VS1	10%		0.1M	0.1M	1%
VS2	10%	10%	0.2M	0.2M	2%
VS3	20%	20%	0.3M	0.3M	3%

注) GLY: グリセリン, EG: エチレングリコール, Suc: 蔗糖, Xyl: キシロース, PEG: ポリエチレングリコール

結果および考察

雪印・宮崎のガラス化 (VSED) 保存法と (独) 家畜改良センターが開発したガラス化保存法 (GESX) について、凍結胚の融解処理後の生存性と受胎性を表2, 3に示した。

表2 凍結保存方法別における融解処理後の生存性

凍結方法	融解胚数	生存胚数	死滅胚数	胚なし	生存率 (%)
VSED	109	81	25	3	74.3
GESX	107	93	14	0	86.9

表3 凍結保存方法別における受胎成績

凍結方法	移植頭数	受胎頭数	受胎率 (%)
VSED	68	24	35.3
GESX	24	19	30.6

胚の生存率は両区共に高く、VSED区が74.3%、GESX区が86.9%であり、有意差はなく、また受胎率においてもVSED:35.3%、GESX:30.6%と有意差は認められなかった。

表4 ガラス化保存前のステージ別受胎率

ガラス化方法	発育ステージ	移植頭数	受胎頭数	受胎率 (%)
VSED	CM	26	7	26.9
	EB	20	9	45.0
	BL	21	7	33.3
	ExB	1	1	100.0
	(計)	68	24	35.3
GESX	CM	22	5	22.7
	EB	19	4	21.1
	BL	16	10	62.5
	ExB	5	0	0
	(計)	62	19	30.6

表5 ガラス化保存前のランク別受胎率

ガラス化方法	ランク	移植頭数	受胎頭数	受胎率 (%)
VSED	A	35	15	42.9 ^a
	A	17	8	47.1 ^a
	B	16	1	6.2 ^b
	(計)	68	24	35.3

ガラス化方法	ランク	移植頭数	受胎頭数	受胎率 (%)
GESX	A	31	13	42.0 ^a
	A'	19	4	21.1 ^{ab}
	B	12	2	16.7 ^b
	(計)	62	19	30.6

(異符号間に有意差あり)

次に、ガラス化保存前の胚の発育ステージと胚の状態のランク別についての受胎率を表4、5に示した。

VSED法ではEBからExBまでの発育ステージの胚の受胎率が高く、GESX法ではBL胚の受胎率が高い傾向であったが、統計上有意差はなかった。また、胚の状態のランク別の受胎率では、VSED法ではA、A'ランク胚の受胎率が、GESX法ではAランク胚の受胎率が、それぞれBランク胚に比較して有意に高かった。

表6 ガラス化保存前と融解処理後のランクの変化による受胎率

ガラス化方法	ランク前～後	移植頭数	受胎頭数	受胎率 (%)
VSED	A～A	13	7	53.8
	～A'	12	4	33.3
	～B	10	4	40.0
	～C	5	1	20.0
	A'～A'	11	7	63.6
	～B	1	0	—
	B～B	14	1	7.1
	～C	1	0	—
	～A	1	0	—
	(計)	68	24	35.3
GESX	A～A	18	9	50.0
	～A'	9	2	22.2
	～B	7	3	42.9
	A'～A'	11	3	27.3
	～B	5	0	—
	B～B	11	2	18.2
	～A	1	0	—
(計)	62	19	30.6	

表7 ガラス化保存前と融解処理後のステージ
の変化による受胎率

ガラス化 方 法	ステージ 前 ~ 後	移植頭数	受胎頭数	受胎率 (%)
VSED	CM ~ CM	9	1	11.1
	~ EB	14	5	35.7
	EB ~ EB	20	8	40.0
	~ BL	3	2	66.7
	~ ExB	1	1	100.0
	BL ~ BL	19	5	26.3
	~ ExB	1	1	100.0
	ExB ~ ExB	1	1	100.0
(計)		68	24	35.3
GESX	CM ~ CM	11	2	18.2
	~ EB	9	3	33.3
	~ BL	6	2	33.3
	EB ~ EB	8	1	12.5
	~ BL	8	2	25.0
	BL ~ BL	15	7	46.7
	~ ExB	2	2	100.0
	ExB ~ ExB	3	0	0
	(計)		62	19

ガラス化保存と融解処理の間で起こる胚の発育ステージと胚の状態のランクの変化、およびその受胎率を表6, 7に示した。

これらについては、VSED法およびGESX法の間には有意差は認められなかった。両方法ともに凍結保存前に胚の状態のランクがA, A'の胚は融解後1ランクまで低下しても、受胎率には影響がなかった。また、融解後から移植までの間に発育が進んだ胚では受胎率が高い傾向があった。

以上の結果から、ガラス化保存液の比較試験では、GESX法とVSED法の間には胚の生存性および移植後の受胎性には有意な差はなかった。

また、性判別試料の採取のために、バイオブシーされた胚の保存法として、これまで、我々の共同試験で用いていたVSED法と同様に、GESX法も有効なガラス化保存法と判断された。

今後は、参加機関の協議により、凍結保存した

胚の受胎性の安定と向上、および融解手法の簡易化を図ることを目的に、①バイオブシーされた牛胚における超急速ガラス化保存法の検討、②ガラス化保存された牛バイオブシー胚の簡易融解手法に関する検討、③VSED法によるガラス化保存前後の性判別の検討が計画されている。

おわりに

本稿は、平成14年度受精卵移植普及定着化事業（雌雄産み分け型）の共同試験成績（グループ1）をまとめ、畜産技術に投稿したものである。本事業には、県単独事業参加機関を含め、下記の7機関*（担当者の敬称略）が参加した。本試験に対してご助言、ご支援して下さった（独）家畜改良センターの的場係長をはじめ関係者に深謝を申しあげる。

※ 岩手県農業研究センター畜産研究所（児玉英樹）、新潟県農業総合研究所畜産研究センター（藤原信子）、鳥取県畜産試験場（大下雄三）、島根県畜産試験場（佐々木恵美）、山口県畜産試験場（小川賀雄）、福岡県農業総合試験場畜産研究所（上田修二）、熊本県農業研究センター畜産研究所（守永正秀）

参考文献

- 1) 藤田達男ほか. 畜産技術 第573 26-29 (2003)
- 2) 飛田府宣ほか. 栃木県酪農研報
- 3) 有安則夫ほか. 岡山総畜セ研報 12: 9 - 12 (2001)
- 4) 野田準一ほか. 静岡県畜試研報 26: 54 - 57 (2000)
- 5) 井上直弘ほか. 第10回西日本胚移植研究会大会講演要旨. 31 (1999)