

## バイオプシー家畜胚の保存技術の確立(第2報)

渡辺晃行<sup>1</sup>，山口大輔，足立憲隆

The preservation of bovine embryos biopsied in Vitro.

Akiyuki WATANABE, Daisuke YAMAGUCHI, Noritaka ADACHI

### 要 約

付加価値をつけた受精卵を生産するためにバイオプシーを行った体外操作胚は、従来の凍結法では生存率および受胎率が低いとされている。この技術的な問題を解決するため、ガラス化保存の研究開発が進められているが、耐凍液に毒性があり、融解後この耐凍液を除去し移植を行わなくてはならない。このため、農家の庭先などでダイレクト移植を行うには改良する必要がある。本試験では初年度に体外操作胚(核移植胚、性判別胚、生体吸引(OPU)体外受精胚)について、アルミプレートガラス化法の検討を行った。今回はと場由来体外受精胚(IVF胚)を新たに加え、ダイレクト移植技術の確立のためストローでの保存を中心に、融解後の胚の個数と紛失率、培養後の生存率を調査した。融解・培養後の生存率について、雌雄判別胚、OPU胚で100%、核移植胚でも78.9%と高い生存率を確認した。初年度と累計するとOPU胚と初年度に対照とした生体由来胚では、融解培養後の生存率がいずれも100%となった。また雌雄判別胚、核移植胚でもそれぞれ92.9%、83.3%と極めて高い生存率を得ることができ、アルミプレートガラス化法がバイオプシー胚の保存に有効であることが示唆された。

キーワード：体外操作胚，ガラス化保存，アルミプレートガラス化法，生存率

### 緒 言

近年、胚移植への農家の関心が高まり、牛胚のバイオプシーによる雌雄判別胚などの付加価値をつけた胚の需要が増加している。しかしながら、現在一般に普及している凍結方法は、それらの体外操作胚では生存性、受胎率で十分な結果が得られていない。これは胚への物理的なダメージと体外培養などで使用される試薬や血清等の影響によるものと思われる(全国平均の受胎率：体外受精凍結胚36.0%、雌雄判別凍結胚38.9%)<sup>1)</sup>。

これらの技術的な問題を解決するために最近ではガラス化保存<sup>2)</sup>、超急速ガラス化保存<sup>3)</sup>、マイクロドロップレット法<sup>4)</sup>などが開発されている。しかし、ガラス化保存に使われる耐凍液は毒性があり、融解後この耐凍液を除去し移植を行わなくてはならない。このため、農家の庭先などでダイレクト移植を行うには改良する必要がある。

本試験では初年度に体外操作胚(核移植胚、性

判別胚、体外受精胚)について、Dinnyesらが報告した The solid surface vitrification(SSV)法<sup>5)</sup>の変法であるアルミプレートガラス化法の検討を行った。凍結保存した黒毛和種胚を融解、培養後の胚の生存率・受胎率を調査した結果非常に高い生存率を確認できた<sup>6)</sup>。今回はと場由来体外受精胚を新たに加え、ガラス化保存胚のダイレクト移植技術の確立のため移植用ストローでの保存を中心に試験を行い、従来のクライオチューブ(以下、チューブ)での保存と比較した場合の胚の紛失率を調査した。融解後確認できた胚は、培養後の生存率を調査した。

### 材料および方法

#### 1 胚の種類

##### 1) 雌雄判別胚

場内および野外採卵で回収した正常胚(AランクおよびBランク胚)を使用した。それらをマイクロマニピュレーションを用いてバイオプシーし培養した。培養後、生存が確認

1 現 茨城県農林水産部畜産課

された胚をガラス化保存に用いた。

2) OPU(生体卵子吸引)による体外受精胚

経膈プローブによる卵巣からの卵子吸引法により卵子を回収した。体外授精し発生培養を7日間行い、胚盤胞を形成したAランク胚をガラス化保存に用いた。

3) と畜場卵巣由来体外受精胚(IVF胚)

と場から持ち帰った卵巣から卵子を吸引し、OPUした胚と同様に体外授精、培養し、ガラス化保存に用いた。

4) 核移植胚

と畜場由来卵巣より吸引した卵子を18時間成熟培養後、除核、細胞核注入し7日間培養後に胚盤胞を形成したAランク胚をガラス化保存に用いた。

2 ガラス化方法

アルミプレートガラス化法による保存を行った。この方法は従来のガラス化保存より冷却速度が速く、より胚へのダメージが少ない方法である。

平衡液：4%エチレングリコール(EG)+20%FCS加TCM199A(G1BC0)

ガラス化液：35%EG+5%ポリビニールピロリドン(PVP)+0.4Mトレハロース(Tre)加TCM199A

融解液：0.4MTre+20%牛胎児血清(FCS)加TCM199A

供試胚を平衡液に入れ3分間平衡後、ガラス化液に20秒入れ液体窒素で冷やされたアルミプレート上にピペティングにより胚の入っているドロップを落とした。できたドロップは融解液の入っている移植用ストローに入れ、シーラーで封印し液体窒素中で保存した(図1)。一部の受精卵は体外操作の都合とストロー保存と紛失率を比較するため、マイクロドロップレット後チューブに入れ液体窒素中で保存した。

3 融解及び培養

保存ストローは30℃の温水に入れて融解、胚の有無を確認した後培養を行った。保存チューブはガラス化胚を再度アルミプレート上に取り出し、シャーレ内で融解した後培養を行った。一部の胚は移植試験に供した。

培養はIVD101(機能性ペプチド研究所)を用いて24時間、あるいは10,11%FCS加TCM199Aを用いて数時間、38.5℃、5%CO<sub>2</sub>、95%空気の気相条件で培養を行った。

結果および考察

融解後の胚の個数と紛失率について、表1に示した。対照となるチューブ保存では9個融解し紛失数は1個であった(紛失率11.1%)。それに対し、ストロー保存では46個融解し、紛失数が26個(紛失率56.5%)となった。ストロー保存で紛失数が著しく多くなった原因は、融解時にストローが破裂するという現象が多発したためであり、マイクロドロップレットをストローに入れる際に気化した液体窒素が流入し再度液化したものを封入してしまったためと考えられる。対策として、液体窒素が流入しにくいアルミプレート形状の開発を検討する。また試験的にストローの封印をシーラーではなく、プラスチック栓にしたところ破裂が生じなかったため、これについても検討していく。

確認された胚の培養後の生存率について、雌雄判別胚では5個培養し、5個を確認した(生存率100%)。OPU胚では2個培養し、2個(生存率100%)、IVF胚では6個培養し、4個(生存率66.7%)、核移植胚では19個培養し、15個の生存をそれぞれ確認した(生存率78.9%)。

初年度の結果と累計したものを表2に示した。OPU胚と初年度に対照とした過剰排卵処理による生体由来胚では、融解培養後の生存率がいずれも100%となった。また雌雄判別胚、核移植胚でもそれぞれ92.9%、83.3%と極めて高い生存率を得ることができ、アルミプレートガラス化法がバイオプシー胚の保存に有効であることが示唆された。また今回から行ったIVF胚では66.7%とやや低い生存率となったが、上でも述べたようにストロー融解時の破損による培養個数自体の減少が影響したことも考えられるので、今後も調査を継続していく。

ダイレクト移植試験については、一部の胚で現在経過観察中であり、今後も引き続き検討を行っていく。

参考文献

1) 農林水産省生産局(2004). 家畜受精卵移植普及定着化事業全国推進会議平成16年度資料  
2) Saito N et al.(1994). Effect of sugars addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced in vitro. Theriogenology 41:1053-1060(1994)

- 3) 濱田由佳子ら(2001). ゲル・ローディング・チップを用いたウシ胚のガラス化保存. 家畜人工授精. 205:8-14
- 4) Martino et al.(1996). Biol Reprod.54:1059-1069
- 5) Dinnyes, A. et al(2000). Biology of Reproduction. 63:513-518
- 6) 渡辺晃行ら(2005). バイオプシー家畜胚の保存技術の確立(第1報). 茨城県畜産センター研究報告第38号:59~62

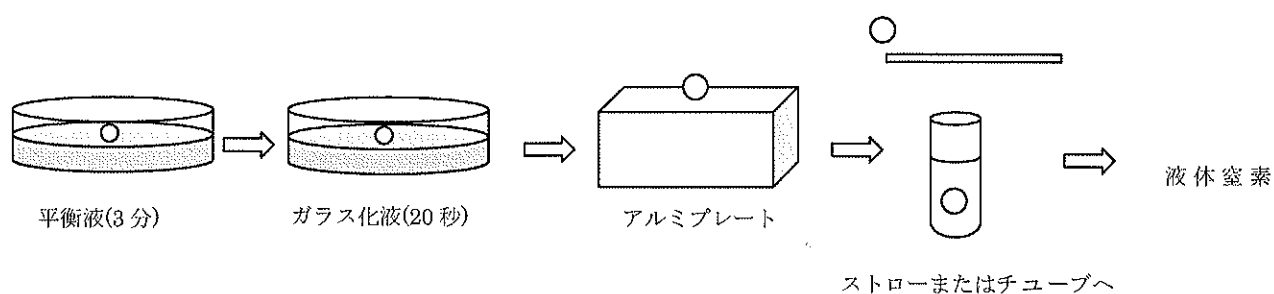


図1 アルミプレートガラス化方法

表1 保存容器の違いによるガラス化胚紛失率への影響

	融解数	確認数	紛失数	紛失率(%)
チューブ保存	9	8	1	11.1
ストロー保存	46	20	26	56.5

表2 ガラス化保存・融解後の生存率(平成16,17年度累計)

	融解数	培養数	生存数	生存率(%)
雌雄判別胚	14	14	13	92.9
OPU胚	7	7	7	100
IVF胚	28	6	4	66.7
核移植胚	78	66	55	83.3
対照胚(H16)	13	5	5	100