

## バイオプシー家畜胚の保存技術の確立(第3報)

鈴木亘・山口大輔・足立憲隆

The preservation of bovine embryos biopsied in Vitro

Wataru SUZUKI, 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が必要である。本試験では、ガラス化保存した体外受精胚では融解後良好な生存率であること、胚をストローに保存する場合、胚を紛失する割合が非常に高いことが分かった。今回は、ガラス化保存したと場由来体外受精胚(IVF胚)の試験数を増やして、融解後の胚の紛失率の改善および培養後の生存率の調査を実施したところ、ストロー内への窒素ガス流入を防ぐことで胚紛失率は19.2%に改善され、融解後のIVF胚の生存率は80.0%であった。また、ガラス化保存した生体卵子吸引体外受精胚(OPU胚)のダイレクト移植を実施したところ、移植した1頭が受胎し正常に分娩した。

キーワード：体外受精胚、ガラス化保存、アルミプレートガラス化法、ダイレクト移植

### 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、現在一般的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38.6%)<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。

まず、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でガラス化保存した体外操作胚(核移植胚、性判別胚、OPU胚、IVF胚)で、融解後の良好な生存性が確認できた<sup>6)</sup>。つぎにガラス

化保存胚のダイレクト移植技術の確立のため、IVF胚を移植用ストローで保存し、融解後の胚の紛失率および生存率を調査したところ、従来のクライオチューブ(以下、チューブ)による保存と比較して融解後の生存率は変わらないが胚の紛失率(56.5%)がチューブの約5倍と非常に高いことがわかった<sup>7)</sup>。今回は、ガラス化保存IVF胚の試験数を増やして融解後の胚の紛失率の改善および培養後の生存率の調査を実施するとともに、ガラス化保存したOPU胚のダイレクト移植を実施した。

### 材料および方法

#### 1 胚の種類

- 1) 生体卵子吸引による体外受精胚(OPU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。
- 2) と場卵巣由来由来体外受精胚(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。

## 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 (GIBCO)

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、シーラーで封じし液体窒素中で保存した<sup>7)</sup>。一部の受精卵は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 融解および培養

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だし、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1VD101(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。

## 4 ガラス化保存OPU胚のダイレクト移植

受胚牛は当センターで繋養している黒毛和種および交雑種の経産牛で、プロスタグランジンF<sub>2α</sub>で発情誘起した。発情終了後7日目にガラス化保存したOPU胚をダイレクト移植した。妊娠診断は移植後40日目に超音波診断装置で行った。

### 結果および考察

ガラス化保存IVF胚50個を融解した時の紛失胚数は、ストロー保存で26個中5個(19.2%)、チューブ保存で24個中2個(8.3%)、合計7個(紛失率14.0%)であった(表1)。昨年度のストロー保存の紛失率56.5%<sup>7)</sup>に比べて紛失率が改善された要

因としては、ストローの入り口近くまで融解液を満たすことでストロー内への窒素ガス流入を防ぎ、融解時のストロー破損が減ったことが考えられる。しかし、依然高いレベルにある紛失率を改善するためには、胚を含むガラス化ドロップを確実にストロー内に保存する技術を検討する必要がある。

ガラス化保存したIVF胚を融解したところ、40個中32個の胚で生存が確認でき、生存率は80.0%であった(表2)。昨年度のIVF胚の生存率は66.7%<sup>7)</sup>であったが、培養個数を増やして継続調査したところ、IVF胚の生存率は78.3%と大幅に改善した。平成16~18年度に実施した雌雄判別胚、OPU胚、IVF胚、核移植胚のガラス化保存・融解後の平均生存率は83.5%であり(表2)、胚の種類に関係なく高い生存性を確認している。

ガラス化保存したOPU胚を6頭にダイレクト移植したところ、1頭で受胎を確認し正常に分娩した。ストローによるガラス化保存胚は、耐凍液が少量であるためダイレクト移植しても受胎することが確認できた。今後はダイレクト移植によるガラス化保存胚の受胎率を調査し、受胎率の向上に関するガラス化保存胚の移植方法を検討する。

アルミプレートガラス化法による胚のガラス化保存は、胚の種類によらず高い生存性が確保でき、ストロー内保存胚のダイレクト移植で受胎・分娩が確認されたことで、庭先でガラス化バイオプシー胚のダイレクト移植が実施できる可能性が示唆された。

### 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
- 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) Matrino *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

7) 渡辺晃行ら(2006).バイオプシー家畜胚の保  
存技術の確立(第2報).茨城県畜産センター研究  
報告第39号:17-19

表1 保存容器の違いによるガラス化胚紛失率への影響(平成17,18年度)

		融解数	確認数	紛失数	紛失率(%)
ストロー保存	平成18年度	26	21	5	19.2
	平成17年度	46	20	26	56.5
チューブ保存	平成18年度	24	22	2	8.3
	平成17年度	9	8	1	11.1

表2 ガラス化保存・融解後の生存率(平成16～18年度累計)

	融解後	培養数	生存数	生存率(%)
対照胚(平成16年度)	13	5	5	100.0
IVF胚 (平成18年度)	71 (43)	46 (40)	36 (32)	78.3 (80.0)
核移植胚	78	66	55	83.3
雌雄判別胚	14	14	13	92.9
OPU胚	7	7	7	100.0