

バイオプシー家畜胚の保存技術の確立（第1報）

渡辺晃行，山口大輔，足立憲隆

The preservation of bovine embryos biopsied in Vitro.

Akiyuki Watanabe, Daisuke Yamaguchi, Noritaka Adachi

要 約

バイオプシーなどを行なった体外操作胚の凍結保存後の生存率および受胎率は低いとされている。このためこれらの技術的な問題を解決するためにガラス化保存法の研究開発が進められつつあるが、これに使われる耐凍液は毒性が強く、使用する際には融解後この耐凍液を除去し移植を行なわなくてはならず農家などの庭先での応用のためには技術の簡易化が必要である。今年度は体外操作胚のガラス化保存および融解後の生存性について検討した。ガラス化方法は従来のガラス化保存と比較して冷却速度が速く、より胚へのダメージが少ない方法であるアルミプレートガラス化法を用いた。ガラス化胚保存後融解し、培養した後生存を確認できた胚は雌雄判別胚で8個（生存率88.9%）、体外受精胚で5個（生存率100%）、核移植胚で40個（生存率85.1%）であった。対照胚の生存数は5個（生存率55.6%）であり体外操作胚の全てにおいて85%以上の高い生存率を示し、アルミプレートガラス化保存がバイオプシーなどの体外操作をうけた胚の保存に有効であることが示唆された。

キーワード：ガラス化保存，体外操作胚，生存率

緒 言

現在、胚操作技術の向上によ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が農家で望まれている。一方、体外受精胚や生体卵子吸引による登録可能な体外受精胚などの体外操作胚の需要も今後は増加するものと思われる。しかしながら、現在一般に普及している凍結方法はバイオプシーなどを行なった体外操作胚では生存性、受胎率で十分な結果が得られてない。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%）¹⁾。

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²⁾、超急速ガラス化保存³⁾、マイクロドロップレット法⁴⁾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なわなくてはならない。このため、農家などの庭先でダ

イレクト移植を行なうには改良する必要がある。

体外操作胚（核移植胚，性判別胚，体外受精胚）のガラス化保存法による生存率・受胎率の検討を行なうとともにガラス化保存法のダイレクト移植技術の確立を図る。

材料および方法

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。体外受精し発生培養を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) 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。

4) 対照

過剰排卵処理により回収された生体内由来胚の A ランク胚および B ランク胚をガラス化保存に用いた。

これらの胚を使用し融解後、胚が確認できた個数、確認できた胚の培養後の生存個数を調査した。

ガラス化方法

アルミプレートガラス化法⁹⁾による保存を行なった。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

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 (GIBCO)

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、液体窒素中で保存した(図 1)。

融解は 30℃の温水に保存ストローを入れ、融解を確認後 100 μM βメルカプトエタノール加 20%TCM199 (GIBCO) を用いて 38.5℃, 5% CO₂, 95%空気の気相条件で 24 時間培養を行なった。

結果および考察

アルミプレートガラス化法でガラス化保存後融解し、個数と培養後の生存数を調べた。雌雄判別胚では不明数 0 個、培養により生存を確認できた胚は 8 個 (生存率 88.9%)、体外受精胚は 5 個融解し不明数 0 個、培養後生存確認できた胚は 5 個 (生存率 100%)、核移植胚は 47 個融解し不明数 0 個、生存数は 40 個 (生存率 85.1%) であった。対照胚は 9 個融解し不明数が 4 個、生存数は 5 個 (生存率 55.6%) であった。これらの結果より体外操作胚の全てにおいて生存率は 85%以上であり、アルミプレートガラス化法がこれら体外操作

胚の保存に有効であることが示唆された。また対照胚は 9 個融解を行なったが 4 個は融解時にストロー内での胚の存在が確認できなかった。胚の存在が確認出来た 5 個の胚については全て生存していた (表 1)。本法によるガラス化保存はドロップにした後の胚の確認が不可能で、操作中に胚を紛失することが懸念される。そのため今後は不明胚数の低下の検討が必要である。また、これまでの試験では融解後培養を行なって生存が確認できたが、今後はダイレクト移植のためのストロー内希釈液等の検討を行い融解後のダイレクト移植の検討を行っていく。

引用文献

- 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

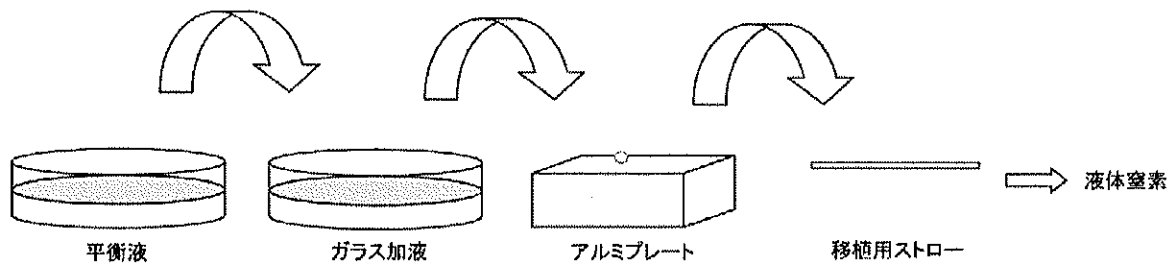


図1 アルミプレートガラス化方法

表1 ガラス化保存・融解結果

	ガラス化個数	融解個数	不明個数	生存数 (率)
雌雄半別胚	14	9	0	8 (88.9%)
体外受精胚	12	5	0	5 (100%)
核移植胚	47	47	0	40 (85.1%)
対照胚	16	9	4	5 (55.6%)