

バイオプシー家畜胚の保存技術の確立

赤上正貴・山口大輔¹⁾・足立憲隆

The preservation of bovine embryos biopsied in Vitro

Masataka AKAGAMI, Daisuke YAMAGUCHI, Noritaka ADACHI

要 約

バイオプシーを施した性判別胚（バイオプシー胚）等の体外操作胚は、従来の緩慢凍結法では生存率および受胎率が低いため、保存後の生存性が極めて高いガラス化保存の応用が報告されている。そこで本研究では、アルミプレートガラス化法（固体表面ガラス化）によるガラス化保存の有効性および本法によるガラス化胚のダイレクト移植の可能性を検討した。本法によりガラス化したバイオプシー胚、生体卵子吸引における体外受精胚（OPU-IVF胚）、と場卵巣由来体外受精胚（と場-IVF胚）および核移植胚の階段希釈加温後の生存率は、95.0%、91.3%、88.9%および83.3%で非常に高かった。ガラス化バイオプシー胚の加温後の生存率およびと場-IVF胚の加温後の透明帯脱出率はプログラムフリーザーによる緩慢凍結胚の融解後の生存率および透明帯脱出率よりも有意に高かった（ $p < 0.005$, $p < 0.05$ ）。ガラス化胚の移植試験では、階段希釈加温したOPU-IVF胚を保存液とともに移植用ストローに再封入して移植したところ受胎率は46.2%であった。一方、ストロー内加温したOPU-IVF胚をダイレクト移植したところ受胎率は16.7%であった。

本研究により、アルミプレートガラス化法は様々な体外操作胚に対し有効性が高いことが明らかとなった。また、本法によるガラス化胚のダイレクト移植で子牛生産は可能であったが、階段希釈加温後のガラス化胚を移植した方が受胎率は良く、より効率的にガラス化胚から子牛生産をするには実験室内での作業が必要となる。

キーワード：アルミプレートガラス化法、固体表面ガラス化、体外操作胚、ダイレクト移植

緒 言

近年、バイオプシー胚や体外受精胚の胚移植による高能力牛の生産により収益向上を図る農家が増加している。しかしながら、広く普及しているプログラムフリーザーを用いて徐々に冷却しながら胚細胞内を脱水し耐凍剤に置換して凍結する方法では、十分な生存率および受胎率が得られていない^{1,2,3)}。これは胚への氷晶による物理的ダメージや体外培養などに用いる試薬や血清等の影響に起因すると考えられている^{4,5)}。

この技術的な問題を解決するために1985年に報告された哺乳動物細胞のガラス化保存法⁶⁾が注目され、VSED法⁷⁾および家畜改良センターが開発したGESX法のようにガラス化液の組成に関する研究や超急速ガラス化法と称されるMicrodrople

ts (MD) 法^{8,9)}、Gel Loading-Tips法¹⁰⁾、Cryotop法¹¹⁾ およびOpen Pulled Straw法¹²⁾ 等のガラス化研究が報告されている。しかし、ガラス化保存に使用する耐凍液には毒性があるため⁵⁾、畜産現場でダイレクト移植するにはストロー内でガラス化液を除去する必要がある、ガラス化胚移植の簡易化が不可欠である。

ガラス化胚のダイレクト移植を念頭に置き、我々は固体表面ガラス化の変法であるアルミプレートガラス化法を考案した。牛¹³⁾ および豚¹⁴⁾ の成熟卵母細胞、山羊の卵母細胞および受精卵¹⁵⁾ ならびにマウスの受精卵¹⁶⁾ およびバイオプシー胚¹⁷⁾ 等で固体表面ガラス化の有効性が示されている。

本研究では、アルミプレートガラス化法が牛体外操作胚（バイオプシー胚、OPU-IVF胚、と場-IVF胚および核移植胚）のガラス化保存に有効かどうか検討した。また、ガラス化胚の移植用ストロー内加温の条件検討および移植試験を実施し、ダ

1) 茨城県北家畜保健衛生所

イレクト移植の可能性を検討したので報告する。

材料および方法

1 供試胚の種類および作成方法

1) 体内受精胚

当センターで飼養する黒毛和種供卵牛から定法に従って採取したAランク胚盤胞期胚を試験に供した。

2) バイオプシー胚

当センターで飼養する黒毛和種供卵牛から定法に従って採取したAランク胚盤胞期胚の内部細胞塊を除く1/4程度をマイクロマニピュレータに装着したバイオカッター (FEATER) で切断後、流動パラフィンで覆った1胚あたり10 μ lの裸化卵子培養液 (IVD101; 機能性ペプチド研究所) ドロップにより38.5 $^{\circ}$ C, 5%CO₂および5%O₂の気相条件で修復培養を行った。培養後、切断部分が修復され腔を形成した胚を試験に供した。

3) と場卵巢由来体外受精胚 (と場-IVF胚)

食肉処理場で採取した卵巢の小卵胞 (5mm以下) から18G注射針をつけたシリンジで卵丘細胞-卵子複合体を吸引した。卵子の周囲に卵丘細胞が密に付着した卵子を10%牛胎児血清 (FBS:GIBCO) 添加TCM199 (GIBCO) で38.5 $^{\circ}$ C, 5%CO₂の気相条件で20時間成熟培養した。県有種雄牛精液を媒精液 (IVF100:機能性ペプチド研究所) で洗浄後、IVF100で希釈し精子濃度を10⁷/mlに調整した。成熟卵子をIVF100で洗浄後、流動パラフィンで覆った調整済み精子液ドロップに導入した。6時間の媒精後、ヒアルロニダーゼ液中でのピペッティング操作により卵丘細胞を剥離し、流動パラフィンで覆った1胚あたり10 μ lのIVD101ドロップにより38.5 $^{\circ}$ C, 5%CO₂および5%O₂の気相条件で7日間の発生培養後、胚盤胞を形成したAランク胚を試験に供した。

4) 生体卵子吸引による体外受精胚 (OPU-IVF胚)

超音波診断装置 (アロカ, SSD-900SE) に採卵針ガイドを装着した同機専用の経膈プローブ (7.5MHz) を接続し、吸引ポンプ (富士平工業) を接続した採卵針 (ミサワ医科工業, ディスポーザブル採卵針) を経膈プローブに装着し、尾椎硬膜外麻酔を施した供試牛の卵巢から卵子を吸引回収した。と場-IVF胚と同

様に成熟培養および体外受精を行い、流動パラフィンで覆った1胚あたり10 μ lのIVD101ドロップにより38.5 $^{\circ}$ C, 5%CO₂および5%O₂の気相条件で7日間の発生培養後、胚盤胞を形成したAランク胚を試験に供した。

5) 核移植胚

食肉処理場で採取した卵巢の小卵胞 (5mm以下) から18G注射針をつけたシリンジで卵丘細胞-卵子複合体を吸引した。卵子の周囲に卵丘細胞が密に付着した卵子を10%FBS添加TCM199で38.5 $^{\circ}$ C, 5%CO₂の気相条件で18~24時間成熟培養後、ヒアルロニダーゼ液中でのピペッティング操作により卵丘細胞を剥離し、卵子を裸化した。第一極体を放出し、細胞質の均一なもののみを除核した。レシピエント卵子とドナー細胞を融合用電極2本で軽く挟み電氣的融合を行った。活性化処理後、流動パラフィンで覆った1胚あたり10 μ lのIVD101ドロップにより38.5 $^{\circ}$ C, 5%CO₂および5%O₂の気相条件で7日間の発生培養後、胚盤胞を形成したAランク胚を試験に供した。

2 ガラス化保存

1) アルミプレートガラス化法

本研究では、Dinnyesら¹³⁾が報告した固体表面ガラス化法 (Solid Surface vitrification) を応用したアルミプレートガラス化法によりガラス化保存を実施した。この方法は超急速ガラス化法のひとつで、使用するガラス化液が微量なMD法の利点と熱伝導率の高いアルミニウム表面を用いることにより急速にガラス化するため胚へのダメージが少ない。また、MD法のように直接液体窒素に触れることがなく、アルミプレートは滅菌して使用するため、クリーンベンチ内で作業することで衛生的に家畜胚をガラス化することが可能である。使用する資材 (図1) は、発泡スチロール容器、アルミプレート容器、液体窒素およびガラスピペットである。

2) 試薬の組成

ガラス化液: 35%EG+5%PVP+0.4MTre加TCM199A

平衡液: 4%EG+20%FBS加TCM199A

加温液: 0.4MTre+20%FBS加TCM199A

洗浄液: 20%FBS加TCM199A

EG: エチレン・グリコール (Wako), PVP: ポリビニルピロリドン (SIGMA), Tre: トレハロース (SIGMA)

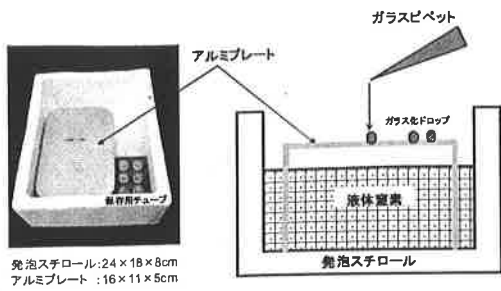


図1 アルミプレートガラス化法に用いる器具および模式図(断面)

3) ガラス化方法

発泡スチロールの容器に箱形アルミプレートの底面が液体窒素液面から1cm程度出るように浸して冷却しておく(図1)。洗浄液中の供試胚を平衡液で3分間平衡後、ガラス化液に20秒浸漬して急速脱水し、 $-150\sim-180^{\circ}\text{C}$ に冷却されているアルミプレート上に供試胚を含んだガラス化液をピペティングにより滴下して、ガラス化ドロップを作成した(図2)。ガラス化ドロップは冷却したクライオチューブ(CORNING)内に入れるか、あらかじめ加温液を充填凍結した0.25ml移植用ストロー(1MV, ZA475)の先端部にガラス化ドロップを納め、加熱シーラー(富士インパルス社製ポイントシーラーES-10)またはストロー用キャップ(100JONCS)で封をして、液体窒素内で保存した。

なお、従来凍結法を対照とした。供試胚を10%EGを含む20%FBS加ダルベッコリン酸緩衝液(D-PBS:GIBCO)に0.1MTreを添加した凍結保存液で平衡後、移植用ストローに吸引封入した。プログラムフリーザー(富士平工業, ET-1N)を用い、 -7°C のメタノール(関東化学)冷媒中にストローをセットし、2分間経過後

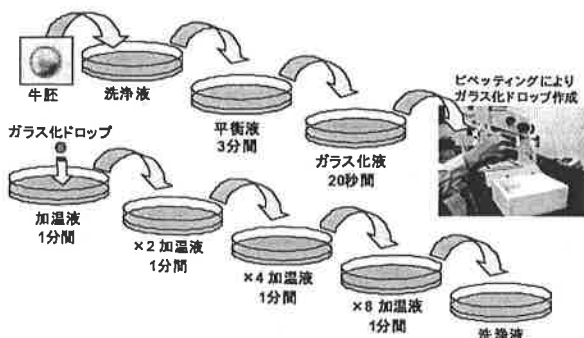


図2 ガラス化方法(上段)および段階希釈加温方法(下段)

強制植氷した。植氷8分間経過後から $-0.3^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の冷却速度で -32°C まで緩慢冷却後、液窒素内での保存した。

3 ガラス化胚の保存容器の違いによる胚紛失率

アルミプレートガラス化法によりと場-IVF胚を含むガラス化ドロップを作成した。クライオチューブに保存したガラス化ドロップは、液体窒素で冷却したアルミプレート上に一度取り出し、冷却したピンセットで挟んで加温液の入ったシャーレに投入した。また、移植用ストローに保存したガラス化ドロップは、移植用ストローを液体窒素から取り出し空中で10秒間保持後、 37°C の温湯で加温しストローから加温液をシャーレに取り出した。実体顕微鏡下でガラス化胚の有無を確認し、各保存容器での胚紛失率を算出した。

なお、加熱シーラーで封入した移植用ストロー内保存については、19G注射針をストローの先端部に穿刺してから同様に加温する方法での胚紛失率を算出した。

4 体外操作胚におけるガラス化保存の有効性

1) 加温後のガラス化胚の生存率

供試胚(バイオプシー胚, OPU-IVF胚, と場-IVF胚, 核移植胚および体内受精胚)をアルミプレートガラス化法によりガラス化保存した。各ガラス化胚は、図2に示す段階希釈加温法にて加温した。加温液を8倍まで2倍段階希釈し 37°C で順次各1分間加温後、洗浄液に導入し培養に供した。加温した供試胚は、流動パラフィンで覆った1胚あたり $10\mu\text{l}$ のIVD101ドロップにより 38.5°C 、5% CO_2 および5% O_2 の気相条件で24時間培養した。培養後、発育している胚および正常な形態を保っている胚を生存とみなし、生存率を算出した。

2) 加温後のガラス化胚、融解後の凍結胚の生存率および透明帯脱出率の比較

バイオプシー胚, と場-IVF胚および体内受精胚をアルミプレートガラス化法または従来凍結法により保存した。ガラス化胚は段階希釈加温法により加温し、凍結胚は移植用ストローを空中で10秒間保持後、 37°C の温湯中に投入して融解し、保存液(20%FBS加D-PBS)に導入した。各供試胚は、流動パラフィンで覆った1胚あたり $10\mu\text{l}$ のIVD101ドロップにより

38.5℃, 5%CO₂および5%O₂の気相条件で24~72時間培養し, 生存率および透明帯脱出率を比較した。

5 移植用ストロー内加温の条件検討

1) 加温液中Tre濃度および加温時間による生存率の比較

一段階希釈に用いる加温液中Tre濃度を検討するために, 加温液中のTre濃度を0.1M, 0.2M, 0.3Mおよび0.4Mに調整し, ガラス化と場-IVF胚を各加温液で37℃, 5分または15分間加温した。各供試胚は, 流動パラフィンで覆った1胚あたり10μlのIVD101ドロップにより38.5℃, 5%CO₂および5%O₂の気相条件で24~72時間培養し, 生存率および透明帯脱出率を比較した。

2) ストロー内加温温度による生存率および透明帯脱出率の比較

ガラス化したと場-IVF胚をあらかじめ0.3M Tre濃度に調整した加温液を凍結充填した移植用ストローに封入し, 20℃, 30℃および37℃温湯中で1~2分間加温し, 流動パラフィンで覆った1胚あたり10μlのIVD101ドロップにより38.5℃, 5%CO₂および5%O₂の気相条件で24~72時間培養し, 生存率および透明帯脱出率を算出した。また, ストロー内への封入作業が胚の生存性に与える影響を検討するために, 37℃の温湯中でストロー内加温後すぐに供試胚を加温液の入ったシャーレに取り出し, 階段希釈加温を行ってから同様に培養し, 生存率および透明帯脱出率を算出した。

6 ガラス化胚の移植試験

当センターで繋養する黒毛和種および交雑種または野外酪農家で繋養するホルスタイン種を受卵牛として用いた。プロスタグランジンF_{2α}による発情誘起または自然発情後7日目に階段希釈加温したガラス化OPU-IVF胚, と場-IVF胚または核移植胚を保存液とともに移植用ストローに再封入して受胎牛に移植した。またダイレクト移植として, 0.3MTre濃度に調整した加温液を凍結充填した移植用ストロー内にガラス化OPU-IVF胚を封入し, 空中で10秒間保持後, 37℃の温湯中で1分間加温して受胎牛に移植した。移植後40日目に超音波診断装置を用いて妊娠診断を実施した。

結 果

1 ガラス化胚の保存容器の違いによる胚紛失率
ガラス化胚の保存容器の違いによる胚紛失率を表1に示した。ガラス化胚をクライオチューブで保存した場合の胚紛失率は作業員Aが9.1%, 作業員Bが8.8%および作業員Cが2.8%で平均5.1%であった。

ストロー保存では加熱シーラー封入での胚紛失率が平均41.9%で非常に高かった。ストロー内に混入した液体窒素が加温時に気化してストローが破裂するため, ストロー用キャップでの封入を試みたが胚紛失率(37.7%)の改善はみられなかった。ガラス化胚を封入した加温前のストローに注射針を穿刺して加温したところ, 胚紛失率は3.8%でクライオチューブ保存と同等のレベルに下げられた。

表1 ガラス化胚の保存容器の違いによる紛失率の比較

		作業員A	作業員B	作業員C	平均紛失率(%) 供試胚数(合計)
チューブ保存	紛失率(%)	9.1	8.8	2.8	5.1
	供試胚数	33	34	108	175
加 熱 ¹⁾ シーラー	紛失率(%)	56.5	34.6	—	41.9
	供試胚数	46	71	—	117
ストロー保存	キャップ ²⁾	—	37.7	—	37.7
	供試胚数	—	53	—	53
注射針 ³⁾ 穿刺	紛失率(%)	—	—	3.8	3.8
	供試胚数	—	—	53	53

1): 富士インパルス社製ポイントシーラーES-10, 2): 100JONCS, 3): テルモ社製19G-1/2"

2 体外操作胚におけるガラス化保存の有効性
アルミプレートガラス化法によりガラス化した体外操作胚および体内受精胚の階段希釈加温後24時間の生存率を表2に示した。バイオプシー胚, OPU-IVF胚, と場-IVF胚および核移植胚の生存率は, 95.0%, 91.3%, 88.9%および83.3%であり, 体内受精胚の生存率95.0%と比較して有意な差は認められなかった。

また, 従来凍結法で凍結保存したバイオプシー胚, と場-IVF胚および体内受精胚の融解後の生存率および透明帯脱出率を表3に示した。凍結保存したバイオプシー胚の融解後の生存率およびと場-IVF胚の融解後の透明帯脱出率はガラス化保存した時より有意に低かった (p<0.05, p<0.05)。また, 凍結保存したバイオプシー胚の融解後の生存率はと場-IVF胚および体内受精胚の融解後の生存率より有意に低く (p<0.05), 凍結保存したと場-IVF胚の融解後の

透明帯脱出率は体内受精胚の融解後の透明帯脱出率より有意に低かった ($p < 0.05$)。体内受精胚ではガラス化保存および従来凍結保存胚の加温融解後の生存率および透明帯脱出率で有意差は認められなかった。

表2 加温後のガラス化体外操作胚および体内受精胚の生存率

胚の種類	供試胚(個)	生存胚数(個)	生存率(%)
バイオプシー胚	20	19	95.0
OPU-IVF胚	23	21	91.3
と場-IVF胚	54	48	88.9
核移植胚	66	55	83.3
体内受精胚	20	19	95.0

※ 5%O₂・5%CO₂気相, 38.5°Cで24時間培養培養後, 正常な形態を保持しているものを生存胚とした

表3 加温後のガラス化胚および融解後の凍結胚の生存率の比較

胚の種類	保存方法	供試胚数	生存胚数(%)	透明帯脱出胚数(%)
バイオプシー胚	ガラス化 ¹⁾	20	19(95.0) _A	—
	従来凍結 ²⁾	20	11(55.0) _{B,a}	—
と場-IVF胚	ガラス化	54	48(88.9)	41(75.9) _c
	従来凍結	60	47(42.6) _b	33(55.0) _d
体内受精胚	ガラス化	20	19(95.0)	17(85.0)
	従来凍結	20	17(85.0) _b	16(80.0) _c

1):アルミプレートガラス化法 異符号間に有意差あり
 2):プログラムフリーザーによる緩慢凍結法 A:B, $p < 0.005$
 a:b, c:d, $p < 0.05$

3 移植用ストロー内加温の条件検討

加温液中Tre濃度および加温時間の違いによる生存胚数の比較を図3に示した。加温液中Tre濃度0.3M区および0.1M区では5分間加温終了から48時間後まで6~7個生存し, 0.3M区で10個中6個および0.1M区で10個中5個が透明帯脱出した。加温液中Tre濃度0.4M区および0.2M区は培養開始から生存胚は減少し続け, 0.4M区で9個中3個および0.2M区で10個中1個が透明帯脱出した。15分間加温では加温液中Tre濃度0.3M区は加温後24時間まで10個中7個生存していたが, 10個中1個のみが透明帯脱出した。0.4M区, 0.2M区および0.1M区は加温後生存胚は減少し続け, 透明帯脱出胚はなかった。

ストロー内加温温度の違いによる生存率の比較を表4に示した。20°C区, 30°C区および37°C区の生存率および透明帯脱出率に有意差はなく, 37°C区の生存率48.3%および透明帯脱出率37.9%が最高であった。また, 供試胚をストロー内加温直後に階段希釈加温して培養

したところ, 生存率45.0%および透明帯脱出率20.0%であった。

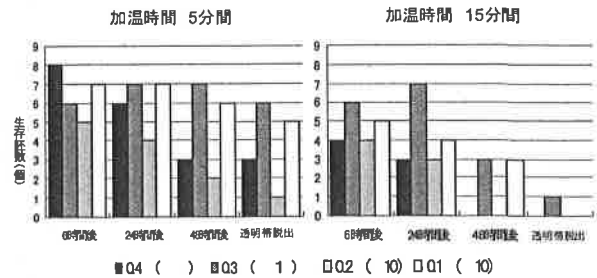


図3 加温液中トレハロース濃度および加温時間が一階段希釈加温後のガラス化胚の生存性に及ぼす影響

表4 ストロー内加温および加温温度の違いによる生存率の比較

	供試胚数	生存胚数(%)		透明帯脱出胚数(%)	
		20°C区	30°C区	37°C区	ストロー内加温→階段希釈加温
ストロー内加温	22	10(45.5)	9(40.9)	14(48.3)	4(20.0)
ストロー内加温→階段希釈加温	20	9(45.0)	4(20.0)		

4 ガラス化胚の移植成績 (表5)

ガラス化OPU-IVF胚のストロー内加温によるダイレクト移植 ($n=18$) の受胎率は16.7%, 階段希釈加温による移植 ($n=13$) の受胎率は46.2%であった。従来凍結法による凍結OPU-IVF胚のダイレクト移植 ($n=27$) の受胎率は25.9%であり¹⁸⁾, 有意差はないが本法によるガラス化胚は階段希釈加温して移植した方が受胎成績が良かった。ガラス化と場-IVF胚についても階段希釈加温による移植 ($n=11$) を実施したところ, 受胎率は54.5%であった。

ガラス化核移植胚の階段希釈加温による移植

表5 ガラス化胚の移植成績

胚の種類	保存方法	加温方法	移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)
OPU-IVF胚	ガラス化	ストロー内加温	18	3	16.7
		階段希釈加温	13	6	46.2
と場-IVF胚	ガラス化	ダイレクト融解	27	7	25.9 ¹⁾
		階段希釈加温	11	6	54.5
核移植胚	ガラス化	階段希釈加温	13	4	30.8 ²⁾
		従来凍結	ダイレクト融解	10	0

1):渡辺ら, 茨城畜産研38号:1-4(2005) 2):山口ら, 茨城畜産研38号:5-12(2005)

で13頭中4頭が受胎し、2頭のクローン牛を生産した¹⁹⁾。

考 察

本研究では固体表面ガラス化を簡素化したアルミプレートガラス化法を考案した。本法に必要な資材は安価なもので揃え、ガラス化保存にはプログラムフリーザーのような高価な器材は不要であり、畜産現場での技術導入は比較的容易である。しかし、本法によるガラス化保存での胚紛失率を検討したところ、作業によって作成したガラス化ドロップ中の胚紛失率が異なり、ガラス化した供試胚数が少ない者ほど胚紛失率が高い傾向にあった。また、移植用ストロー内加温では、注射針穿刺といった工夫がないと効率的な加温作業は困難であった。そのため、本法による胚を含むガラス化ドロップ作出およびダイレクト移植を試みる場合はある程度ガラス化手技の修練を積む必要がある。

アルミプレートガラス化法により体外操作胚をガラス化保存したところ、階段希釈加温後の生存率は非常に高く、体内受精胚と有意差は認められなかった。固体表面ガラス化したマウスのバイオプシー胚の加温後の生存率が97%であったと報告されており¹⁷⁾、ウシのバイオプシー胚でも同様の結果であった。一方、従来凍結法で生存率が低いとされているバイオプシー胚および体外受精胚は、本研究でも融解後の生存率が55.0%および42.6%で体内受精胚の生存率85.0%より有意に低かった。本法によるガラス化保存により、体内受精胚では従来凍結法と同等、バイオプシー胚および体外受精胚では従来凍結保存した体内受精胚と同等の生存率を示し、体外操作胚の保存法としては極めて有効であることが明らかとなった。

ストロー内加温条件として、ストロー内に凍結充填する加温液中Tre濃度は0.3Mが適当と考えられた。しかし、一段階希釈により15分間加温したところ、透明帯脱出胚は0.3M区の1個のみとなり、ダイレクト移植を実施する際はストローの加温開始から移植完了まで5分以内が推奨され、15分以上経過した場合は受胎が見込めない可能性が示唆された。また、0.3MTreを添加した加温液を凍結充填したストロー内に封入したガラス化と場-IVF胚のストロー内加温による生存率は、37℃区の48.3%が最高であり、従来凍結法により凍結保存し

たと場-IVF胚の融解後の生存率42.6%とほとんど変わらない結果であった。そこで、ガラス化と場-IVF胚をストロー内加温直後に階段希釈加温して培養したところ、生存率が45.0%であった。このことから、ストロー内加温でガラス化保存による高い生存率が発揮できない原因として、ストロー内封入の作業工程に問題があると考えられた。ガラス化液を毎秒1000℃を超える冷却速度で-130℃以下に急速冷却するとガラス化が起こるが、ガラス化後に-65~-40℃まで温度が上昇すると氷晶が形成される⁵⁾。本法では、移植用ストローを常に冷却してガラス化ドロップの封入作業を行うが、一連の作業工程中にガラス化ドロップが胚細胞内に氷晶が形成される温度まで上昇している可能性があり、ストロー内封入作業にはさらなる改良が必要である。

ガラス化胚の移植試験を実施したところ、OPU-IVF胚のダイレクト移植での受胎率は16.7%であった。この移植により生産された子牛は正常に発育し、当センターの供卵牛として繋養されている。一方、階段希釈加温による移植での受胎率は46.2%で、従来凍結法によるダイレクト移植での受胎率は25.9%であったことから¹⁸⁾、体外受精胚は本法によりガラス化保存し階段希釈加温後に移植した方が受胎率が良くなると思われる。ダイレクト移植で子牛生産は可能であったが、体外受精胚は後継牛生産などの目的でOPUを実施したり、と場で卵巣を採取したりして作出するため、限られた体外受精胚を有効利用するには、階段希釈加温によるガラス化胚移植の選択を推奨する。

核移植胚についても加温後の生存率は83.3%と良好で、階段希釈加温による移植で2頭のクローン牛を生産した¹⁹⁾。本法によるガラス化保存はバイオプシー胚や体外受精胚だけでなく、クローン家畜生産にも有効な保存技術であることが示唆された。

アルミプレートガラス化法は、今後利用促進が見込まれるバイオプシー胚等の体外操作胚に対し、極めて生存性の高い保存技術である。ダイレクト移植による子牛生産は可能であるものの未だ問題点が多く、移植に際しては実験室内での加温作業が必要となるが、本法によるガラス化保存により付加価値の高い体外操作胚を有効に活用することができる。

参考文献

- 1) 葛西孫三郎(1997),受精卵の凍結保存-緩慢法とガラス化法-,家畜人工授精 183:12-21
- 2) 藤田達男(2003),牛性判別胚のダイレクト法とガラス化保存法の比較ならびに性判別精度,畜産技術 573,26-29
- 3) 木下政健(2006),ウシ性判別胚の凍結条件が受胎率と分娩率に及ぼす影響,畜産技術 619,7-9
- 4) 小島俊之(1991),細胞の低温および凍結・融解による障害とその回避,家畜人工授精 147,1-6
- 5) 藤原昇(1992),受精卵(胚)-特に牛の受精卵(胚)-のガラス化凍結保存,家畜人工授精 152,1-12
- 6) Rall,W.F. and Fahy,G.M.(1985), Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification, Nature 313,583-55
- 7) Ishimori,H. *et al*(1993), Vitrification of bovine embryos in a mixture of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide, Theriogenology 40,427-433
- 8) Papis,K. *et al*(2000),Factor affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in drop, Theriogenology 54,651-658
- 9) Dong-Hoon,K. *et al*(2007), Vitrification of immature bovine oocytes by the microdroplet method, J.Reprod.Dev. 53,843-851
- 10) Tominaga,K.and Hamada,Y.(2001), Gel-loading tip as container for vitrification of *in vitro*-produced bovine embryos,J.Reprod.Dev. 47,267-273
- 11) Kuwayama,M. and Kato,O.(2000), All-round vitrification method for human oocytes and embryos, J.Assist.Reprod.Genet. 17,477
- 12) Vaijta,G. *et al*(1998), Open pulled straw (OPS) vitrification : a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos, Mol.Reprod.Dev. 51,53-58
- 13) Dinnyes,A. *et al*(2000),High developmental rates of vitrified bovine oocyte following parthenogenetic activation,in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer,Biol.Reprod. 63,513-518
- 14) Samfai,T. *et al*(2006), Development to the blastocyst stage of parthenogenetically activated in vitro matured porcine oocyte after solid surface vitrification (SSV),Theriogenology 66,415-422
- 15) Begin,I. *et al*(2003),Cryopreservation of goat oocytes in vivo derived 2- to 4-cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) methods,Theriogenology 59,1839-1850
- 16) Bagis,H. *et al*(2004),Vitrification of pronuclear-stage mouse embryos on solid surface vitrification (SSV) Versus in Cryotube:Comparison of the Effect of Equilibration Time and Different Sugars in the Vitrification Solution, Mol.Reprod.Dev. 67,186-192
- 17) Baranyai,B. *et al*(2005), Vitrification of Biopsied Mouse Embryos, Acta.Vet.Hungarica 53,103-112
- 18) 渡辺ら(2005),生体吸引卵子による初期胚作出技術の確立,茨城畜セ研 38,1-4
- 19) 山口ら(2005),クローン家畜生産技術利用による優良家畜作出試験,茨城畜セ研 38,5-12