

ガラス化保存牛胚の直接移植技術の検討

紀川将之・後藤充宏*

要 約

ガラス化保存牛胚の直接移植技術の確立を目的に、ストロー内1段階希釈法（F式）によりガラス化保存した牛体外受精胚の融解（培養）後の生存率及び透明帯脱出率について、従来の緩慢凍結法を対照として比較検討した。その結果、培養後24時間以降72時間の生存率は、ガラス化保存法が緩慢凍結法より高い傾向にあり、透明帯脱出率ではガラス化保存法が緩慢凍結法より有意に高かった（ $p<0.05$ ）。また、ガラス化保存法を用いた移植試験では、1頭の正常産子を産出した。

目 的

胚移植技術を普及定着させる上で、胚の長期保存技術は不可欠である。近年、従来の緩慢凍結法よりも迅速かつ高い生存性を維持した状態で胚の保存が可能なガラス化保存法が開発されたが、移植前に実験室内での融解作業を必要とすることが利用拡大の隘路となっており、より簡易で汎用性の高い移植技術として確立する必要がある。

そこで今回、ガラス化保存胚を現場で直接融解・移植可能な技術を確認するため、平成17年度開始共同試験「ガラス化保存胚の直接移植に向けた検討（17都府県参加）」に参画し、ストロー内1段階希釈法（F式）で保存した牛体外受精胚の生存性について従来の緩慢凍結法を対照に比較検討するとともに、移植試験を実施したので報告する。

調査概要

1. 供試胚の準備

供試胚には、と畜場由来卵子から当所の常法により作成した体外受精後7～9日目の胚で、胚盤胞期～拡張胚盤胞期のAランク胚を用いた。

2. 供試胚の保存処理

(1) 試験区（ガラス化保存法）

平成17年度開始共同試験「ガラス化保存胚の直接移植に向けた検討」で用いたストロー内一段階

希釈法（F式）を採用した^{1,2)}。ガラス化保存液組成は、20%Gly+20%EG+0.3MSuc+0.3MXy+3%PEG/D-PBS（GESXP2020）とし、①10%Gly+0.1MSuc+0.1MXy+1%PEG/D-PBS（5分）②10%Gly+10%EG+0.2MSuc+0.2MXy+2%PEG/D-PBS（5分）で2段階の前平衡を行った後、胚をガラス化液（GESXP2020）と共にガラス化用具に乗せ、直ちに液体窒素に投入してガラス化させた。次いで、予め希釈液（0.5MSuc+20%FBS/D-PBS）を充填・凍結させたストロー内にガラス化用具を誘導し、プラスチック栓でストローを封閉した後、液体窒素内に保存した。

(2) 対照区（緩慢凍結法）

従来の緩慢凍結法（ダイレクト法）を用い、凍結液10%EG+0.1MSuc+0.4%BSA/D-PBS（10ESB）により胚をストローに封入後、プログラムフリーザーで凍結保存し、液体窒素内に保存した。

3. 保存胚の加温（融解）・希釈処理

(1) 試験区（ガラス化保存法）

25℃の微温湯にストローを投入し、希釈液層の融解を確認後、ガラス化用具を磁力により希釈液内に誘導し、室温で5分間静置した。

(2) 対照区（緩慢凍結法）

6秒間のエアソーイング後、30℃の微温湯に20秒間投入して融解した。

* 現畜産課

4. 培養試験

加温（融解）・希釈後，ストロー内より胚を取り出し，数回洗浄した後，20%FBS+0.1mMβME添加Medium199で培養試験を行い，培養24，48，72時間後に形態観察を行い，胚の生存率及び透明帯脱出率について調査した。

統計的解析については， χ^2 検定により有意差の有無を判定した。

5. 移植試験（試験区のみ）

受胎牛1頭につき1個の胚を，黄体側子宮角に移植した。

結 果

1. 培養試験結果

(1) 保存（融解）後の胚の生存率

培養後24時間，48時間，72時間の生存率は，試験区で90.0% (26/29)，90.0% (26/29)，90.0% (26/29)，対照区で73.3% (22/30)，70.0% (21/30)，70.0% (21/30) であり，培養後24時間以降72時間の生存率は，試験区が対照区より高い傾向にあるものの，有意差はなかった（表1）。

表1 保存（融解）後の生存率

	培養数	24時間	48時間	72時間
試験区	29	26(90.0%)	26(90.0%)	26(90.0%)
対照区	30	22(73.3%)	21(70.0%)	21(70.0%)

※同列間で有意差なし（統計処理： χ^2 検定）

(2) 保存（融解）後の胚の透明帯脱出率

培養後24時間，48時間，72時間の透明帯脱出率は，試験区で51.7% (15/29)，86.2% (25/29)，90.0% (26/29)，対照区で20.0% (6/30)，36.7% (11/30)，56.7% (17/30) であり，培養後24時間以降72時間の透明帯脱出率は試験区が対照区より有意に高かった（ $p<0.05$ ）（表2）。

表2 保存（融解）後の透明帯脱出率

	培養数	24時間	48時間	72時間
試験区	29	15(51.7) ^a	25(86.2) ^a	26(90.0) ^a
対照区	30	6(20.0) ^b	11(36.7) ^b	17(56.7) ^b

※同列異符号間に有意差あり（ $p<0.05$ ）

2. 移植試験結果

試験区のみ，受胎牛9頭を用い移植試験を実施した結果，1頭が受胎し，正常に産子を分娩した（表3，写真1）。

表3 移植成績

	移植頭数	受胎頭数	受胎率
試験区	9	1	11.1%



写真1 正常に分娩したガラス化保存体外受精胚由来産子

考 察

ガラス化保存法は，従来の緩慢凍結法では困難であった性判別胚や低ランク胚，体外受精胚でも高い生存性を維持したまま長期保存できる点において有用であるが³⁾，実験室内での融解処理を必要とすることが利用促進の隘路となっており，直接移植技術への応用に向け，様々な研究がされている^{4,7)}。

今回，平成17年度開始共同試験「ガラス化保存受精卵の直接移植に向けた検討」に参画し，ガラス化保存牛胚のストロー内1段階希釈法について，福岡県農業総合試験場で開発された直接移植法（F式）に基づき，牛体外受精胚を用いた検討を行った。

その結果，保存（融解）後の培養成績では，ガラス化保存法が従来の緩慢凍結法よりも生存率が高い傾向にあり（有意差なし），透明帯脱出率でもガラス化保存法が緩慢凍結法よりも有意に高かったことから，ガラス化保存法が緩慢凍結法よりも高い品質で牛胚を長期保存できると考えられ，F式によるガラス化保存胚の直接移植技術の有用性



が示唆された。

しかしながら、移植試験では、正常産子を1頭生産したものの、受胎率が11.1%と顕著に低く、共同試験の参加都府県間においても、受胎率に大きなバラツキが認められたことから、移植操作時に技術者の熟練度に左右される不安定要素が残るものと考えられた。

今後は、体内胚を用いた培養成績、受胎性についても検討を加えるとともに、より簡単確実に、安定した受胎成績の得られる汎用性の高い移植技術として改良を進める必要があると考えられる。

参考文献

- 1) 笠 正二郎ら；ナイロン糸を用いてガラス化したウシ体外受精胚の生存性. 福岡県農業総合試験場研究報告24, 68-72(2005)
- 2) 笠 正二郎ら；ナイロン糸を用いてガラス化したウシ体外受精胚の生存性 第2報 スト
- ロー内ガラス化液希釈法の開発. 福岡県農業総合試験場研究報告25, 99-103(2006)
- 3) 笠井裕明ら；ストローカット法による牛性判別胚のガラス化保存及び融解移植後の受胎性. 徳島畜研報 No.3, 1-4(2003)
- 4) 加藤英生ら；ガラス化保存したウシ胚の直接移植に関する検討. 第16回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会講演要旨34-35
- 5) 本多 巖ら；マイクロドロップレット法を用いたガラス化保存胚のストロー内希釈の検討. 日本胚移植学雑誌25, 121-126(2003)
- 6) 笠井裕明ら；マイクロドロップレット法 (MD) 法によりガラス化した牛体外受精由来胚のストロー内保存融解技術の検討. 徳島畜研報 No.3, 5-7(2003)
- 7) 福見善之ら；受精卵移植簡易化技術の確立 (簡易凍結融解技術の開発). 徳島畜研報 No.4, 1-4(2004)