

# ウシ胚の受胎率向上試験

## (4) 超急速ガラス化保存液の検討

山城存 大城正光\* 運天和彦 砂川隆治  
棚原武毅 新田宗博

### I 要 約

ウシ胚の凍結保存後の生存性を高めるため、超急速ガラス化保存における凍結保存溶液の組成について検討した。

凍結保存液の耐凍剤組成にエチレングリコール(EG)とプロピレングリコール(PG)、EGとジメチルスルホキシド(DMSO)、および上記2種類の溶液に添加している子牛血清(FCS)の代わりに、ウシ血清アルブミン(BSA)を添加し、EGとPGを組み合わせて作成した3種類の凍結保存液について、胚の凍結・融解後の生存性について検討した。その結果は、以下のとおりであった。

1. EGとPGを組み合わせて作成したガラス化凍結液において、体内受精胚10個を保存・融解した結果、すべての胚が生存し、ランクの低下もなかった。
2. EGとDMSOを組み合わせて作成したガラス化凍結液において、体内受精胚10個を保存・融解した結果、1個の胚に変性死滅(DG)が認められ、ランクの低下が1個の胚に認められた。
3. BSA添加のEGとPGを用いたガラス化凍結液において、体内受精胚10個を保存・融解した結果、1個の胚にDGが認められ、ランクの低下が1個の胚に認められた。
4. EGとPGを用い保存した胚を331頭の受卵牛へ移植した結果、186頭が受胎し、受胎率は56.2%であった。いっぽう、EGとDMSOを用い保存した胚を327頭の受卵牛へ移植した結果、170頭が受胎し、受胎率は52.0%となりEGとPGを組み合わせて作成したガラス化凍結液で高い傾向を示した。

以上の結果より、いずれの凍結液組成においても高い生存性が得られることが判明し、FCSの代わりにBSAを添加した組成においても、高い生存性が得られることが確認された。

### II 緒 言

ウシ胚の凍結保存は、低い濃度の耐凍剤を用いた緩慢凍結保存方法が広く実施されている。緩慢凍結保存方法は、胚をストロー内へ封入後プログラムフリーザーを用いて約1時間30分かけて-30℃まで冷却後、液体窒素へ浸漬する方法である<sup>1)</sup>。いっぽう、ガラス化保存方法は、胚をストロー内へ封入後、すぐに液体窒素へ浸漬する急速保存方法なので、保存までの時間が短縮され、またプログラムフリーザーを必要としない点で簡易的胚の保存方法とされる。さらに、ガラス化保存方法は、高濃度の耐凍剤で胚を処理して、細胞内の脱水と耐凍剤の浸透を同時に行ない、細胞内外に氷晶形成を起こさせないため胚への物理的傷害が少なく、理想的な胚の保存方法とされ近年検討が行なわれている<sup>2~7)</sup>。最近、胚の冷却速度をより早くし、氷晶形成を起こさせない方法として、胚をストロー内へ封入せず露出させたまま液体窒素へ投入・浸漬させる超急速ガラス化保存方法について検討されるようになり、さらに保存性の向上が図られるようになった<sup>8~14)</sup>。齋藤ら<sup>11)</sup>は、超急速ガラス化法において、クライオトップを用い、EGとDMSOを組み合わせて作成したガラス化凍結液で高い受胎率を得たことを報告した。いっぽう、野中ら<sup>15)</sup>はウシ胚の緩慢凍結保存において、EGとPGの組み合わせが良好であることを報告したが、超急速ガラス化保存については検討されていない、そこで今回、耐凍剤の種類とFCSの代わりに、試薬として取り扱いが容易であるBSAを添加した凍結溶液について検討した。

### III 材料および方法

#### 1. 試験場所および期間

試験は、沖縄県畜産研究センターおよび本島南部酪農家で実施した。試験期間は、2008年4月から

2009年12月までとした。

## 2. 供試体内受精胚の生産と区分

体内受精卵の生産は、供卵牛の黒毛和種牛へ性周期に関係なくイージーブリード (CIDR: 天然型プロジェステロン1.9g含有) を装着し、装着後5日目より卵胞刺激ホルモン製剤 (FSH製剤: アントリン) 20mgを3日間漸減投与することにより実施した。受精卵の回収は、回収液に1%子牛非動化血清加乳酸リンゲルを用いて常法<sup>16)</sup>に従った。回収した30個の胚を、品質別に胚全体に占める変性細胞が10%未満の胚をAランク、変性細胞が10%から30%未満の胚をBランク、変性細胞が30%から50%未満の胚をCランクとした。また、発育ステージにより後期桑実胚 (CM)、初期胚盤胞 (EB)、拡張胚盤胞 (Exp) および脱出胚盤胞 (Hed) に区分した。供試胚10個を一つの区として、それぞれ3種の凍結液にて凍結し試験に供した。

## 3. ガラス化凍結保存溶液および胚融解液の組成

ガラス化凍結溶液として、下記の1)~3)の3種類を作成し試験に用いた。

### 1) EGとPGを耐凍剤として用いたガラス化凍結保存溶液

ガラス化平衡15%EP液は、7.5%EG+7.5%PG+20%FCS加メデウム199溶液とした。

ガラス化凍結30%EP液は、15%EG+15%PG+0.5モルシュクロース (Su)+20%FCS加メデウム199溶液とした。

### 2) EGとDMSOを耐凍剤として用いたガラス化凍結保存溶液

ガラス化平衡理15%ED液は、7.5%EG+7.5%DMSO+20%FCS加メデウム199溶液とした。

ガラス化凍結30%ED液は、15%EG+15%DMSO+0.5モルSu+20%FCS加メデウム199とした。

### 3) BSA添加のEGとPGを耐凍剤として用いたガラス化凍結保存溶液

ガラス化平衡15%EPA液は、7.5%EG+7.5%PG+0.4%BSA加m-PBSとした。

ガラス化凍結30%EPA液は、15%EG+15%PG+0.5モルSu+0.4%BSA加m-PBSとした。

胚の融解液はいずれの凍結方法も同じ溶液を用い、以下の3種類の溶液で3段階に希釈した。

1段階希釈液として、1モルSu+20%FCS加メデウム199溶液 (A液)、2段階希釈液として、0.5モルSu+20%FCS加メデウム199溶液 (B液)、3段階希釈液として、20%FCS加メデウム199溶液 (C液) とした。

## 4. 胚のガラス化保存、融解および培養方法

### 1) 胚のガラス化凍結方法

胚の凍結保存方法は、齋藤ら<sup>11)</sup>の方法に準じた。はじめに、胚の平衡処理として、ガラス化平衡液に胚を5分間静置する。静置の間に、胚がシュリンク後ほぼ回復したのを確認した (図1)。次に、ガラス化凍結溶液に1分間浸漬後、ガラス化凍結溶液とともに、胚をプラスチックのヘラであるクライオトップの先端に置き、素早く液体窒素中に投入し凍結した。クライオトップに胚を乗せる際、余分な凍結液があると、冷却までに時間を要すことから、胚と最少量の凍結液を乗せるようにした (図2)。

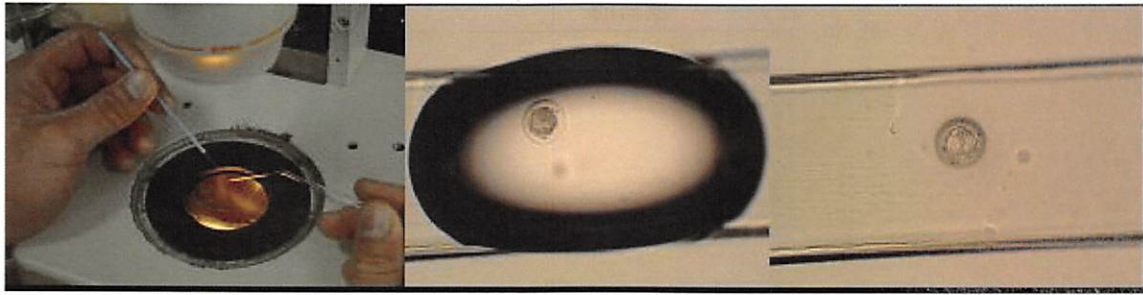


保存前の胚

平衡液に浸漬直後の胚

浸漬5分後ほぼ回復した胚

図1 胚のシュリンクと回復



クライオトップに胚を乗せる 余分な凍結液がある状態 余分な凍結液が無い状態  
図2 胚のクライオトップへの接着

## 2) 胚の融解方法

胚の融解方法は、液体窒素から取り出したクライオトップの先端を素早くA液に浸漬し、1分間静置した。その後、B液に3分およびC液に5分間胚を浸漬し融解した。融解は38℃とした。

## 3) 胚の培養および生存性の確認

融解後、胚の生存およびランクを確認するため、IVD101液（機能性ペプチド研究所）を用いて培養した。培養条件は、38.5℃および5%CO<sub>2</sub>条件下で1～2時間。

## 5. 胚の移植

30%EP液を用い凍結したAランク胚66個、Bランク胚228個およびCランク胚37個の胚を30%EP区として受卵牛へ移植した。また、30%ED液を用いて凍結したAランク胚109個、Bランク胚178個およびCランク胚40個を30%ED区として受卵牛へ移植した。

移植方法は、カテーテル型移植器（ファームサービス）を使用し、子宮角深部へ移植した。

## 6. 調査項目

### 1) ガラス化保存・融解後の生存性

体内受精胚について、ガラス化凍結保存・融解後の生存性およびランクの低下について調査した。

### 2) 胚の移植成績

30%EP液および30%ED液にて凍結保存した胚を受卵牛へ移植し、受胎性について調査した。

## 7. 統計処理

移植成績は、カイ二乗検定を用いて有意差検定をおこなった。

## IV 結果および考察

### 1. ガラス化保存液の保存性

30%EP液、30%ED液および30%EPA液を用いたウシ胚超急速ガラス化保存・融解後の成績を表1、表2および表3に示した。

30%EP液において体内受精胚10個を保存・融解した結果、全ての胚が生存し、ランクの低下も認められなかった。

30%ED液において体内受精胚10個を保存・融解した結果、凍結前BランクのCM1個がDGとなり、Bランク胚のCM1個にランクの低下が認められた。

30%EPA液において、体内受精胚10個を保存・融解した結果、凍結前CランクのCM1個がDGとなり、Bランク胚のCM1個にランクの低下が認められた。



表1 30%EP液を用いたガラス化保存成績

胚 No.	凍結前		融解培養後
	胚ランク	胚ステージ	胚ランク
1	B	CM	B
2	B	CM	B
3	B	CM	B
4	B	CM	B
5	C	EB	C
6	A	EB	A
7	B	EB	B
8	B	EB	B
9	A	Exp	A
10	A	Exp	A

表2 30%ED液を用いたガラス化保存成績

胚 No.	凍結前		融解培養後
	胚ランク	ステージ	胚ランク
1	B	CM	DG
2	B	CM	C
3	B	EB	B
4	B	EB	B
5	B	EB	B
6	B	EB	B
7	A	Exp	A
8	A	Exp	A
9	A	Exp	A
10	A	Hed	A

注) 網掛けは、ランクが低下した胚を示す。

表3 30%EPA液を用いたガラス化保存成績

胚 No.	凍結前		融解培養後
	胚ランク	ステージ	胚ランク
1	B	CM	B
2	B	CM	B
3	B	CM	C
4	C	CM	DG
5	C	CM	C
6	A	EB	A
7	B	EB	B
8	B	EB	B
9	C	EB	C
10	A	EXB	A

注) 網掛けは、ランクが低下した胚を示す。

## 2. 移植成績

30%EP液および30%ED液で凍結保存した胚の移植成績を表4に示した。

30%EP液で保存した胚を331頭の受卵牛へ移植した結果、186頭が受胎し受胎率は56.2%であった。

30%ED液で保存した胚を327頭の受卵牛へ移植した結果、170頭が受胎し受胎率は52.0%であった。

受胎率において両凍結溶液に有意な差はなかったが、30%EP液にて保存移植した胚が高かった。

表4 凍結融解後の移植成績

凍結区分	移植頭数	受胎頭数	不受胎頭数	受胎率(%)
30%EP区	331	186	145	56.2
30%ED区	327	170	157	52.0

注) 両区に有意差はなかった。

以上の結果から、クライオトップを用いた超急速ガラス化保存方法は、いずれの凍結保存液でも高い保存性があると判明し、移植成績においても50%以上の受胎率が得られた。特に30%EP液は、ランクおよびステージの違う胚でも融解後の品質低下がなく、今回の試験において、野中ら<sup>1)5)</sup>のEGを用いた緩慢凍結方法と比較して、高い胚の保存性・受胎性が確認された。

野中ら<sup>1)5)</sup>はウシ胚の緩慢凍結保存において、EGとPGの組み合わせが良好であることを報告した。ガラス化保存においてEGとPGを組み合わせた報告は確認されず、今回の試験から、緩慢凍結保存と同じくガラス化保存においても胚の凍結に適していることが判明した。また、FCSより取り扱いや保存が簡易であるBSAを添加した30%EPA液については、今後添加量を増すことで、30%EP液と同等の保存性を得ることができるか検討する必要があると考えられた。

## V 引用文献

- 1) 野中克治・宮里賢治・渡久地政康(1991)牛の受精卵移植(5)牛凍結胚のダイレクト法による移植, 沖縄畜試研報, 29, 1-5
- 2) 齊藤則夫(1997)牛体外受精由来胚盤胞のガラス化保存, 農林水産省家畜改良センター, 4, 43-47
- 3) 野田準一・佐野文彦・三宅晃次(2000)牛胚のガラス化保存液の検討, 静岡県畜産試験場試験研究報告, 26, 54-57
- 4) 西宮弘・沼田恵・相澤健一・小林正樹・千田惣浩・小西潤一(2001)牛胚のガラス化低温保存法の検討(第2報), 秋田県畜産試験場研究報告, 16, 57-60
- 5) 葛西孫三郎(2001)哺乳動物における卵子及び胚のガラス化保存, 日本胚移植学雑誌, 23, 12-17
- 6) 浜野晴三・濱脇淳(2001)牛胚の保存と利用, 日本胚移植学雑誌, 23, 27-31
- 7) 小淵裕子・川島敬二・須藤慶子・砂川政広(2001)フィールド活用した牛ガラス化胚の移植成績, 日本胚移植学雑誌, 23, 32-35
- 8) 富永敬一郎(2000)オープン・ブルド・ストロー法を用いた牛胚の超急速ガラス化保存, 日本胚移植学雑誌, 22, 59-65
- 9) 富永敬一郎(2001)牛体外受精由来初期胚の緩慢凍結およびガラス化保存, 日本胚移植学雑誌, 23, 19-26
- 10) 土屋聖子・佐野文彦・三宅晃次(2002)ガラス化保存胚の移植技術の検討, 静岡県畜産試験場試験研究報告, 28, 5-8
- 11) 齋藤美英・土屋聖子・佐野文彦・手塚弘樹・井上保・三宅晃次(2004)クライオトップ法を用いたウシバイオプシー胚のガラス化保存, 静岡県畜産試験場試験研究報告, 30, 25-28
- 12) 細川泰子・福成和博(2005)ガラス化保存受精卵の直接移植に向けた検討, 岩手県農業研究センター試験成績書, 17, 51-52
- 13) 高橋正博・黒沢功(2007)牛体外受精胚に対する超急速ガラス化法と簡易保存ストローの検討, 群馬県畜産試験場研究報告, 14, 26-303
- 14) 瀬尾哲則・米村功(2007)超急速ガラス化保存したウシ性判別胚の移植試験, 鳥取県畜産試験場研究報告, 35, 1-3

- 
- 15) 野中克治・山城存・渡久地政康(1995)牛の体外受精技術確立試験(2)体外受精胚のダイレクト移植法における各種凍結保護剤の検討, 沖縄畜試研報, 33, 1-3
- 16) 社団法人日本人工授精師協会(2001)家畜人工授精講習会テキスト, 228-229
- 

研究補助: 小波津明彦, 玉本博之