

超急速ガラス化保存したバイオブシー胚および低ランク胚の ストロー内融解後の直接移植による子牛生産

高橋利清・西宮 弘*・千田惣浩・酒出淳一・伊藤 隆*

* 秋田県北部家畜保健衛生所

要 約

性判別などの遺伝子診断用にバイオブシーした胚や、過排卵処理で生産される低品質胚など耐凍性が低いとされるウシ胚について、野外で普及させるために、超急速ガラス化保存胚のストロー内融解後の直接移植について検討を行った。液体窒素で冷却したアルミ盤上で、Solid Surface Vitrification法で超急速ガラス化保存した胚と、棒状に凍結した希釈液をストロー内に挿入して封入することにより、直接移植可能なストロー構成が可能となった(秋田畜試式)。本手法による融解後の胚生存性は、48時間後でも88.9%以上と高く、直接移植後の受胎率においても、バイオブシー胚で50.0%(11/22)、低品質胚で47.4%(9/19)と良好な結果が得られた。本手法により正常産子が生産され、この内2頭が本県の県有種雄牛として後代検定を実施中である。秋田畜試式を用いることにより、超急速ガラス化保存法によるウシ胚のストロー内融解および直接移植が可能となり、移植後の受胎性も良好で産子を生産できたことから、ウシ胚の移植現場で簡易な手法として利用可能であると考えられる。

緒 言

近年、ウシにおいて、性選別精液を利用して雌雄の産み分けを行う研究が行われ(Seidel et al, 1999, Sasaki et al, 2011), 乳用種を中心に普及が進んでいる。出生前に性別を知ること、乳用種では生乳生産のために雌畜を選択し、肉用種では増体に優れた雄畜や、繁殖用の雌畜を生産するなど、計画的な産子獲得が可能となる。しかし、現在のところ、性選別精液は流通する種雄牛の種類が制限されているため、胚段階における性判別も有効な手段であると考えられる。また、近年ではウシの遺伝性疾患が検査可能となり、特に黒毛和種においては、新しい遺伝性疾患も報告され、その数が増加している。このため、致死性が高い項目を保因している雄牛は、種雄牛として登録が認められないなどの措置がとられている(全国和牛登録協会, 2013)が、繁殖雌牛に関しては項目により未

検査牛も多い状況にある。

そこで我々は、ウシの胚段階における遺伝子診断に着目し、ホットスタートPCRを応用した反応系の改良を検討し、検出感度を10 pg以下に向上させ、性別を含む複数の遺伝性疾患の検査を可能にした(伊藤ら, 2011)。この成果により、性別や遺伝性疾患のみならず、有用とされる経済形質など他の遺伝子情報についても、検査の可能性を見いだした。

一方、生産現場ではウシ胚移植の多くが凍結胚を用いているが、遺伝子診断用にサンプリングしたバイオブシー胚は、耐凍性が低いため凍結胚としての利用が難しい。また、過剰排卵処理によるウシ体内由来胚の採取においては、低品質な胚が採取される場合があるが、バイオブシー胚と同様に耐凍性が低く、廃棄される場合もある。近年では、従来の凍結方法である緩慢凍結法(Leibo, 1984,

Dochi et al, 1998)に加えて、超急速ガラス化保存法において、バイオプシー胚や低品質胚で、融解後の高い生存性や受胎率が報告されている。しかし、超急速ガラス化保存法では、オープンブロードストロー法(Vajta et al, 1998)や、ゲルローディングチップ法(Tominaga and Hamada, 2001)クライオトップ法(Kuwayama et al, 2005)など保存用具を用いる場合が多く、胚移植時に庭先での融解が困難であることが、普及の妨げとなっている。そこで、超急速ガラス化保存したバイオプシー胚や低品質胚について、胚移植用のストロー内で融解し、直接移植可能な手法について検討し、融解後の生存性や受胎率および産子生産について調査した。

材料および方法

試験に用いた試薬に関して、特に記載がない場合は、全てSigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)のものを使用した。

1. 供試胚

(1) 低品質胚

体内由来胚は、卵胞刺激ホルモン製剤(FSH, アントリンR・10®, 共立製薬株式会社)を3日間減量投与(総量20 AU)し、FSH処理開始48時間後にプロスタグランジンF2 α 製剤(エストラメイト®, ナガセ医薬品株式会社)を投与して過排卵処理を施した黒毛和種雌牛に、人工授精(AI)して作出した。AI後7日目にエンブリオテック(日本全薬工業株式会社)を回収液として非外科的に胚を採取した。採取胚は顕微鏡下(IMT-2, オリパス株式会社)で品質評価し、変性部分が約50%以上のものを低ランク胚として試験に用いた。

(2) バイオプシー胚

低品質胚と同手法で採取した体内由来胚を用い、マイクロマニピュレータにより栄養外

胚葉の側面の透明帯にスリットを入れ、38.5℃、5%O₂、5%CO₂、90%N₂、飽和湿度条件下で6~20時間培養を行った。培養液は、既報(高橋ら, 2011)と同じ組成のものを用いた。

培養後、透明帯から突出した細胞塊を、マイクロマニピュレータに装着したマイクロフェザーブレードを用いて切除した。細胞塊は0.3% Polyvinylalcohol加PBS(+)に回収して遺伝子診断用のサンプルとし、透明体内の胚について、バイオプシー胚として試験に用いた。

2. 直接融解可能な超急速ガラス化保存

ガラス化液として、15% Ethylene glycol (EG, Wako co. Tokyo, Japan), 15% Dimethylsulfoxide (DMSO), 0.5 mol/L Sucrose (Suc)を添加した修正199(m199)を用いた。また、ガラス化液をm199で等量希釈したものを平衡液とした。

超急速ガラス化保存はSolid Surface Vitrification法(Dinnyes et al, 2000)の変法で行った。即ち、平衡液で胚を5分間処理した後、ガラス化液に移し、30秒以内にマイクロピペットを用いて0.8 μ Lのガラス化液と共に、液体窒素で冷却したアルミ盤上に滴下し、瞬時にドロップ状に固化させた。

胚移植用ストロー内の中程まで移植液(0.4% BAS加m-199)および希釈液(0.2 mol/L Suc加PBS)を吸引し、冷却したアルミ盤上で凍結させ、ガラス化した胚のドロップおよび予め棒状に凍らせておいた(図1)希釈液と共にストローに入れ、ポイントシーラー(EX-15, 富士インパルス)を用いて封入し、液体窒素中に保存した(秋田畜試式, 図2)。

3. 胚の融解および移植

胚の融解は、液体窒素中で保存したストローを取り出し、空気中で10秒間保持した後、35℃の温

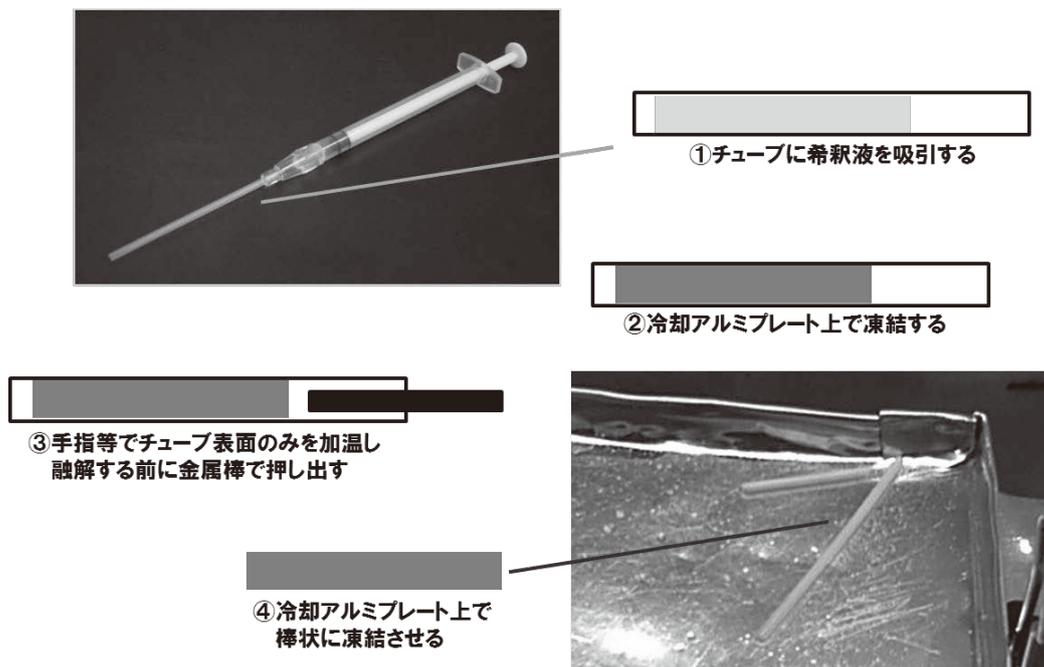


図1 超急速ガラス化ダイレクトの冷凍希釈液の作製方法

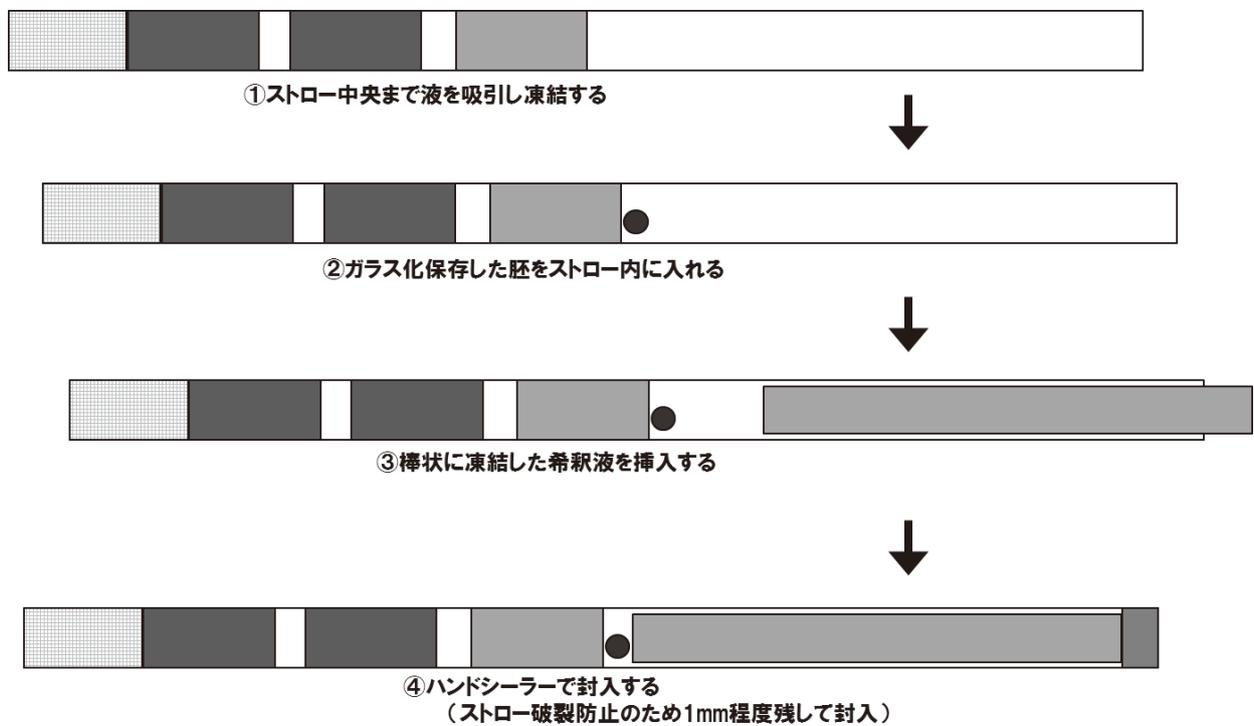


図2 超急速ガラス化ダイレクトの封入手順およびストロー構成

湯に20秒間浸漬して行った。その後、胚移植用の移植器にセットし、当場の常法により移植した。

4. 統計処理

データの統計処理は、カイ二乗検定で行った。

試験1 直接融解後の生存性調査

秋田畜試式で超急速ガラス化保存を行ったバイオプシー胚および低品質胚について、空气中10秒、35℃温湯中20秒で融解し、37℃の加温板上で5分間保持後に、50 μ mol/L Cysteamine+0.4% BSA 加m-199に移し、38.5℃、5%CO₂、95%空気、飽和湿度の条件下で培養した。培養後、3、24、48時間後の生存率を調査した。なお、胚の生存性は胞胚腔の再形成により判別した。

試験2 移植試験

当場の常法により、発情7日後の繁殖雌牛に秋田畜試式で超急速ガラス化保存を行ったバイオプシー胚および低品質胚を移植し、受胎率を調査した。

なお、移植は県内の経験豊富な獣医師およびET師3名で実施し、妊娠鑑定については、移植7週後に直腸検査または超音波により診断を行った。

結 果

1 直接融解後の生存性調査

低品質胚およびバイオプシー胚における融解後の生存性については、それぞれ、3時間で93.5% (43/46) および100% (9/9)、24時間で93.5% (43/46) および100% (9/9)、48時間で91.3% (42/46) および88.9% (8/9) となり、ストロー内融解においても高い生存率が得られた。

2 移植成績および産子作出

受胎率は低品質胚で47.4% (9/19)、バイオプシー胚で50% (11/22) となり、それぞれで正常な産子が生産された(表2)。なお、バイオプシー胚では、性および複数の遺伝性疾患を事前判定し、秋田畜試式で保存・融解後に移植して誕生した雄子牛が、種雄牛として繋養中である(図3)。

表1 超急速ガラス化保存-ダイレクト融解によるウシ低品質およびバイオプシー胚の生存性

区分	供試胚数	融解後の生存		
		3時間後	24時間後	48時間後
低品質	46	43 (93.5%)	43 (93.5%)	42 (91.3%)
バイオプシー	9	9 (100%)	9 (100%)	8 (88.9%)

表2 超急速ガラス化保存-ダイレクト融解後の直接移植

区分	移植頭数	受胎頭数	受胎率
低品質	19	9	47.4%
バイオプシー	22	11	50.0%



図3 遺伝子診断したバイオプシー胚を超急速ガラス化保存しダイレクト移植して誕生した雄子牛 (現在、秋田県有種雄牛として後代検定中)

考 察

ウシ胚移植技術は、高能力牛の増産による改良促進や、高品質素牛の効率的な生産が可能になることから、我が国でも広く利用されている。

更に、胚の長期保存方法として、従来の緩慢凍結法に加え超急速ガラス化保存法について検討が行われ、融解後の高い生存率が報告されている (Vajta et al, 1998, Tominaga and Hamada, 2001, Kuwayama et al, 2005)。しかし、冷却速度を高めるために器具を利用することから、庭先融解による直接移植について研究が進められている。

今回、超急速ガラス化保存法による直接融解可能な方法について、胚移植用ストロー内の構成を検討した結果、近年研究が進められている、クライオトップ法の1段階希釈による胚生存性や移植成績 (佐野ら, 2010, 高田ら, 2012, 田中ら, 2013) と同等の良好な成績が得られた。このことにより、移植用ストロー内のみでの希釈が有効に行われ、生存性の低下を軽減したことが示唆された。

小田ら (2004) は、バイオプシーしたウシ胚のガラス化保存における希釈液において、Sucroseの添加が有効であり、濃度が融解後の生存性に影響を及ぼさずとし、0.3および0.5 mol/Lでは、より低濃度条件下において生存性が高いことを示唆してい

る。本法においても、Sucroseを0.2 mol/Lの濃度で添加しており、細胞の収縮作用に伴う耐凍剤除去効果が効果的に働いたものと考えられる。

以上の結果から、超急速ガラス化保存した、バイオプシー胚および低品質胚において、庭先でストロー内融解後に直接移植し、産子を得られることが示された。本手法は、胚移植現場において、従来と同様の手法で利用できるものであり、今後ウシ生産現場での普及が期待される。一方で、希釈液やストロー内構成などについては、更なる改良も必要であると考えられる。

文 献

- Dinnyés A, Dai Y, Jiang S, Yang X. 2000. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod* 63, 513-518.
- Dochi O, Yamamoto Y, Saga H, Yoshida N, Kano N, Maeda J, Miyata K, Yamauchi A, Tominaga K, Oda Y, Nakashima T, Inohae S. 1998. Direct transfer of bovine embryos frozen-thawed in the presence of propylene glycol or ethylene glycol under on-farm conditions in an integrated embryo transfer program.

- Theriogenology 49, 1051-1058.
- 伊藤隆, 高橋利清, 西宮弘, 平野貴. 2011. ウシ低ランク胚および体外操作胚の有効活用による高品質肉用牛生産技術の検討(第2報). 秋田農技セ畜試研報25, 48-55.
- Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. 2005. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 11, 300-308.
- Leibo SP. 1984. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 21, 767-790.
- 小田頼政, 黒岩力也, 古川恵, 有安則夫, 水木剛. 2004. 雌雄判別ガラス化保存ウシ胚のストロー内希釈の検討. 岡山総畜セ研報 15, 28-33.
- 佐野文彦, 北山智広, 増山龍一, 白石徹, 河野良輝, 稲谷憲一, 小田頼政, 林みち子, 森安悟, 稲葉泰志, 今井敬. 2010. ウシ性判別胚の超急速保存法. 日本胚移植学雑誌 32, 113-120.
- Sasaki O, Kimura H, Ishii K, Satoh M, Nagamine Y, Yokouchi K. 2011. Economic effects of using sexed semen in Japanese dairy herds. *Anim Sci J* 82, 486-493.
- Seidel GE Jr, Schenk JL, Herickhoff LA, Doyle SP, Brink Z, Green RD, Cran DG. 1999. Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology* 52, 1407-1420.
- 高橋利清, 西宮弘, 伊藤隆. 2011. ウシ低ランク胚および体外操作胚の有効活用による高品質肉用牛生産技術の検討(第1報). 秋田農技セ畜試研報25, 42-47.
- 高田広達, 谷口俊仁, 黒田順史, 樽本英幸, 中本和弘. 2012. 超急速ガラス化保存したウシ性判別胚による産子生産. 和歌山県農林水技セ研報13, 63-70.
- 田中政嗣, 影山聡一, 星一美, 秋山清, 鈴木希伊, 神藤学, 佐野文彦, 佐藤義政, 北山智広, 林みち子, 犬養尚子, 高田広達, 長谷川清寿, 中原仁, 磯崎良寛, 林武司, 鍋西久, 亀樋成美, 齋藤公治, 稲葉泰志, 今井敬. 2013. 雌雄産み分け技術共同試験のこれまでの取り組み. 日本胚移植学雑誌 35, 61-66.
- Tominaga K, Hamada Y. 2001. Gel-Loading Tip As Container for Vitrification of In Vitro-Produced Bovine Embryos. *J Reprod Dev* 47, 267-273.
- Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H. 1998. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 51, 53-58.
- 全国和牛登録協会編. 2013. 和牛登録事務必携. 平成25年度改訂版. 全国和牛登録協会, 京都市.