

# 超低温保存胚から作出したウシバイオペシー胚のガラス化 保存後の生存性

谷村 英俊・古屋敷 忍<sup>1</sup>・橋谷田 豊<sup>1</sup>

Viability after vitrification of biopsy embryos derived from cryopreserved bovine embryos.

Hidetoshi TANIMURA, shinobu FURUYASIKI and Yutaka HASHIYADA

1 現 独立行政法人家畜改良センター奥羽牧場

## 要 約

現在、胚の高い生存性が期待できるガラス化法について多くの検討がなされている。そこで、凍結またはガラス化保存した intact 胚について融解後とバイオペシー後の各生存率を比較し、さらに生存したバイオペシー胚について凍結由来 (SW 区) のものを再度凍結またはガラス化する方法ならびにガラス化由来 (G 区) のものを再度ガラス化する方法で培養後の生存率を比較した。

その結果、Intact 胚の融解後の生存率は、G 区 86.7%(26/30) が SW 区 67.3%(33/49) に比べ高い傾向が窺え、バイオペシー後の生存率は、SW 区 65.5%(19/29)、G 区 60%(15/25) とほぼ同様であった。再凍結または再ガラス化したバイオペシー胚の生存率は、培養 24 時間では SW-SW 区 44.4%(4/9)、SW-G 区 55.6%(5/9)、G-G 区 64.3%(9/14) であり、培養 48 時間では各々 22.2%(2/9)、44.4%(4/9) および 57.1%(8/14) であった。

以上のことから、超低温保存胚から作出したバイオペシー胚を再度保存する場合、ガラス化保存の有効性が示唆された。

と考えられる。

このことから超低温保存胚から作出したバイオペシー胚のガラス化保存後の生存性について試験を実施した。

## I 緒 言

胚をバイオペシーして行う性判別技術の進展に伴い、野外においても性判別された胚の長期保存技術が求められている。現在、高い生存性が期待できるガラス化法について、多くの検討がなされ<sup>1)、2)</sup>、切断胚を超低温保存した場合に生存性が高いことが知られている<sup>3)、4)、5)</sup>。

そこで、超低温保存後に融解・切断した場合でも、生存性が高い方法で保存されれば、性判別胚の積極的な利用も可能になり、さらに性判別後に再度保存できれば、野外における利便性は高まる

## II 試験方法

供試胚は黒毛和種生体由来 Fair および Poor ランク胚を用いた。

胚の凍結は 3 段階でグリセリン平衡を行った 10%グリセリン、20%子牛血清、0.4%ウシ血清アルブミン添加 D-PBS を耐凍剤としたステップワイズ法 (SW 区) により行い、ガラス化は 10%グリ

セリン、30%エチレングリコール、0.3Mシヨ糖、0.3Mキシロース、3%アルブミン添加D-PBSを組成としたガラス化液（斉藤、投稿中；G区）を用いて行った。

SW区のグリセリンの希釈は3段階で行い、ガラス化液の希釈は同一ストロー内に構成した0.3Mシヨ糖と胚を含むガラス化液をストロー内で混和して行った<sup>6),7),8),9)</sup>。

胚の培養は、10%牛胎子血清、0.1mMβメルカプトエタノール（ME）および1%ソルコセルル（SOL）添加TCM199培地50μl中で38.5°C、5%CO<sub>2</sub> in air および加湿下で行った。

試験Ⅰ：Intact胚の融解、培養24時間後の生存率を形態学的観察に基づきSW区とG区で比較した（表1）。

表1. 保存方法の違いによる生存率の比較（試験Ⅰ）

材料	黒毛和種生体由来 fairおよびpoorランク胚
	SW保存胚(SW区) 49個
	ガラス化保存胚(G区) 30個
方法	融解: SW区 → グリセリン段階希釈 G区 → ストロー内希釈
	培養: 10%FCS+0.1mMβME+1%ソルコセルル(SOL)+TCM199 38.5°C 5%CO <sub>2</sub> in airで24時間培養

試験Ⅱ：生存胚のうち形態が良好なものをマイクロブレード(15°フェザ-製)装着したマイクロマニピュレーターで胚全体の20-30%の細胞塊を切

除し、培養24時間後の生存率を両区間で比較した（表2）。

表2. バイオブシー後の生存率の比較（試験Ⅱ）

材料	試験Ⅰでの生存胚	SW区 29個	G区 25個
方法	胚の切断: 金属刃による切断		
	培養: 10%FCS+0.1mMβME+1%ソルコセルル(SOL)+TCM199 38.5°C 5%CO <sub>2</sub> in airで24時間培養		

試験Ⅲ：生存したバイオブシー胚についてSW区由来のものは再度凍結またはガラス化を行い（各SW-SW区、SW-G区）、G区由来のものは

再度ガラス化を行った(G-G区)。これらを液体窒素中で保存後に融解し、24時間および48時間培養後の生存率を比較した（表3）。

表3. 再凍結および再ガラス化によるバイオブシー胚の生存率の比較（試験Ⅲ）

材料	試験2での生存胚	SW区 18個	G区 14個
方法			
	SW区	再SW: 9個 (SW-SW区)	再ガラス化: 9個 (SW-G区)
	G区		再ガラス化: 14個 (G-G区)
		融解・培養	
		10%FCS+0.1mMβME+1%SOL+TCM199 38.5°C 5%CO <sub>2</sub> in airで融解、培養後に観察	

### Ⅲ 試験結果

試験Ⅰ：Intact 胚の融解後の生存率は、SW区 67.3%(33/49)、G区 86.7%(26/30)でG区が、SW区に比べ高い傾向が窺えた(表4)。

試験Ⅱ：バイオブシー後の生存率は、SW区由来が 65.5%(19/29)、G区由来が 60%(15/25)とほぼ同様の成績であった(表5)。

試験Ⅲ：再凍結または再ガラス化したバイオブ

シー胚の生存率は、培養 24 時間ではSW-SW区 44.4%(4/9)、SW-G区 55.6%(5/9)、G-G区 64.3%(9/14)であり、培養 48 時間では各々 22.2%(2/9)、44.4%(4/9)および 57.1%(8/14)であった(表6)。

表4 ステップワイス法またはガラス化法で超低温保存したIntact胚の生存率

保存方法	供試数	生存数	生存率(%)
SW区	49	33	67.3 <sup>a</sup>
G区	30	26	86.7 <sup>b</sup>

a,b(p<0.10) x<sup>2</sup>y

表5 ステップワイス法またはガラス化法で保存胚から作出したバイオブシー胚の培養 24 時間後の生存率

保存方法	供試数	生存数	生存率(%)
SW区	29	19	65.5
ガラス化区	25	15	60

表6 ステップワイス法またはガラス化保存胚に由来するバイオブシー胚の再凍結または再ガラス化後の生存率

保存方法	供試数	生存率(%)		生存率(%)	
		生存数 (24h後)	生存率(%)	生存数 (48h後)	生存率(%)
SW-SW区	9	4	44.4	2	22.2
SW-G区	9	5	55.6	4	44.4
G-G区	14	9	64.3	8	57.1

### Ⅳ 考 察

以上のことから、超低温保存胚から作出したバイオブシー胚を再度保存する場合、Intact 胚をガラス化し、バイオブシー後にさらにガラス化する方法が、他の方法に比べ生存性が比較的高く、ガラス化保存の有効性が示唆された。今後は、胚の培養時間の短縮と、移植試験による受胎性の確認が必要と思われる。

良センター奥羽牧場受精卵室の皆様には誠にありがとうございます。

### 謝 辞

本試験を実施するにあたり、貴重な胚の提供と技術等をご教授いただいた、独立行政法人家畜改

## 引用文献

- 1) Ishimori et al. Vitrification of bovine embryos in a mixture of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. Theriogenology, 40:427-433. 1993
- 2) Saito N et al. Effect of sugars-addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced in vitro. Theriogenology, 41:1053-1060. 1994
- 3) 三牧由佳ら. バイオプシー後の培養時間がガラス化保存後のウシ胚の生存性及び受胎性に及ぼす影響. 東日本受精卵移植技術研究会報, 15:48-49. 2000
- 4) 木下政健ら. ウシ生体由来バイオプシー胚の保存におけるガラス化保存法と超急速ガラス化保存法の比較. 第103回日本畜産学会大会講演要旨, 127. 2004
- 5) 藤原信子ら. バイオプシー後の牛胚におけるガラス化保存法の比較. 第103回日本畜産学会大会講演要旨, 127. 2004
- 6) 川島敬二ら. ストロー内希釈後に加温 PBS にて希釈したガラス化牛胚の野外移植試験. 東日本受精卵移植技術研究会報, 15:46-47. 2000
- 7) 加藤英生ら. ガラス化保存したウシ性判別胚の庭先融解・移植による受胎性. 第101回日本畜産学会大会講演要旨, 81. 2003
- 8) 上田修二ら. ガラス化保存法におけるストロー内希釈によるウシバイオプシー胚の生存性. 西日本畜産学会報, 55:26. 2004
- 9) 小田頼政ら. 雌雄判別ガラス化保存ウシ胚のストロー内希釈の検討. 岡山県総合畜産センター研究報告, 15:28-33. 2004