

## 牛の雌雄産み分け技術の確立(第1報)

誌名	石川県畜産総合センター研究報告 = Bulletin of the Ishikawa Pref Livestock Research Center
ISSN	1347913X
著者	石田, 美保 松田, 達彦 田中, 孝一 北, 満夫
巻/号	33号
掲載ページ	p. 8-12
発行年月	1999年9月

## 牛の雌雄産み分け技術の確立 (第1報)

— バイオプシー牛胚のガラス化保存の検討 —

石田美保・松田達彦・田中孝一・北 満夫

## 要 約

バイオプシー胚の保存方法としてガラス化保存法を検討した。

- 1) バイオプシー胚の緩速凍結保存とガラス化保存、融解後の生存率は、24時間後は77.8%と95.3%、48時間後は73.3%と95.3%、72時間後は71.1%と81.4%であった。
  - 2) バイオプシー胚の移植結果は、新鮮性判別胚の受胎率が81.1%であったが、ガラス化保存胚は、28.6%と大きく下回った。
- 以上の結果から、バイオプシー胚をガラス化保存することにより高い生存率を得られることが明らかとなった。しかし、移植成績は、新鮮胚移植の受胎率を大きく下回り、さらに検討が必要となった。

## 緒 論

近年PCR (Polymerase Chain Reaction) 法を用いた牛の雌雄産み分け技術が実用化された<sup>8) 14) 15)</sup>。雌雄の産み分けが可能となれば、育種改良、性の目的に応じた生産が促進され、生産効率が飛躍的に上がることが期待できる。

この方法では、胚の周りの透明帯を切開し、胚細胞の一部を採取 (バイオプシー) して性判別に用いるため、切断部が損傷し、細胞数の減少した胚 (バイオプシー胚) を移植することになる。このためにバイオプシー等物理的ダメージを受けたウシ胚の耐凍能は著しく低い<sup>10)</sup> ことが知られている。しかし、雌雄産み分け技術の普及には性判別胚の凍結保存方法の確立が重要である。

ガラス化による胚の保存方法は、Rall & Fhay<sup>12)</sup> によるマウス胚での成功以来、ウシ胚においても保存後の高い生存率および受胎率が報告<sup>7) 9)</sup> されている。この方法は、氷晶による細胞障害を形成せず胚を保存するため、氷晶形式による物理的障害を防ぐことが可能である。このため性判別に一部細胞を搾取したバイオプシー胚のように耐凍能の低い胚の保存法としても着目<sup>1) 2)</sup> されている。そこで、性判別牛胚の保存方法として、氷晶による細胞障害のない胚の低温保存方法であるガラス化保存法について検討した。

## 材料と方法

実験 I バイオプシー胚のガラス化保存後の生存性

## 1) 供試胚

堀ら<sup>5)</sup> の方法により作出した体外受精後7日目に発生した胚盤胞期胚 A~B' ランクの胚を用いた。

## 2) バイオプシーの方法

胚の切断は、Herr and Reed<sup>4)</sup> の方法を一部改良して行った。プラスチックシャーレ上に作成したタンパク無添加の修正PBSのドロップ内に胚を置き、マイクロマニピレーター (Narisige) にバイオフィューザー (角度30° フェザー社) を装着し、倒立顕微鏡下で、垂直方向から切断した。

## 3) 胚の培養

胚の切断後の培養には、抗生物質を加えた20%胎子血清 (FCS) を含むTCM199 (GIBCO社) に100  $\mu$ M  $\beta$ MEの添加培地を用いて、210  $\mu$ lのドロップ中に胚を10~12個入れて5時間培養した。

## 4) 胚の凍結および融解方法

急速凍結法のガラス化保存法と緩速凍結法であるステップワイズ法の比較を、培養後胞胚腔の回復が認められた胚を用いて行った。

## (1) ガラス化保存法

石森ら<sup>7)</sup> のガラス化液、すなわち0.4% BSA添加の修正PBSを基礎媒液として25%エチレングリコール、25%ジメチルスルホキシドを添加した液を用い、井上ら<sup>6)</sup> の方法に準じて行った。切断胚は、

50%ガラス化液に60秒間平衡した後、100%ガラス化液に移し、0.25mlのプラスチックストローに充填し、30秒以内に液体窒素に投入した。カラムは、綿栓側から、6%グリセリン、ガラス化液、ガラス化液と胚、6%グリセリンの順に作成し、分割封入した。

融解方法は、20℃の水に入れグリセリン層の水晶が溶けたのを確認した後、ストロー内の各層を混合し、38℃に加温しながら2分ずつ6%、4%、0%グリセリン液に胚を移しながらグリセリン除去を行った。

(2) ステップワイズ凍結法

10%グリセリンを用いて、既報に従って実施した。すなわち、胚を20%子牛血清を含む修正PBSを基礎媒液とした3.3%、6.7%グリセリン溶液に5分間ずつ平衡させ、10%グリセリン溶液に浸漬して、ストローに封入し、プログラムフリーザーで凍結を行った。

融解は、液体窒素から取り出したストローを室温で約10秒間保持した後、37℃の微温湯中に投入して行った。回収した胚を20%子牛血清を含む10%シュークロース添加の修正PBSを基礎媒液とした

10%、6.7%、3.3%グリセリン溶液に、順に5分間ずつ浸漬してグリセリン除去を行い、発生培地で洗浄して培養に供した。

5) 切断胚の評価

既報<sup>13,17)</sup>を基に表-1のとおり4段階に設定し、融解後それぞれ6、24、48、72時間目に調査した。

実験II 性判別胚のガラス化保存後の受胎率

1) 供試胚

発情後7日目に回収された体内胚、後期桑実胚～初期胚盤胞期胚のA～Bランクを用いた。

2) バイオプシーの方法

実験Iと同様の方法で行った。採取する部分は、内細胞塊を避け、細胞数個～数十個を採取するよう心掛けた。

3) 胚の培養

実験Iと同様の組成の培地を用いて、1胚ずつ100μlのドロップを作成し、培養した。培養時間は、5～6時間の短時間培養区および20～21時間の長時間培養区を設定した。

4) 胚の凍結および融解方法

切断、培養後、胞胚腔の回復を確認した胚につ

表-1 切断胚の品質判断基準

good	輪郭明瞭、色調明るい、変性部位がほとんどない (胞胚腔の回復100~75%)
fair	輪郭明瞭、色調良好、変性部位が10~30% (胞胚腔の回復75~25%)
poor	輪郭やや不鮮明、色調やや暗い、変性部位が30%以上、体積が減少 (胞胚腔の回復25~0%)
deg	体積が著しく減少、死滅していると思われるもの

( ) 内は融解6時間後

表-2 生検胚の凍結保存後の生存性および品質 — 6時間後 —

	凍結方法	供試胚数	生胚数(%)	生存胚の品質(%)			
				good	fair	poor	deg
生検区	ガラス化保存法	43	43(100.0)	25( 58.1)	12( 27.9)	6( 14.0)	0( 0.0)
	ステップワイズ法	45	45(100.0)	28( 62.2)	15( 33.3)	2( 4.4)	0( 0.0)
	新鮮胚	22	22(100.0)	22(100.0)	0( 0.0)	0( 0.0)	0( 0.0)
対照区 (無処理)	ガラス化保存法	22	22(100.0)	20( 90.9)	2( 9.1)	0( 0.0)	0( 0.0)
	ステップワイズ法	22	22(100.0)	17( 77.3)	4( 18.2)	1( 4.5)	0( 0.0)
	新鮮胚	23	23(100.0)	23(100.0)	0( 0.0)	0( 0.0)	0( 0.0)

いてガラス化保存を実施した。

5) 移植

融解後生存の確認された胚を、発情後7~8日目の受胎牛に移植した。移植の決定および移植の実施は、各場所の担当者に一任した。

なお、本試験の成績の一部は、家畜雌雄産み分け技術利用促進事業により、農水省家畜改良センター指導の基、実施された共同試験の結果である。

結 果

(実験 I) バイオプシー胚のガラス化保存後の生存性

ガラス化保存した胚は、ストローから取り出した直後は保存前と同じ形状を呈し、ガラス化保存による細胞の損傷は観察されなかった。しかし、脱グリセリンを進めていくうちに胚の収縮が進み、0%グリセリン液に投入すると供試した全ての胚に胞胚腔が観察できない程の収縮が観察された。ステップワイズ法では、ストローから取り出

した直後から多くの胚で収縮が観察され、ガラス化同様0%グリセリン液に投入する時点で、全ての胚に収縮が認められた。胞胚腔の回復は、融解後培養開始とともに一部の胚で始まった。

融解後6時間での無処理の胚における胞胚腔の回復状況は、goodがガラス化保存区で90%、ステップワイズが77%であったのに対して、バイオプシー胚は、ガラス化保存区58%、ステップワイズ62%と回復は遅かった。しかし、ガラス化保存とステップワイズの間に差は認められなかった。

その後融解24、48、72時間後の胚の生存性は、バイオプシー胚のガラス化保存法で、95.3、95.3、81.4%、ステップワイズ法で77.8、73.3、71.1%、その他の区は終始100%であった。バイオプシー胚の保存方法として、ガラス化保存法の方がステップワイズ法より融解後の生存性が高い傾向が認められた。

また、胚の品質は、生存胚に対するgoodの割合は、どちらの区もほぼ同様であった。

表-3 バイオプシー胚の凍結保存後の生存性および品質 — 24時間後 —

	凍結方法	供試胚数	生胚数(%)	生存胚の品質(%)			
				good	fair	poor	deg
生検区	ガラス化保存法	43	41(95.3)	28(65.1)	8(18.6)	5(11.6)	2(4.6)
	ステップワイズ法	45	35(77.8)	25(55.6)	9(20.0)	1(2.2)	10(28.6)
	新鮮胚	22	22(100.0)	22(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
対照区 (無処理)	ガラス化保存法	22	22(100.0)	3(13.6)	19(86.4)	0(0.0)	0(0.0)
	ステップワイズ法	22	22(100.0)	0(0.0)	18(81.8)	4(18.8)	0(0.0)
	新鮮胚	23	23(100.0)	11(47.8)	12(47.8)	0(0.0)	0(0.0)

表-4 バイオプシー胚の凍結保存後の生存性および品質 — 48時間後 —

	凍結方法	供試胚数	生存胚数(%)	生存胚の品質(%)			
				good	fair	poor	deg
生検区	ガラス化保存法	43	41(95.3)	34(79.1)	1(2.3)	1(2.3)	7(16.3)
	ステップワイズ法	45	33(73.3)	31(68.9)	2(4.4)	0(0.0)	12(26.7)
	新鮮胚	22	22(100.0)	22(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
対照区 (無処理)	ガラス化保存法	22	22(100.0)	19(86.4)	2(9.1)	1(4.5)	0(0.0)
	ステップワイズ法	22	22(100.0)	16(72.7)	5(22.7)	0(0.0)	1(4.5)
	新鮮胚	23	23(100.0)	20(87.0)	3(13.0)	0(0.0)	0(0.0)

以上の結果から、ガラス化保存法はステップワイズ法と同等もしくはそれ以上の生存率が得られることが明らかとなった。この結果を踏まえて、野外における性判別胚の受胎率を検討する際の胚の保存方法としてガラス化保存法を検討することとした。

(実験Ⅱ) 性判別胚のガラス化保存後の受胎率

体内胚においても、融解直後、全ての胚が保存前と同様の形状を呈していた。しかし、グリセリン除去を進めるに従って胞胚腔の25~50%が凝縮した。その後、移植用の培養液に移してから、全ての胚で胞胚腔の回復が認められた。

性判別胚の移植成績は、表-6のとおり新鮮胚移植で、81.8%であったに対して、ガラス化保存胚は28.6%と大きく下回った。

考 察

実験Ⅰにおいて、ガラス化保存後の切断体外胚の生存性は、ステップワイズ法と同等もしくは、それ以上の生存率が得られることが明らかとなった。バイオプシー胚の凍結融解後の生存率については、本試験と同様にグリセリンを用いた緩速凍結法において、山中ら<sup>16)</sup>は体外胚で69.7~89.7%、後藤ら<sup>3)</sup>が体内胚で68.8%の成績を得ている。ガラス化保存については、Agcaら<sup>1)</sup>が細胞吸引によるバイオプシー後73%の胚が再拡張し、61%が孵化したと報告している。手法は、異なるが今回の結果はこれらの成績を上回った。

ガラス化保存法は、従来の緩速凍結法に比較して、プログラムフリーザーを必要とせず、凍結に要する時間が大幅に短縮できる。そのため採卵、胚の切断および検体採取、培養といった過程を経なければならない性判別胚の保存方法としてはガラス化法が作業効率上も有用であると考えられる。

表-5 バイオプシー胚の凍結保存後の生存性および品質 — 72時間後 —

	凍結方法	供試胚数	生存胚数(%)	生存胚の品質(%)			
				good	fair	poor	deg
生検区	ガラス化保存法	43	35(81.4)	35(81.4)	0(0.0)	0(0.0)	8(18.6)
	ステップワイズ法	45	32(71.1)	31(68.9)	1(2.2)	0(0.0)	13(28.9)
	新鮮胚	22	22(100.0)	22(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
				Hed	ing~ExB	Bl	deg
対照区 (無処理)	ガラス化保存法	22	22(100.0)	21(95.5)	19(86.4)	0(0.0)	0(0.0)
	ステップワイズ法	22	22(100.0)	19(86.4)	2(9.1)	0(0.0)	1(4.5)
	新鮮胚	23	23(100.0)	23(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)

表-6 性判別ウシ胚のガラス化保存後の受胎性

	培養時間	移植頭数	受胎頭数(%)
ガラス化保存胚	短時間	3	0(0.0)
	長時間	11	4(36.4)
	計	14	4(28.6)
新鮮胚	短時間	2	1(50.0)
	長時間	9	8(88.9)
	計	11	9(81.8)
	合計	25	13(52.0)

実験Ⅱの野外における移植試験の受胎率は、28.6%となり、新鮮胚移植の81.8%を大幅に下回った。新鮮胚移植については良好な成績を得られており普及性は高いと考えられる。ガラス化保存胚は同時期の無処理の凍結胚の受胎率（エチレングリコールダイレクト法、39.9%）に比較しても低い受胎成績となった。しかし、井上ら<sup>6)</sup>は、同様の方法で50.0%の受胎率を報告している。富永ら<sup>13)</sup>は、切断胚の培養時間は3~4時間程度が望ましいとし、長時間の培養は移植後産子への発生能が低下するとしている。本試験では、性判別後移植に供した体内胚の約8割(11/14)を切断後20hの長時間培養の後ガラス化保存に供している。今後は、短時間培養後のガラス化保存についても例数を増やしてさらに検討を要すると思われる。

さらに、実用化のためには、融解後グリセリン除去の過程で、胚の収縮が認められること、移植の際、胚のストロー詰め直しを実施しなければならないことなど、課題が多く今後も技術開発に努めていきたい。

#### 謝 辞

卵巣採取にご協力いただいた金沢食肉公社および金沢市食肉衛生検査室の皆様、ならびに移植にご協力いただいた受胚牛繋養農家および移植師の皆様に感謝の意を表します。

#### 引用文献

- 1) Agca.Y et al, Post-thaw survival and pregnancy rates of biopsied, sexed and vitrified bovine IVF embryos, *Theriogenology*, 43, 153 (1995)
- 2) Agca.Y et al, Normal calves from transfer of biopsied, sexed and vitrified IVP bovine embryos, *Theriogenology*, 50, 129-145 (1998)
- 3) 後藤充宏ら、PCR法によるウシ胚の性判別と臨床応用、*日本胚移植学雑誌*、17、19-25 (1994)
- 4) Herr.C.M and Reed.K.C., Micromanipulation of bovine embryos for sex determination, *Theriogenology*, 35, 45-54 (1991)
- 5) 堀 登ら、ウシ体外受精培地へのハイポタウリン添加が受精および胚発生に及ぼす影響, *J. Reprod.Dev.*, 43, j33 - j40 (1997)
- 6) 井上直弘ら、牛操作胚のガラス化保存及び希釈方法の検討、第95回日本畜産学会大会要旨
- 7) Ishimori.H et al, Vitrification of bovine embryos in a mixture of Ethylene glycol and Dimethyl sulfoxide, *Theriogenology*, 40, 427-433 (1993)
- 8) Itagaki.Y et al, Sexing of bovine embryos with Male-Specific repetitive DNA by Polymerase Chain Reaction : Sexing of bovine embryos and production of calves with predicted sex, *J.Reprod.Dev.*, 39, 65-72 (1993)
- 9) Kuwayama.M et al, Vitrification of bovine blastocysts obtained by in vitro culture of oocytes matured and fertilized in vitro., *J.Reprod.Fert.*96, 187-193 (1992)
- 10) Niemann.H et al, An approach to successful freezing of demi-embryos derived from day-7 Bovine embryos, *Theriogenology*, 25, 519-524 (1986)
- 11) Picard.L et al, Production of sexed calves from frozen-thawed embryos, *Vet.Record*, 117, 603-608 (1985)
- 12) Rall.W.F et al, Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification, *Nature*, 313, 573-575 (1985)
- 13) 富永敬一郎ら、牛分断胚の凍結、繁殖技術会誌、13, 65-75 (1991)
- 14) Utsumi.K et al, Sex Determination of Bovine Embryos by the Polymerase Chain Reaction Using Y-Specific Primers, 38, 35-43 (1992)
- 15) 渡辺伸也ら、PCR法によるウシ胚の性判別技術の検討、*日畜会報*、63, 715-720 (1992)
- 16) 山中昌哉・板垣佳明・木村直子・須藤鎮世、バイオプシーした牛胚の凍結-融解後の体外での生存性、*日本胚移植学雑誌*、17, 6-12 (1995)
- 17) 吉羽宣明ら、牛分割受精卵の凍結保存技術、*埼玉畜試研報*、33, 33-37 (1995)