

超急速ガラス化保存したウシ性判別胚による産子生産

高田広達・谷口俊仁・黒田順史¹・樽本英幸・中本和弘

和歌山県農林水産総合技術センター 畜産試験場

Calf Production from Bovine Sexed-Embryos Vitrified by an Ultra-Rapid Cooling

Hirotatsu Takada, Shunji Taniguchi, Yorifumi Kuroda¹, Hideyuki Tarumoto and Kazuhiro Nakamoto

Livestock Experiment Station

Wakayama Research Center of Agriculture, Forestry and Fisheries

緒 言

ウシの雌雄産み分け技術は、乳用種の乳生産のための雌畜や肉用種の増体に優れた雄畜の効率的生産などを目的に利用されており、性選別精液 (Seidel ら, 1999) や性判別胚 (Lopes ら, 2001) を用いる方法がある。現在のところ、国内における性選別精液の販売はホルスタイン種の雌畜生産用に限定されているが、性判別胚では任意の品種・血統の胚で性判別できる利点がある。

従来、胚の性判別はバイオプシーした胚の一部をサンプルとして、DNA の増幅をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) でおこない、得られた増幅産物を電気泳動してオス特異的バンドを検出することでおこなっていた。近年、新たに開発された LAMP 法 (副島・渡辺, 2003) による性判別は、一定温度で DNA 増幅反応が進行し、特異性および増幅効率が高く、増幅の有無を反応副産物による白濁で判定できる。反応開始から判定までにかかる時間は 1 時間で、PCR 法が 3 時間要するのにくらべて大きく短縮できるため、PCR 法に代わる胚の性判別法になっている。

胚の凍結保存法はワンステップ法 (Leibo, 1984) やダイレクト法 (Dochi ら, 1998) などの緩慢凍結法とガラス化保存法に大別される。ダイレクト法は融解後、凍結保護剤の除去操作をすることなく直接移植がおこなえる方法で、性判別などの体外操作をおこなっていない胚 (Intact 胚) の最も一般的な凍結方法である。しかし、性判別胚はサンプル採取の際に胚が損傷を受けるため耐凍能が低く、ダイレクト法では受胎率が低下することが問題であった (Picard ら, 1985)。ガラス化法は液体窒素での保存時に氷晶が形成されないため、細胞への物理的障害の発生が低減できる。また細胞などにとって危険とされる温度域に曝される時間を短縮することが可能となる点などの有効性を持っている。ガラス化保存法はさらに、移植用ストローを用いる方法 (Ishimori ら, 1993) と、超急速ガラス化保存法に分けられる。GL-Tip 法 (Tominaga and Hamada, 2001) やオープンブロードストロー法 (Vajta ら, 1998)、マイクロドロップレット法 (Papis ら, 1999)、クライオトップ法 (Kuwayama ら, 2005) などに代表される超急速ガラス化保存法は、ストロー法よりもガラス化液を微量化し、冷却速度を速めることにより胚の生存性が高まるため、性判別胚や体外受精胚のような耐凍能の低い胚の保存に適していることが報告されている。しかし、超急速ガラス化胚は実験室内で顕微鏡を用いての融解およびストロー詰めしたうえで移植に供する手法が一般的であり、融解後直接受胎牛に移植ができないことが現場普及への弊害となっている。そこで、超急速ガラス化保存

¹現在：紀北家畜保健衛生所

した性判別胚を移植現場で融解および移植する方法を試み、受胎性や性一致率などを調査した。

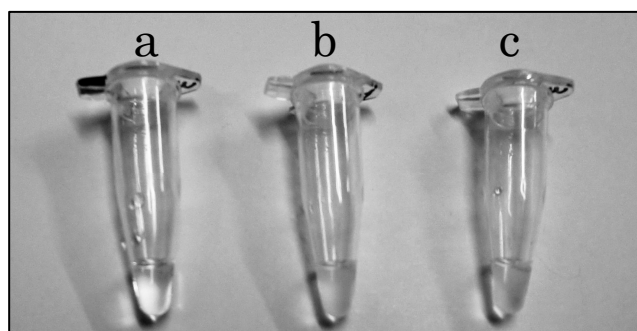
材料および方法

1. 供試胚

供試胚は当场飼養の黒毛和種雌牛に卵胞刺激ホルモン製剤 (FSH, アントリン R10, 川崎三鷹製薬) 20AU を 3 日間漸減投与し, FSH 処理開始 48 時間後および 56 時間後にプロスタグランジン F2 α 類縁体クロプロステノール (レジプロン C, あすか製薬) を投与して過剰排卵処置を施し, 人工授精 (AI) して作出した. AI 後 7 日目に子宮角灌流法により胚を採取後, 実体顕微鏡下で品質評価をおこない高品質胚 (A, B ランク) を供試した.

2. 性判別

マイクロマニピュレータ (M0-202U, NARISHIGE) に装着したバイオカットブレード (K-715, FEATHER) を用いて胚の全細胞の 10% 程度をバイオプシーした. 切除した部分をサンプルとして Loopamp 牛性判別試薬キット (LMP001, 栄研化学) および Loopamp エンドポイント濁度測定装置 (LA-100, テラメックス) を用い, LAMP 法により性判別をおこなった (第 1 図). LAMP 法において雌雄共通遺伝子検出液で混濁が生じない場合, その胚は判定不能とした.



第 1 図 LAMP 法による性判別

a: 白濁なしのメス判定 b,c: 白濁ありのオス判定

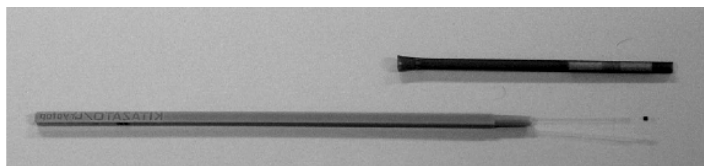
3. バイオプシー胚の培養

性判別用のサンプル採取後の胚は 100 μ M β -メルカプトエタノール (M6250, SIGMA) を添加した 20%ウシ胎子血清 (FBS, 26140-087, GIBCO) 加 TCM199 (12350-039, GIBCO) を用いて 38.5 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 95% 空気, 飽和湿度で 3 時間の修復培養後, 生存が確認されたバイオプシー胚を超急速ガラス化をおこなった.

4. 超急速ガラス化

修復培養後, 7.5% エチレングリコール (EG, 058-00986, 和光純薬), 7.5% ジメチルスルホキシド (DMSO, 07-4860, 片山化学) を添加した 20% FBS-TCM199 を用い, 3 分間平衡した後 15% EG, 15% DMSO, 0.5M シュクロース (S1888, SIGMA) を添加した 20% FBS-TCM199 (ガラス化液) に 1 分間浸漬することでおこなった.

バイオプシー胚を最小容量のガラス化液とともにクライオトップ (第 2 図, 北里バイオファルマ) 先端部に載せ, 液体窒素内に投入し, ストローキャップをかぶせて保存した.

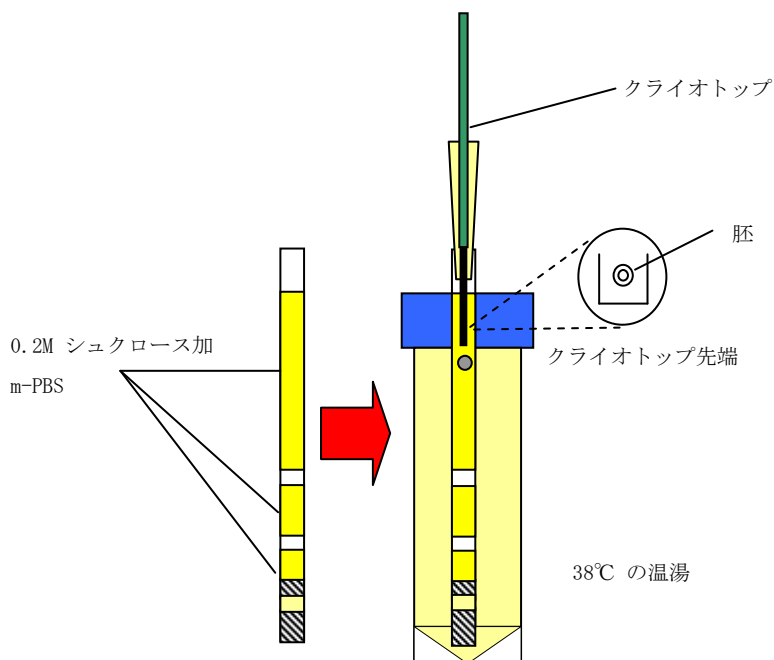


第2図 超急速ガラス化保存に用いたクライオトップ

5. 胚の融解および移植

受胎牛には発情発見日から7または8日目に直腸検査を実施し、移植可能な黄体が存在する当场飼養交雑種を用いた。胚移植用ストロー内に予め0.2M シュクロース加 m-PBS (14200-075, GIBCO) を充填し、38°Cの温湯を入れたプラスチック試験管内で保温した状態でクライオトップ先端部を挿入することで、胚をストロー内に導入した(第3図)。その後、2分間保温静置した後、そのまま移植器に装着して受胎牛の黄体側子宮角に1胚ずつ移植した。

受胎の確認は胎齢40から50日で超音波診断装置(HS-1500, 本田電子)により実施した。



第3図 クライオトップにより超急速ガラス化保存した胚の融解方法

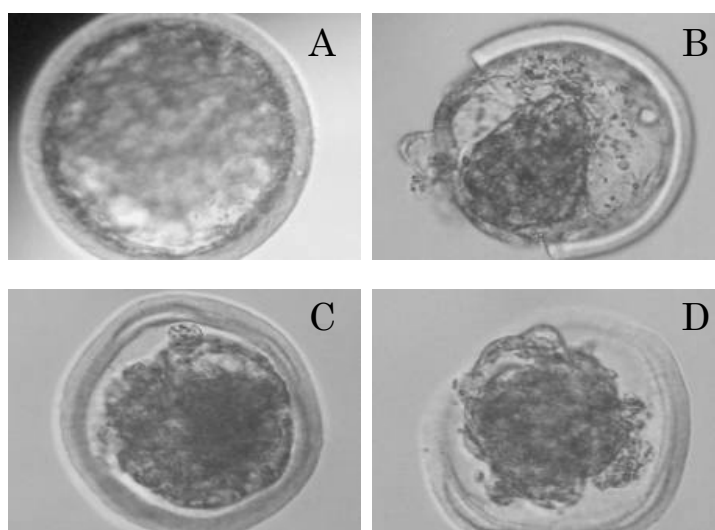
結果

1. 胚の性判別

採卵を3回おこなったところ、合計48個の胚を採取した。そのうち高品質胚17個についてバイオプシーおよびLAMP法による性判別をおこなったところ、オス判定6例、メス判定10例、判定不能1例であった(第1表、第4図)。

第1表 採卵および胚の性判別成績

採卵 No.	採取胚数	性判別数	判 定		
			♂	♀	不明
1	20	1	0	1	0
2	14	3	1	2	0
3	14	13	5	7	1
合計	48	17	6	10	1



第4図 性判別胚のバイオブリー前の形態の変化

A: 胚 No. 1175 バイオブリー前 B: 胚 No. 1175 バイオブリー後 (性判定結果: オス)
C: 胚 No. 1185 バイオブリー前 D: 胚 No. 1185 バイオブリー後 (性判定結果: メス)

2. 胚移植および産子作出

10頭の受胎牛に移植したところ3頭が受胎を確認し、受胎率は30.0%であった(第2表)。受胎した3頭はそれぞれ産子を分娩し、うち1頭は死産であったが、産子の性別はすべてLAMP法による性判別結果と一致(第5図)し、性一致率は100%であった。産子の生時体重は22.6, 32.5および42.0kgであった。

第2表 超急速ガラス化性判別胚の移植成績

移植 No.	移植年月日	胚 No.	性判定	妊否	産子
1	H21. 4. 1	1142	♀	—	
2	H21. 9. 17	1182	♀	—	
3	H21. 9. 17	1183	♀	—	
4	H21. 10. 9	1175	♂	+	♂ (22.6kg)
5	H21. 11. 4	1177	♀	—	
6	H21. 11. 25	1184	♂	—	
7	H21. 11. 25	1181	♂	+	♂ (死産, 32.5kg)
8	H21. 11. 25	1176	不明	—	
9	H21. 12. 17	1185	♀	+	♀ (42.0kg)
10	H21. 12. 25	1186	♂	—	



第5図 超急速ガラス化保存性判別胚由来産子

A: 胚 No. 1175 由来のオス子牛 (胚の性判定: オス)

B: 胚 No. 1185 由来のメス子牛 (胚の性判定: メス)

考 察

ウシの性判別胚を農家段階で利用するために、その凍結保存技術の確立が求められている。Intact胚の凍結に使われている緩慢凍結法でのバイオプシー胚の保存では高位安定的な受胎率が得られなるとされていたが、高濃度の耐凍剤を利用したガラス化保存法がバイオプシー胚の凍結保存に適していることが報告された (Ishimori ら, 1993)。しかし、高濃度の耐凍剤の除去のため、ガラス化保存胚は実験室内融解するのが一般的であり、このことが現場普及への弊害となっている。そこで今回我々はクライオトップ法によるガラス化保存胚の現場での融解および移植を試みた。クライオ

トップ法は GL-Tip 法やオープンブロードストロー法よりも凍結時のガラス化液量が少なく、胚が直接液体窒素に触れるため冷却速度が速くなり、耐凍剤の毒性および浸透圧障害による影響が少ないと考えられている。

移植において、移植頭数 10 頭のうち受胎頭数 3 頭の受胎率 30% となった。また、生まれた産子の体重は黒毛和種の一般的な生時体重と同等であった。移植頭数が少ないため、野外での融解が受胎率に及ぼす影響はあきらかにできなかったものの、一連の作業をすべて野外でおこなえるため現場普及への可能性が期待される結果となった。また、この野外融解および移植技術は体外受精胚にも応用可能であると考えられるため、牛群改良速度の向上が期待される。

性判別において、判別不能が 1 例認められたが、これは採取時にサンプルを紛失したことによるものであった。また、産子の性別はすべて性判別結果と一致し、性一致率は 100% となった。今回の試験で我々が性判別に用いた LAMP 法は従来の PCR 法と比較して、DNA の増幅効率がよく、雌雄判定に電気泳動を必要としないため、性判別にかかる時間が短縮できる。

以上の結果から、超急速ガラス化保存した性判別胚を野外で融解および移植することにより産子が生産できることが示された。今後は、フィールドでの実用化を図るため、希釈時間や温度条件などについてより簡便で利用しやすい野外融解法について検討をおこなう必要があると考えている。

摘 要

超急速ガラス化保存したウシ胚の直接移植技術の確立を目的に、LAMP 法による性判別およびクライオトップを用いて超急速ガラス化保存したバイオプシー胚の野外での融解および移植を試み、受胎性や性一致率を調査した。その結果、10 頭中 3 頭が受胎・分娩し、産子の性別はすべて性判別結果と一致した。

引用文献

- Dochi, O. , Y. Yamamoto, H. Saga, N. Yoshiba, N. Kano, J. Maeda, K. Miyata, A. Yamauchi, K. Tominaga, Y. Oda, T. Nakashima and S. Inohae. 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
- Ishimori, H. , K. Saeki, M. Inai, Y. Nagao, J. Itasaka, Y. Miki, N. Seike and H. Kainuma. 1993. Vitrification of bovine embryos in a mixture of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. *Theriogenology*. 40: 427-33.
- Kuwayama, M. , G. Vajta, O. Kato and SP. Leibo. 2005. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reproductive BioMedicine Online* Vol 11. No 3. 300-308.
- Leibo, SP. 1984. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*. 21: 767-790.
- Lopes, RF. , F. Forell, AT. Oliveira and JL. Rodrigues. 2001. Splitting and biopsy for bovine embryo sexing under field conditions. *Theriogenology*. 56: 1383-92.
- Papis, K. , M. Shimizu and Y. Izaike. 2000. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology*. 54: 651-8.
- Picard, L. , WA. King and KJ. Betteridge. 1985. Production of sexed calves from frozen-thawed embryos. *Vet. Rec.* 117: 603-608.

- Seidel, GE. Jr. , JL. Schenk, LA. Herickhoff, SP. Doyle, Z. Brink, RD. Green and DG. Cran. 1999. Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology*. 52:1407-20.
- 副島隆浩・渡辺恵子. 2003. 新しい遺伝子増幅法 (LAMP 法) の原理と性判別への応用. *日本胚移植学雑誌*. 25: 92-98.
- Tominaga, K. and Y. Hamada. 2001. Gel-Loading Tip As Container for Vitrification of In Vitro-Produced Bovine Embryos. *J. Reprod. Dev.* 47: 267-273.
- Vajta, G. , P. Holm, M. Kuwayama, PJ. Booth, H. Jacobsen, T. Greve and H. Callesen. 1998. Open Pulled Straw(OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. 1998. *Mol Reprod Dev.* 51: 53-8.

