

ウシ胚のガラス化保存法の検討

沼田恵・相澤健一・小林政樹・千田惣浩・小西潤一

(秋田県畜産試験場)

Vitrification of Bovine Embryos

Megumi NUMATA, Kenichi AIZAWA, Masaki KOBAYASHI, Michihiro CHIDA and Junichi KONISHI

(Akita Prefectural Livestock Experiment Station)

1 はじめに

ウシ胚のガラス化保存法は、高濃度の耐凍剤溶液が、液体窒素中に投入されることでガラス化状態を形成し、冷却時の胚の細胞内外における氷晶形成を抑制して物理的傷害を回避できる。それにより、生体由来胚のみならず、生検胚や体外受精胚などについて融解後の生存性や受胎性の向上が期待される。本試験では、胚の受胎性の向上を図るため、電気泳動の際にサンプルをゲルに流し込むために使用されるゲルローディングチップ(GL-Tip)を用いることにより、さらに冷却速度を速めた超急速ガラス化保存法について検討したので報告する。

2 試験方法

(1)胚のガラス化保存法¹⁾

平衡液(A液): 10%EG+10%DMSO+20%FCS+TCM199

ガラス化保存液(B液):

20%EG+20%DMSO+20%FCS+0.6MSu+TCM199

注) EG: エチレングリコール、DMSO: ジメチルスルホキシド、Su: スクロース、FCS: 牛胎児血清、

TCM199: 基本液

全ての操作は37°Cに加温したウォームプレート上で行った。供試胚は当試験場所有の黒毛和種牛に過剰排卵処理をし、人工授精後7日目に回収したA~Bランク胚を用いた。胚をA液(50 μ l $\times$ 3)に2分間浸漬し、その間に作成しておいたB液のドロップ(7 μ l $\times$ 2, 1 μ l $\times$ 1)に胚を移し30秒間浸漬した。その時間以内に、あらかじめ先端を10mm程切断したGL-Tip(図1)をオートピペットに取り付け、ガラス化液とともに胚を吸引し、チップ先端部を液体窒素に浸漬してガラス化した。先端部を液体窒素に漬けたままチップをオートピペットから外し、3cm程カットして切れ目を入れた0.5mlストローに差し込み(図2)、融解まで液体窒素ボンベで保管した。

(2)ガラス化保存胚の融解方法

融解液

C液: 0.3MSu+20%FCS+TCM199

D液: 0.15MSu+20%FCS+TCM199

E液: 20%FCS+TCM199

全ての操作は37°Cに加温したウォームプレート上で行った。C、DおよびE液を4穴プレートに分注して、液体窒素から取り出したGL-Tipの先端部をC液に浸漬し、オートピペット接続部をふさぐことで胚をウェルに移動

させた。1分間保持後、D液に移し5分間浸漬した後E液に移した。

(3)胚の培養

融解した胚を培養液(0.1M β メルカプトエタノール+20%FCS+TCM199)に移し、38.5°C, 5%CO₂, 95%空気の下で培養した。胚の形態を24, 48および72時間後に観察し、ステージの進んだ胚を生存と判定した。試験区は胚をガラス化保存・融解した区(GL-Tip区)と10%グリセリンを耐凍剤として緩慢凍結しステップワイズ法で融解した区(SW区)を設けた。

(4)胚の移植

試験区はGL-Tip区とSW区および新鮮胚移植を行った新鮮区の3区とした。GL-Tip区は、胚の融解後0~2時間培養してから0.25mlストローに吸引し、県内農家所有の黒毛和種またはホルスタイン種に移植した。SW区および新鮮区については、GL-Tip区と同一試験年度に、同一移植師が同一農家に移植した成績を収集し、比較した。

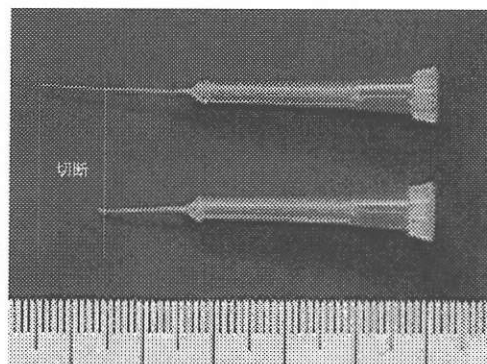


図1 ゲルローディングチップ

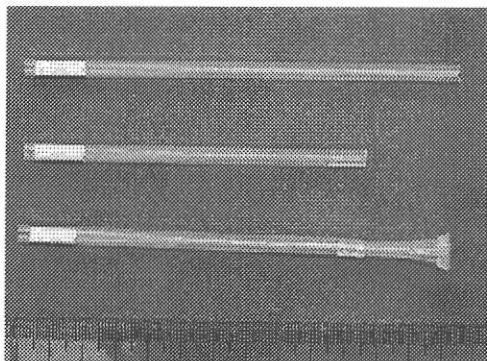


図2 ゲルローディングチップ保管方法

3 試験結果及び考察

(1)培養試験

培養から24,48および72時間後の生存率は、GL-Tip区ではそれぞれ91.7%,66.7%および58.3%で脱出胚盤胞率は50.0%であった。SW区ではそれぞれ90.0%,80.0%および80.0%で脱出胚盤胞率は70.0%であった。GL-Tip区とSW区の間で培養時間毎の生存率と脱出胚盤胞率に有意な差は認められなかった。

(2)移植試験

GL-Tip区では21頭に移植し、8頭が受胎して受胎率は38.1%であった。またSW区では32頭に移植したうち12頭が受胎して受胎率が37.5%、新鮮区では10頭に移植したうち5頭が受胎して受胎率が50.0%であり、試験区間に有意な差は認められなかった。このように、GL-Tip区の受胎率は他の2区と比較して遜色なく、GL-Tipによる超急速ガラス化保存法の実用性が確認された。

表1 胚の融解後の生存性

試験区	胚数	生存胚数(%)			脱出胚数(%)
		24時間	48時間	72時間	
GL-Tip	12	11(91.7)	8(66.7)	7(58.3)	6(50.0)
SW	10	9(90.0)	8(80.0)	8(80.0)	7(70.0)

表2 胚の受胎性

試験区	移植頭数	受胎頭数	受胎率
GL-Tip	21	8	38.1%
SW	32	12	37.5%
新鮮	10	5	50.0%

4 まとめ

GL-Tipを用いてウシ胚の超急速ガラス化保存を行い、融解後の生存性や受胎性について検討した結果、緩慢凍結した胚や新鮮胚と比較して遜色なく、その実用性が確認された。

引用文献

- 1) 富永敬一郎, 浜田由佳子. 2001. ウシ体外受精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(1): 19-26.