

牛性別判定受精卵の凍結融解後の生存性

秋山清・仲沢浩江・仲沢慶紀・岸井誠男

Survival of Cryopreserved Bovine Embryo after Sex Detection

Kiyoshi AKIYAMA, Hiroe NAKAZAWA, Yoshinori NAKAZAWA and Yoshio KISHII

性別判定された分割卵の新鮮卵及び凍結卵での生存性、受胎性を向上するために本試験を行った。分割卵の凍結融解後の生存性はステップワイズ法がワンステップ法に比べて高かったが、いずれも無処置卵の生存率に比べて低い結果であった。また、分割卵の修復培養時間の延長による凍結融解後の生存性の低下は認められず、修復培養後の分割卵の形態品質の低下に伴い凍結融解後の生存性が低下する傾向であった。移植後の受胎率は新鮮卵移植では無処置卵と同等の成績であったが、凍結卵移植ではステップワイズ法、ダイレクト法ともに無処置卵に比べて受胎率が低下した。また、凍結卵では染色体標本の分裂指数の低下が認められ、形態的に生存と判定された分割卵であっても凍結保存による生存性の低下を示すものと考えられる。

キーワード：牛、受精卵、性別判定、新鮮卵、凍結卵、受胎率

産子の性別をコントロールし、計画的に雌雄を産み分けることができれば、家畜の改良増殖の効率化と経営の安定化に対する効果は大きいと考えられる。牛の雌雄産み分け技術は性別判定された受精卵を移植に用いることにより可能となっている¹⁾²⁾が、実用技術として野外で活用するに当たっては、性別判定の精度が高く、受精卵の生存性や受胎性を低下させないことが必要である。一般に移植後の受胎率は新鮮卵に比べて凍結卵が低く³⁾、雌雄産み分けのために細胞を切除された受精卵

(以下、分割卵)では凍結卵の受胎率低下が懸念される。分割卵は顕微操作により透明帯を除去され、性別判定に必要な検査用細胞を切除されているため受精卵を構成する細胞数の減少と分割操作による物理的な障害を受けているものと考えられる。また、凍結融解過程において細胞が耐凍剤溶液や氷晶に直接曝されるなどの外的な感作を受けやすい状況にあると考えられる。そこで、分割卵の空透明帯への再収納⁴⁾や数時間の修復培養後⁵⁾による形態回復などの処置後に移植や凍結保存に用いられている。本試験では雌雄産み分け技術の実用化を目的として、分割卵の新鮮卵及び凍結卵での生存性、移植後の受胎性について

検討を行った。

材料及び方法

(1) 供試材料

黒毛和種雌牛を供卵牛として過剰排卵処理を施し、人工授精後7～8日目に採取した後期桑実胚から拡張胚盤胞までの移植可能卵を試験に用いた。

(2) 受精卵の顕微操作

受精卵は発育ステージ及び品質ランクを記録後、プロネース処理、シュークロース処理、またはサイトカラシン処理⁶⁾を行い、性別判定のための検査用細胞を分割した。分割操作は倒立顕微鏡下でマイクロマニピュレーターに接続した金属刃 (FEATHER BIO-CUT No. 715) により、受精卵の細胞を10～30%程度を切除することにより行った。

(3) 分割卵の修復培養

分割卵は凍結保存までの間、分割面の修復培養を3～5時間または16～20時間行った。修復培養は5%子牛血清 (以下、CS) 添加TCM199 (25mM HEPES緩衝、Ear1塩、GIBCO) 中で38.5℃、5%CO₂、95%空気の条件で卵丘細胞と共培養、または5%CS添加TCM199中で38.5℃、

5%CO₂、5%O₂、90%N₂の条件により行った。

修復培養後の分割卵は形態観察により次の4群に分類した。Ⅰ型：内部細胞塊と栄養膜細胞が明瞭な胚盤胞の形態に発育したもの。

Ⅱ型：内部細胞塊及び栄養膜細胞の発育が認められるが変性細胞等の付着するもの。Ⅲ型：

胞胚腔の形成が認められないもの。Ⅳ型：変性細胞や胞状化細胞の集合体

(4) 分割卵の凍結保存及び融解

ア. ステップワイズ法

10%グリセリン及び20%CS添加修正PBSを凍結溶液として分割卵を室温で30分間平衡し、0.25mlストローへ充填した。凍結はストローをプログラムフリーザー（共立バイオ、アルコール液層式）の-7℃冷却槽に投入し、2分後に植氷、さらに8分間保持した後に、-35℃まで0.3℃/分で降下させ、液体窒素中へ投入した。融解はストローを空气中で10秒間保持後、35℃温水中で氷晶が消えるまで保持して行った。分割卵をストローから押し出し、6%、3%、0%グリセリン及び0.3Mシュウクロース添加した修正PBSにそれぞれ5分間浸せきし、20%CS加修正PBS中で洗浄して耐凍剤を段階的に希釈除去した。

イ. ワンステップ法

10%グリセリン0.2Mシュウクロース及び20%CS添加修正PBSを凍結溶液として分割卵を室温で30分間平衡し、0.25mlストローへ充填した。冷却は-7℃プログラムフリーザーに直接投入し、2分後に植氷、さらに8分間保持した後に、-23℃まで0.5℃/分で降下させ、液体窒素中へ投入した。融解はストローを空气中で5秒間保持後、35℃温水中で氷晶が消えるまで保持して行った。分割卵をストローから押し出し、0.2Mシュウクロース及び20%CS添加修正PBSに3分間浸漬し、20%CS加修正PBS中で洗浄し耐凍剤を一段階で除去した。

ステップワイズ法、ワンステップ法ともに、分割卵は5%CS添加TCM199で卵丘細胞との共培養を行い、融解後1時間及び24時間に形態を観察し、生存性判定を行った。

対照区は同時期に凍結融解された無処置卵（後期桑実胚～拡張胚盤胞）のステップワイズ法による生存成績とした。

ウ. ダイレクト法

10%エチレングリコール及び20%CS添加修正PBSを凍結溶液として、分割卵を室温下で15分間平衡し、0.25mlストローへ充填した。プログラムフリーザーを用いて、-7℃にストローを投入し、2分後に植氷、8分間保持後、-

30℃まで0.3℃/分で冷却し、液体窒素中に保存した。融解は移植現場で行い、ストローを空气中で10秒間保持後、30℃温水中で氷晶が消えるまで保持して行った。

一部の分割卵は分割操作後またはステップワイズ法で融解後に4時間培養した後に0.4μg/mlビンプラスチン5%CS加TCM199中で16時間培養し、牛島らの方法⁽¹⁾に従い染色体標本作製した。5%ギムザ液で染色後、生物顕微鏡下で観察し、総核数と中期核盤数から分裂指数を算出した。

(6) 分割卵の移植

ステップワイズ法では融解後1時間の形態観察により生存と判定された分割卵を移植現場まで輸送後に移植に用いた。ダイレクト法では耐凍剤の除去操作を行わず、ただちに受精卵牛へ移植した。受精卵牛はホルスタイン種未経産牛及び経産牛を用い、発情後7～8日目に黄体側子宮角へ頸管経由法で移植を行った。妊娠鑑定は発情を0日として40日から60日目に直腸検査により行った。

新鮮卵についても修復培養後3～5時間及び16～20時間に同様の条件で移植を行った。

結 果

分割卵の凍結融解後の生存性を表1に示した。対照区である無処置卵の生存率は融解後1時間で90.0%(18/20)、24時間後では80.0%、16/20であった。分割卵の融解後1時間の生存率はステップワイズ法80.0%(12/15)、ワンステップ法72.7%(16/22)であり、24時間後の生存率はそれぞれ73.3%(11/15)、68.2%(15/22)であった。分割卵の凍結融解後の生存率に比べて対照区の無処置卵の方が高い傾向であった。

分割卵の修復培養時間が凍結融解後の生存性に及ぼす影響を表2に示した。融解後1時間の生存率は修復培養3～5時間では88.9%(16/18)、16～20時間では93.3%(28/30)であり、24時間後の生存率ではそれぞれ61.1%(11/18)、83.3%(25/30)であり、16～20時間の修復培養により凍結融解後の生存性が高い傾向となった。

分割卵の修復培養後の形態が融解後の生存性に及ぼす影響を表3に示した。融解後1時間及び24時間の生存率は形態的な損傷の少ないⅠ型では96.4%(27/28)及び78.6%(22/28)、変性細胞が付着するⅡ型では84.6%(11/13)及び76.9%(10/13)、胞胚腔の形成が認められない

表1 分割卵の凍結融解後の生存性

凍結方法	供試 卵数	生存卵数(率)	
		1時間後	24時間後
無処置卵	20	18(90.0%)	16(80.0%)
ステップワイズ [°] 法	15	12(80.0%)	11(73.3%)
ワンステップ [°] 法	22	16(72.7%)	15(68.2%)

表2 修復培養時間が凍結融解後の生存性に及ぼす影響

修復培養 時間	供試 卵数	生存卵数(率)	
		1時間後	24時間後
3～5時間	18	16(88.9%)	11(61.1%)
16～20時間	30	28(93.3%)	25(83.3%)

表3 修復培養後の形態が凍結融解後の生存性に及ぼす影響

凍結時 の形態	供試 卵数	生存卵数(率)	
		1時間後	24時間後
I	28	27(96.4%)	22(78.6%)
II	13	11(84.6%)	10(76.9%)
III	7	6(85.7%)	4(57.1%)

III型では85.7%(6/7)及び57.1%(4/7)であった。

分割卵の移植後の受胎成績を表4に示した。新鮮卵移植では32頭中18頭が受胎し、受胎率は56.3%であった。凍結卵移植ではステップワイズ法では23頭中7頭が受胎し、受胎率は31.4%、ダイレクト法では10頭中3頭が受胎し、受胎率は30.0%であった。無処置卵の受胎率は新鮮卵移植で66.7%、凍結卵移植ではステップワイズ法で47.8%、ダイレクト法で44.8%であった。分割卵の新鮮卵移植では無処置卵と同等の受胎率であったが、凍結卵移植の受胎率は無処置卵に比べて15%前後低い結果であった。

分割卵の染色体標本から算出した分裂指数を表5に示した。分裂指数は凍結融解後の無処置卵では $34.2 \pm 6.0\%$ 、新鮮分割卵では $32.6 \pm 10.7\%$ 、凍結分割卵では $13.0 \pm 11.6\%$ であり、無処置卵や新鮮分割卵の半分以下であった。

考 察

本試験では分割卵を一定時間の修復培養により形態的に回復させた後に新鮮卵移植及び凍結卵移植に用い、生存性や受胎性について調査した。

分割卵の凍結後の培養条件での生存性調査

をステップワイズ法及びワンステップ法で行った。その結果、融解後の生存性はステップワイズ法がワンステップ法に比べて優れていたが、いずれの方法も無処置卵に比べて生存性が低下する傾向であった。しかし、融解後24時間に生存した分割卵は、胞胚腔が拡張し内部細胞塊の明瞭な胚盤胞の形態を示すものが多く認められた。

分割後の修復培養時間の影響について富永ら⁹⁾は二分割卵の凍結保存において、修復培養時間の延長は凍結卵移植の受胎率低下を招くことを報告している。本試験では分割卵の凍結保存は採取当日及び翌日の午前中に行うことを想定して修復培養時間を3～5時間及び16～20時間に設定して試験を行った。その結果、修復培養時間の延長による凍結融解後の生存性は低下しないものと考えられ、吉羽ら²⁾の報告と同様の結果である。また、山中ら⁸⁾は分割卵の品質ランクが凍結融解後の生存性に影響を及ぼすことを示唆し、牛島ら¹⁰⁾は分割卵の移植試験において高品質卵に比べて低品質卵で受胎率の低下が著しいことを報告している。本試験においてもこれらの報告と同様に形態的品質の優れるI型、II型に比べてIII型で融解後の生存性が劣る傾向であった。

分割卵の移植後の受胎率は、新鮮卵移植では無処置卵と同等の成績であり、修復培養に

表4 分割卵の移植後の受胎成績

受精卵	凍結方法	分割卵			無処置卵		
		移植頭数	受胎頭数	受胎率	移植頭数	受胎頭数	受胎率
新鮮卵		32	18	56.3%	6	4	66.7%
凍結卵	ステップワイズ法	23	7	30.4%	161	77	47.8%
	ダイレクト法	10	3	30.0%	161	71	44.8%

表5 凍結融解後の受精卵の分裂指数

受精卵区分	供試卵数	分裂指数*
無処置凍結卵	5	34.2±6.0%
分割新鮮卵	6	32.6±10.7%
分割凍結卵	5	13.0±11.6%

* 中期核盤数/総核数

より形態的に回復を示した分割卵では新鮮卵移植の受胎成績に及ぼす影響は少ないものと考えられる。一方、凍結卵移植ではステップワイズ法、ダイレクト法のいずれも無処置卵の受胎率に比べて低い成績となった。既報の分割卵の移植成績では沼辺ら¹¹⁾、後藤ら⁵⁾、吉羽ら²⁾は凍結卵において無処置卵に比べて受胎率の低いことを種々の凍結方法で報告している。本試験ではステップワイズ法において融解後に生存性確認を行い移植に用いたにも関わらず受胎率が低い結果となった。このことから、凍結保存された分割卵においては凍結融解処理の過程や移植後の発育過程において形態的には判断されない点で何らかの発育性低下を引き起こしているものと考えられる。

IWASAKIら¹²⁾は二重染色法により、凍結融解卵では内部細胞塊に死滅細胞が存在することを報告している。そこで本試験では分割卵の分裂指数を調査した。供試卵の日齢は凍結無処置卵及び新鮮分割卵は受精後7日目、凍結分割卵は受精後7～8日目の日齢に相当し、発育段階を考慮すると分裂指数の厳密な比較はできないが、凍結分割卵では分裂指数の低下が著しいことが認められた。このことから凍結融解後に形態的に生存と判定された分割卵においても、細胞の分裂能力の低下などが引き起こされている可能性があり、凍結融解後の生存性や受胎性の低下を招くものと推察される。

最近、砂川ら¹³⁾、井上ら¹⁴⁾は分割卵をガラス化保存することにより良好な受胎成績が得られることを報告している。今後、凍結手法の改善の検討により分割卵の凍結保存後の受胎率が向上する可能性があるものと推察される。

以上のことから、性別判定された分割卵は、新鮮卵移植では野外で実用化可能な受胎成績が得られる段階に達していると考えられるが、技術普及の中心となると予想される凍結卵移植では受胎率が低く、受胎率の向上を目指して分割卵に適した凍結保存方法の開発が今後必要と考えられる。

文 献

- (1) 牛島仁・江藤哲雄・尾川昭三 1991. 牛半切胚の染色体検査による性判別ならびに性判別胚の移植試験. 家畜繁殖学雑誌. 35:63-68.
- (2) 吉羽宣明・山本信義・福島毅 1996. PCR法による牛胚性判別技術の野外応用. 日本胚移植学雑誌. 18:139-145.
- (3) ETニュースレター 1998. 22. 54-56.
- (4) Takeda T, Henderson WB and Hasler JF 1987. Deep freezing of split and intact bovine embryos. Theriogenology. 27:285
- (5) 後藤充宏・笠井裕明・川島迪夫 他 1995. 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. 17:19-26.

- (6)秋山清・仲沢浩江・仲沢慶紀 他 2001.
牛受精卵の性別判定方法の検討. 神畜研研
報. 88:5-9.
- (8)山中昌也・板垣佳明・木村直子 他 1995.
バイオブシーした牛胚の凍結-融解後の体
外での生存性. 17:6-12.
- (9)富永敬一郎 1990. 牛の分断胚移植技術.
家畜人工授精. 136:26-38.
- (10)牛島仁・富樫敏明・加藤孝 他. 1995.
性別別胚の生存性に及ぼす牛胚の品質の影響.
日本胚移植学雑誌, 17:164-169
- (11)沼辺孝・高田直和・佐藤秀俊 他 1995.
牛胚の性染色体分析法およびPCR法による性
判別. 日本胚移植学雑誌. 17:183-190
- (12)Iwasaki S.,Yoshikane Y., Li X. et.
al. 1994. Effect of Freezing of Bovine
Preimplantation Embryos Derived From Oo
cytes Fertilized In Vitro on Survival o
f Their Inner Cell Mass Cells. Mol.Repr.
Dev. 37:272-275
- (13)砂川政広・黒沢功・高橋正博 他. 1997.
生検後にガラス化保存した牛胚の融解後の
多段階希釈による生存性. 第12回東日本家畜
受精卵移植技術研究会大会資料. 13:48-49.
- (14)井上直之・大山真二・谷之木精悟 他
1999. 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講演要旨.
59.