

連載

第15回

牛凍結保存胚の移植:現状と課題

ジェネティクス北海道 顧問 たかはし よしゆき **高橋 芳幸**
 昭和50年 北海道大学大学院獣医学研究科修士課程修了、
農林省畜産局採用(農林技官)
 昭和51年 農林省日高種畜牧場勤務
 昭和58年 北海道大学獣医学部・助教
 昭和61年 獣医学博士(北海道大学)
 平成10年 北海道大学大学院獣医学研究科・教授
 平成24年 北海道大学特任教授、名誉教授
 平成25年 現職

牛の凍結胚(凍結受精卵)の多くは、凍結精液と同じように融解したストローを器具にセットして、人工授精と同じような手技で雌牛(レシピエント)の子宮に注入・移植(ダイレクト移植)されていることから、今回は牛胚の凍結保存の概要と凍結胚の取扱い・融解について概説しました。そこで、今回は融解胚の取扱い、基本的な移植手技、現在の牛凍結胚の移植成績の現状や課題について筆者の「ノート」を紹介します。

1. 凍結保存胚の融解と融解胚の取扱い

融解の基本:凍結胚はストローを風の無い場所で一定の時間空气中に保持してから、温水に浸けて融解する(図1)。凍結精液のようにストローを空气中に保持せずに温水へ浸けると10~25%の胚はフラクチャー傷害を受ける。また、ストローを長時間空气中で保持したり風のある場所で作業を行ったりするとストロー内の温度が上がり、細胞内も細胞周辺も脱ガラス化して胚細胞は浸透圧傷害や細胞内凍結という致命的な傷害を受ける(詳細は第14回参照)。

フラクチャー傷害や脱ガラス化による傷害は凍結保存液組成、冷却条件、ストローの素材などによって異なることが予想されるので、ストローを空气中に保持する時間、温水の温度、温水に浸ける時間は、凍結胚作製者・団体が発行する指示書に従う。

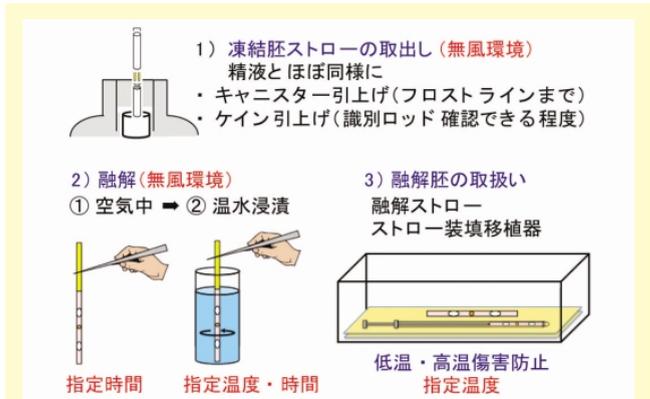


図1 凍結保存胚の融解と融解胚の取扱い・保管の概要
 融解(空气中保持時間、温水浸漬における温水温度・浸漬時間)や融解胚の取扱い・保管は、凍結胚を作製した技術者の推奨する方法(指示)に従う。

凍結胚の証明書と融解方法の指示書:日本には凍結胚の融解方法の指示書に関する規定はないが、国際胚技術学会(IETS)が推奨する凍結保存胚の証明書(図2)には、ケイン・ゴブレット内の各ストローに収納した凍結胚の発育ステージ、品質とともに凍結保存方法、推薦する融解方法が記載されている。また、発育ステージ、品質については、コード番号で記載されている(図3参照)。

ストロー番号	胚数	洗浄回数	トリプシン処理	発育コード	品質コード	透明帯
1	1	10	有	4	1	無傷
2	1	10	有	4	1	無傷
3	1	10	有	5	1	無傷
4	1	10	有	5	1	無傷
5	1	10	有	6	1	無傷

回収から凍結までの時間: _____ 時間
 凍害防止剤・濃度、平衡時間、最終濃度、冷却方法:

植水温度: _____ °C、 冷却速度: _____ °C/分、
 液体窒素投入温度: _____ °C

推奨する融解方法(凍害防止剤希釈方法): _____

図2: 凍結胚の証明書の例

国際胚技術学会(IETS: International Embryo Technology Society)のマニュアル(2010)に記載されている凍結胚の証明書の例。

胚の発育ステージとコード番号			
桑実胚: 4	初期胚盤胞: 5	胚盤胞: 6	拡張胚盤胞: 7
胚の品質とコード番号			
秀・優: 1	良: 2	不良: 3	
Excellent, Good	Fair	Poor	
割球の大きさ・色調などが均一	一部は大きさ・色調などが均一性を欠く	多くは大きさ・色調などが均一性を欠く	
85%以上が正常	50%以上が正常	25%以上が正常	

図3 発情・授精後6.5~7.5日目に子宮還流により回収される牛胚の発育ステージと品質胚の発育ステージと胚の品質判定基準はIETSマニュアル(2010)に沿って作成。

2. 融解胚の取扱い

取扱いの基本:融解胚(ストロー)の一時的な保管、移植器具へのストローの装填、ストローを装填した移植器具の保管は、20~30°Cの環境で行うのが一般的であるが、融解胚の取扱いも凍結胚作製者の指示に従う。また、融解した胚は速やかにレシピエント牛に移植する。日常的に人工授精を行っている獣医師・人工授精師は、性選別精液は融解後5分以内、通常凍結精液は10分以内に授精しているので、融解胚を5~10分以内に移植することは容易である。

胚の低温・高温による傷害: 体内受精胚でも桑実胚より若い発育ステージの胚は低温傷害を受けるが、通常ドナー牛から回収される桑実胚～胚盤胞は、0℃に冷却しても低温傷害を受けない(通常の凍結保存が可能な理由)。しかし、体外受精胚は桑実胚でも15℃以下に冷却すると大きな傷害を受ける(図4-A)。

最も一般的なエチレングリコールあるいはエチレングリコールとスクロースを添加した保存液を用いて凍結保存された胚の融解時の温水温度は25～30℃の指定が多い。融解胚を38.5℃まで温めて30分以上保管するとエチレングリコールやスクロースの毒性がみられる。さらに、体外受精胚(胚盤胞)、とく凍結・融解胚は高温(41℃)に暴露されると傷害を受ける(図4-B)。

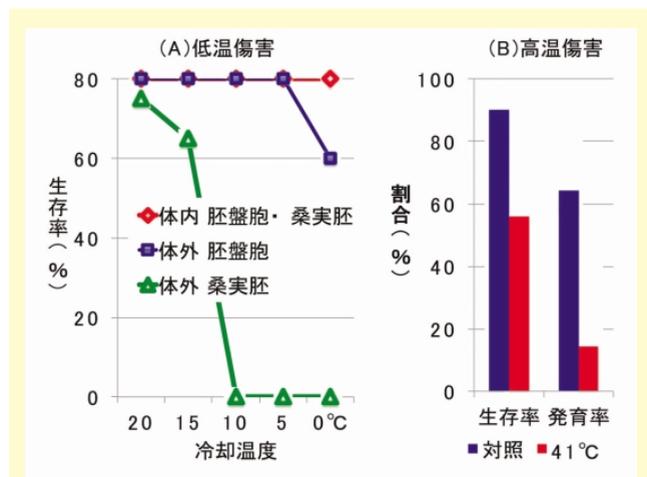


図4 牛胚の低温と高温による傷害

(A) 体内受精胚と体外受精胚の冷却による低温傷害の違い、(B) 体内受精胚(凍結融解・胚盤胞)に対する高温(6時間曝露)の傷害を示す。グラフは、(A) Pollard JW & Leibo SP (1994)と(B) Mori M et al (2015)のデータを基に作成。

3. 基本的な胚の移植手技

胚の移植部位: 胚はレシピエント牛の子宮角、黄体が存在する側(黄体側)の子宮角に移植する。反対側の子宮角に移植しても全く受胎しない訳ではないが、受胎率は極めて低い(図5)。また、黄体側の子宮角でも、深部あるいは中央部に移植すると受胎する確率が高い(図6)。

胚の移植手技と器具: 胚移植の基本的な手技は人工授精とほぼ同じであるが、人工授精でも使うシース管カバーを必ず使用して、陰部～膈内の細菌・微生物を子宮内に持たないようにする(図7)。

最も広く使用されている胚移植器は、人工授精における精液注入器と同じような構造で、子宮角の中央部～深部に胚を注入移植するためには、子宮を傷つけない操作が必要である(図7-A)。近年国内では、容易に子宮角中央部あるいは深部に胚を注入できる移植器具も市販されている(図7-B)。

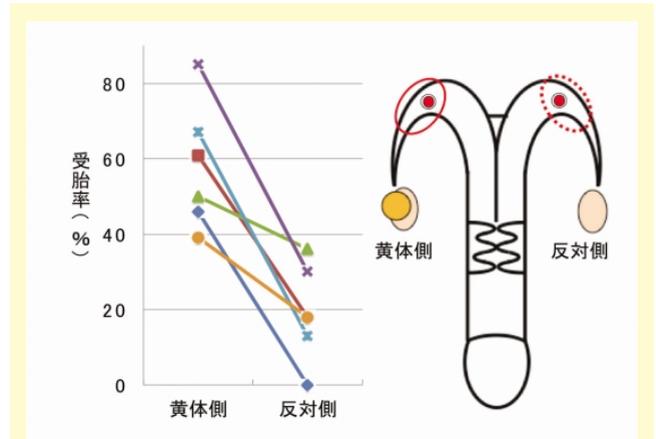


図5 胚の移植部位(黄体側子宮角と反対側子宮角)による受胎率の違い Seidel GE Jr (1981)のデータを基に作成。

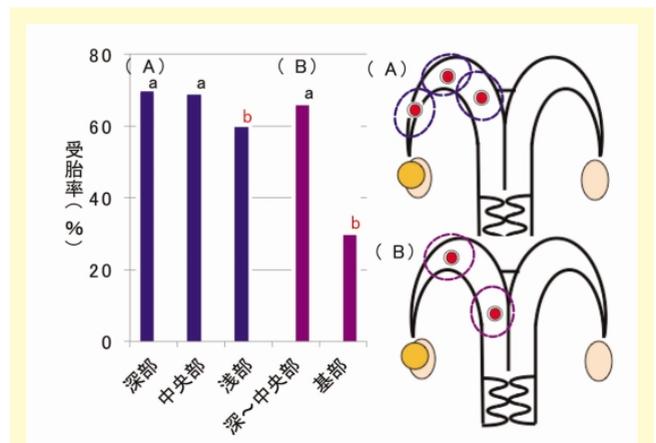


図6 胚の移植子宮角の部位による受胎率の違い

子宮角深部、中央部、浅部: 子宮角の夫々1/3区分、基部: 分岐部付近。(A)と(B)の凍結胚の移植部位による受胎率のグラフは、それぞれHaster JF (2010)とBeal WE et al (1998)のデータを基に作成。

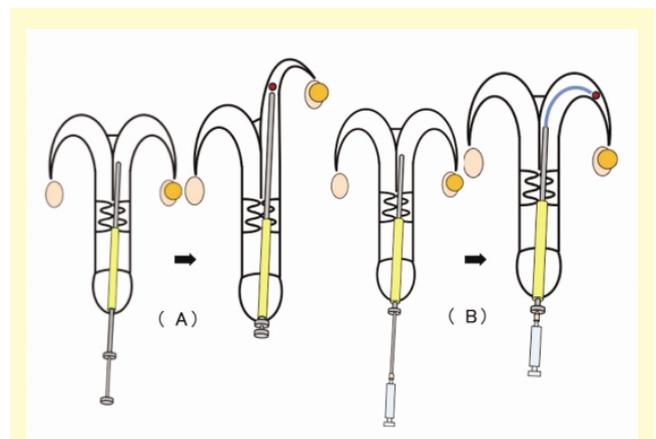


図7 代表的な胚移植器の模式図

(A) 人工授精器具類似のステンレス製の器具とプラスチック製シース管の胚移植器、(B) ステンレス製の器具先端から柔らかいチューブが伸びる移植器(注射筒を用いて胚を押し出す)。

4. 凍結胚の移植成績の現状と課題

凍結胚移植の受胎成績: 体内受精胚(過剰排卵処置を施したドナー牛から回収した胚)はグリセリンを用いて凍結保存した胚(融解後にグリセリンを希釈除去して移植)とエチレングリコールを用いて凍結保存した胚(融解後にダイレクト移植)の受胎率に差異はない(図8)。

体内受精胚でも体外受精胚でも凍結胚の移植受胎率は新鮮胚に比べると低く、さらに体外受精胚の移植受胎率は、体内受精胚より低い(図9と図10)。そのため、体外受精胚の品質改善、凍結保存法の開発が課題になっている。

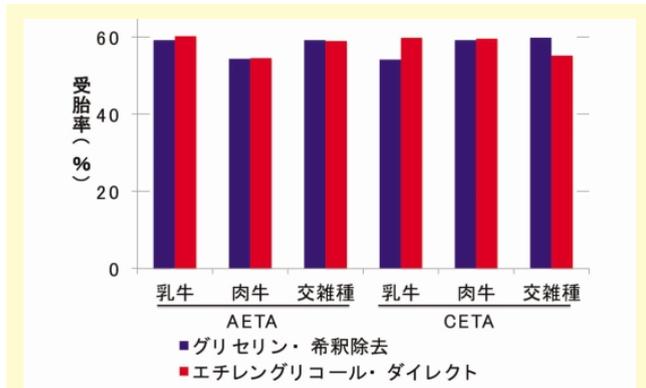


図8 北米における凍結保存胚の移植成績
グリセリンを用いて凍結保存した胚(融解後にグリセリンを希釈除去して移植)とエチレングリコールを用いて凍結保存した胚(融解後にダイレクト移植)の受胎率。AETA(アメリカ胚移植協会)とCETA(カナダ胚移植協会)のデータ(Leibo SP & Mapletoft RJ, 1989)を基に作成。

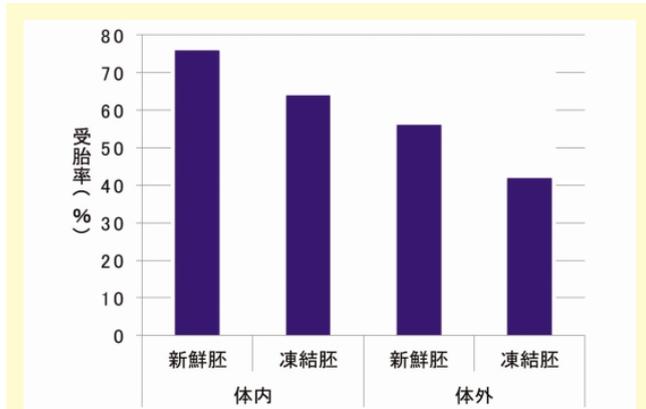


図9 北米における体内受精胚と体外受精胚(新鮮胚と凍結胚)の受胎成績の例
Hasler JF (1998)のデータを基に作成

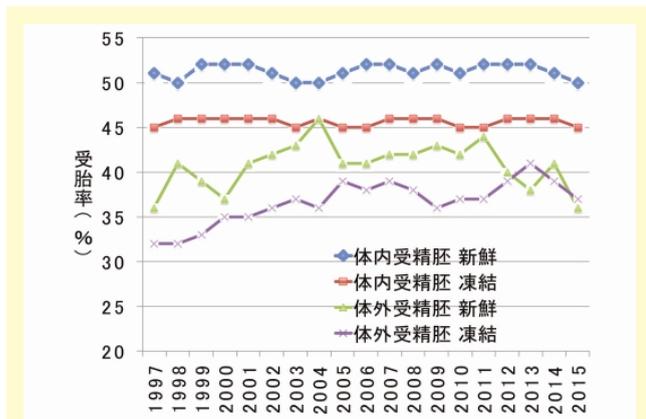


図10 日本における牛の胚移植・受胎率の推移
農林水産省調べ(1997年~2015年)

胚の発育ステージや品種による違い: 最も広く使用されているエチレングリコールを用いて凍結保存した体内受精胚の移植受胎率は、発育ステージによって受胎性に相違があり、一般的な胚の回収時期(発情・授精後6.5~7.5日)に回収される正常発育ステージの胚でも、桑実胚と初期盤胞の移植受胎率に比べると胚盤胞、とくに拡張胚盤胞の受胎率が低い(図11)。

また、体内受精胚でもジャージー種牛の胚は、新鮮胚であればホルスタイン種牛の胚と同等の受胎率が得られているが、凍結胚はホルスタイン種牛に比べて低い受胎率も課題になっている(図12)。

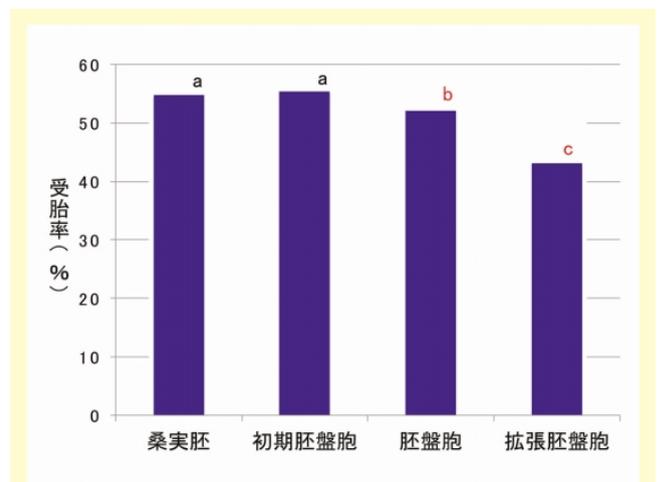


図11 凍結保存胚の発育ステージによる受胎率の違い
発情・授精後6.5~7.5日目に回収、エチレングリコールを用いて凍結保存した胚(ダイレクト移植)の受胎率。Hasler JF (2012)のデータを基に作成。

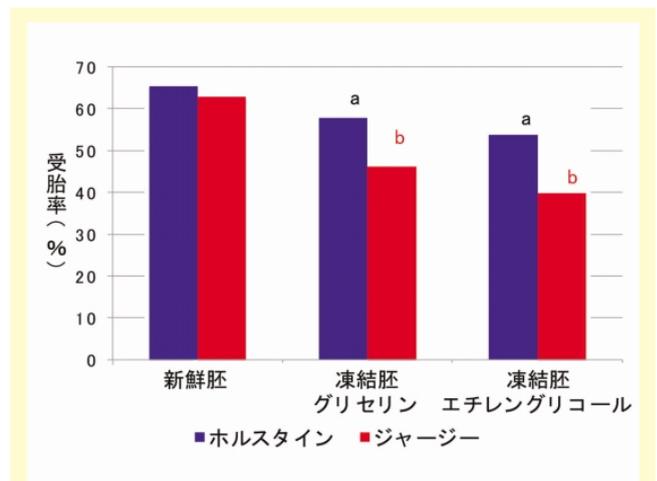


図12 ホルスタイン種とジャージー種の凍結胚の移植受胎率
新鮮胚、グリセリンを用いて凍結保存した胚(融解後にグリセリンを希釈除去して移植)およびエチレングリコールを用いて凍結保存した胚(融解後にダイレクト移植)の受胎率。Steel R & Hasler JF (2004)のデータを基に作成。