

エチレングリコールを用いた牛胚のダイレクト法の技術開発

堂地 修・今井 敬

酪農学園大学

わが国における牛の胚移植技術は実用的利用が始まって30年以上が経過して、その関連技術も数多く開発され、多様な利用が行われるようになった。育種改良においては、候補種雄牛の生産や高能力牛の後継牛生産に胚移植が利用され、乳牛においては上位40位以内の種雄牛の68%が胚移植由来である（(独)家畜改良センター、乳用牛種雄牛評価成績2015-8月）。外国からも日常的に胚が輸入され、2013年には乳牛の胚が約1,200個輸入されている¹⁾。肉用牛への胚移植は乳牛に比べて少ないが、肉用牛の胚生産は多く、生産された胚の多くは乳牛に移植され肥育素牛が生産されている。

近年は生体卵子吸引（OPU）技術の開発が進み、その利用が急速に増えている。過剰排卵誘処置による胚回収成績の不良な牛からの胚生産や卵子の反復採取が可能であり、過剰排卵誘処置よりも効率的な胚生産技術として位置づけられるようになった²⁾。OPU技術の普及には体外受精技術の進展が重要な役割を果たしている。体外受精技術による胚生産は、培養方法の改善による発生率の向上、個別培養技術の確立、受胎性の高い胚の選抜基準法の開発など、体外受精技術の実用的利用促進を支える技術開発研究が数多く行われ有意な実績を上げている³⁾。近い将来、OPUによる体外受精胚の生産方法（OPU-IVF）が、牛胚生産の主流となる可能性が高いと思われる。

このようななかで、胚の凍結保存方法は凍結・融解後に凍害保護物質の希釈・除去を必要としない方法、いわゆる“ダイレクト法”が主流となった。ダイレクト法の普及により、わが国のみなら

ず各国において牛の胚移植技術は生産現場での利用が大きく広がったと考えられる。今日広く利用されているダイレクト法は、凍害防止剤にエチレングリコールが用いられている。そこで本稿はエチレングリコールを用いたダイレクト法の技術開発の経過と現状について紹介することを目的とする。

ウシ胚の凍結保存技術と

ダイレクト法の開発と実用化の歩み

ウシ胚の凍結保存に関する研究は、1973年、Willmut and Rowson⁴⁾が凍結・融解胚から子牛の生産に初めて成功したことに始まる。当初、凍害防止剤を段階的に添加して凍結し、融解後は段階的に希釈・除去するステップ・ワイズ方法が一般的であった。1982年、Leibo et al.⁵⁾およびRenard et al.⁶⁾によってシヨ糖を用いてグリセリンを希釈・除去する方法が報告された。次いで、Leibo^{7,8)}は、ストロー内でグリセリンを希釈する“one-stepTM”法の野外試験の結果を報告している。これらの研究により、凍結・融解胚からの凍害防止剤の希釈・除去は簡易化され、国内でもLeiboの報告に準じた方法の開発が行われた。シヨ糖を用いたストロー内グリセリンを希釈・除去法は、国内ではワンステップ・ストロー法と呼ばれ、野外での普及が期待された^{9,10)}。しかし、ストロー内への胚および溶液の吸引、融解後の凍害防止剤の希釈・除去操作が煩雑で、操作上の人為的ミスを引きやすく、段階的に凍害防止剤を希釈・除去する従来の方法に比べて受胎率の低いことが問題とされた¹¹⁾。そのため、融解後、凍害防止剤の希

積・除去を必要としない新しい凍結媒液および胚の凍結・融解法の開発が必要となった。

凍害防止剤を希釈・除去せずウシ凍結・融解胚を移植するダイレクト法は、1978年に Willadsen et al.¹²⁾ がジメチルスルホキシド (DMSO) を用いて凍結した胚を融解後に DMSO を希釈・除去せず受胎牛に移植したのが最初の報告である。しかし、受胎した牛は 20 頭中 1 頭だけであった。その後、ベルギーの Massip のグループ^{13,14)} は、グリセリンとショ糖の混合液を凍害防止剤として用いてウシ胚を凍結し、融解後、凍害防止剤を希釈・除去せず受胎牛に直接移植して良好な受胎率 (50.0~51.8%) を報告した。この Massip らの方法が、野外で利用可能なウシ凍結胚のダイレクト法に関する最初の報告である。Suzuki et al.¹⁵⁾ は、プロピレングリコール (PG) を凍害防止剤として、ストロー内に PG とショ糖の 2 つの溶液層を作り、ウシ胚を凍結・融解後、受胎牛に直接移植する方法で高い受胎率 (60.6%) を報告している。また、著者¹⁶⁾ が紹介したとおり、エチレングリコールを用いたウシ胚のダイレクト法の報告は次のとおりである。1991 年の日本畜産学会において堂地ら¹⁷⁾ は、初めてウシ胚のダイレクト法による良好な受胎率を報告した。また、著者らの下で研修を受けたユーゴスラビアの Kocoski ら¹⁸⁾ が、1991 年の第 7 回欧州胚移植学会において、10% エチレングリコールを用いて凍結したウシ胚を培養して良好な生存率が得られ、ダイレクト移植できる可能性を報告している。さらに、1992 年の国際胚移植学会において Voelkel と Hu¹⁹⁾ が同じくエチレングリコールを用いたダイレクト法を発表した。彼らはエチレングリコールの濃度や他の凍害防止剤との比較を詳細に行い、エチレングリコールの有効性を世界に伝える役割を果たしている。その後、エチレングリコールを用いたダイレクト法の野外試験も報告されている^{20,21)}。

このように 1990 年代に入り、ウシ胚の凍結保存法は、ダイレクト法による移植が可能となり、凍害防止剤としてエチレングリコールが主として使われるようになった²²⁾。そして、ダイレ

クト法は、特別な実験施設および器具を必要とせず、ワンステップ・ストロー法で問題となった人為的な操作ミスを最小限に防止できることから、野外での実用性の高い方法として利用が増えた。

ダイレクト法に用いることが可能な

凍害防止剤の条件

ダイレクト法で重要なことは子宮内に移植された胚が浸透圧障害によって生存性が損なわれない条件で凍結することである。子宮内に移植された凍結・融解胚が受ける浸透圧障害は、凍害防止剤が胚細胞から流出するより早く水が胚細胞内に流入して、胚細胞が過度に膨張するために起こる。このような浸透圧障害は、細胞膜透過性の低い凍害防止剤を用いて胚を凍結した場合に起こりやすい。そのため、ダイレクト法では細胞膜透過性の高い凍害防止剤を用いるか、ショ糖などの細胞膜非透過物質を浸透圧緩衝剤として凍結媒液に加える必要がある。

グリセリンを用いてウシ胚を凍結・融解後、グリセリンを希釈・除去せず等張液に直接浸漬したり受胎牛に移植したりするとその生存率は低い^{15,23)}。しかし、Massip ら^{13,14)} が報告したようにグリセリンにショ糖を 0.25 M 加えるとダイレクト法により移植しても良好な受胎率が得られるようになる。また、鈴木ら²⁴⁾ もグリセリンに 0.2~0.35 M のショ糖を加えると良好な受胎率が得られることを示している。著者ら²⁵⁾ も、グリセリンに 0.25 M ショ糖を加えて凍結した胚を移植して良好な受胎率を得ている。このようにグリセリンをダイレクト法の凍害防止剤として用いる場合はショ糖を添加する必要がある。ダイレクト法の凍結媒液にグリセリンを用いる場合、ショ糖は 0.25 M が一般的である。

一方、エチレングリコールはグリセリンに比べてウシおよびヒツジ胚に対する細胞膜透過性が高い^{26,27)}。哺乳動物胚の凍害防止剤としてのエチレングリコールの有効性について最初に報告したのは京都大学の Miyamoto and Ishibashi^{28,29)} である。Miyamoto and Ishibashi はマウス胚とラット胚でエ

チレングリコールの凍害防止剤としての有効性を明らかにしている。また、ヒツジ胚^{30,31)}でも同様に報告されている。ウシ胚では1982年初頭に凍結保存に利用され報告³²⁾があるが、その後約10年間はウシ胚に利用されることなく経過している¹⁶⁾。その理由は、1980年代初頭から中ごろには、グリセリンを用いて凍結した胚で良好な受胎率が得られていたこと^{7,8)}や他のグループによってグリセリンのストロー内希釈法が開発され、その実用化に多くの注目が集まったためであると考えられる。

1986年、浦野ら³³⁾はエチレングリコールで凍結したマウス胚は、エチレングリコールを希釈することなく融解胚をPBSに直接浸漬しても高い生存性の得られることを明らかにした。この報告は、エチレングリコールがダイレクト法の凍害防止剤として有効である可能性を示唆したものであった。この浦野らの報告が著者ら¹⁷⁾のエチレングリコールを用いたダイレクト法の技術開発のきっかけのひとつになった。Voelkel and Hu¹⁹⁾は、融解胚をPBSに直接浸漬し凍害防止剤を希釈・除去したのちの体外培養における胚の生存率は、1.4 M グリセリン、1.5 M ジメチルスルフォキシドあるいは1.5 M プロピレングリコールに比べて1.5 M エチレングリコールが高いことを報告している。

エチレングリコール濃度とシヨ糖の併用

ウシ胚のダイレクト法に用いられるエチレングリコールの濃度と受胎率との関係について詳細に比較した報告はほとんどみられない。著者ら（未発表）が行ったこれまでの移植試験の結果から、1.8 M と 1.5 M の間には差はないと考えられる。また、著者ら³⁴⁾が行った凍結・融解後の培養試験の結果では、1.5 M と 1.8 M の生存率に差はなく、Voelkel and Hu¹⁹⁾らも同様の結果を報告している。今日では1.5 M エチレングリコールがもっとも良く用いられている²²⁾。

エチレングリコールとシヨ糖の併用について、著者ら³⁴⁾は体外受精由来胚を用いた実験結果か

ら、0.1 M シヨ糖を添加した場合が添加しない場合に比べて融解後の生存率が高いことを報告している。Martínez ら³⁵⁾も0.1 M シヨ糖を加えた場合に最も高い受胎率を得たと報告している。一方、シヨ糖の添加の有無は受胎率に影響しなかったとする報告³⁶⁾もみられる。また、体外受精由来胚の凍結において1.5 M エチレングリコールに0.25 M シヨ糖を添加しても融解後の生存率に差がなかったとする報告³⁷⁾もある。

しかし、最近の報告を見ると体外受精由来胚を凍結する場合、1.5 M エチレングリコールに0.1 M シヨ糖を添加した凍結媒液が最も良く利用されている^{35, 38, 39)}。エチレングリコールを用いた場合のシヨ糖の添加効果として凍結・融解課程における浸透圧の緩衝作用が期待される。とくに胚盤胞や拡張胚盤胞は胞腔胚を有するため浸透圧障害を受けやすいが、シヨ糖を添加することにより効果的に脱水し、融解過程では急激な復水を和らげると考えられる。そのため、拡張胚盤胞を凍結する体外受精由来胚の場合はシヨ糖添加の効果は少なくないと考えられる。また、後期桑実胚や初期胚盤胞でもシヨ糖添加は生存性を損なうような悪影響は全くなく、1.5 M エチレングリコールに0.1 M シヨ糖を添加した凍結媒液はダイレクト法に適していると考えられる。

今後の課題

今日、ウシ胚を凍結保存する場合、ウシ由来の血清（FBS, CS）あるいは血清アルブミン（BSA）が添加されている。ウシの血清や血清アルブミンは凍結時の保護効果が高く、広く利用されている。しかし、ウシ血液由来物質の利用は、伝染性疾病の伝播の危険性がともなう。今日、ウシ胚の輸出入は日常的に行われており、ウシ由来の血清や血清アルブミンの代替として組成の明らかな化学物質の検索を急ぐ必要がある。これまで化学組成の明らかな物質の凍結媒液への添加効果を検討した報告^{38, 39)}はあるが、広く一般に普及するまでには至っていない。わが国においては、血清や血清アルブミンと同等の凍結保護効果のある

化学組成の明らかな物質に関する研究を行う必要があると思われる。

また、今日、エチレングリコールを用いたダイレクト法は広く普及し、実用的に利用されているが、さらに受胎率を向上させるためには、詳細な条件検討が必要である。とくに生体卵子吸引技術の進展と普及により、今後体外受精由来胚の生産は急増すると思われることから、凍結・融解後の生存率の高い体外受精由来胚の生産技術（培養液の組成や条件の改善）や凍結媒液の開発も急がなければならない課題である。

引用文献

- 1) Perry G. (2014), Embryo Transfer Newsletter, 32: 14-26
- 2) 今井敬, 大竹正樹, 相川芳雄, 松田秀雄, 山之内忠幸, 稲葉泰志, 的場理子, 杉村智史, 橋谷田 豊 (2014), 日本胚移植学雑誌, 36: 109-114
- 3) Sugimura, S., T. Akai, Y. Hashiyada, T. Somfai, Y. Inaba, M. Hirayama, T. Yamanouchi, H. Matsuda, S. Kobayashi, Y. Aikawa, M. Ohtake, E. Kobayashi, K. Konishi & K. Imai (2012), PLoS ONE, 7: e36627
- 4) Wilmut, I. & L.E.A. Rowson (1973), Vet. Rec., 92: 686-690
- 5) Leibo, S.P., A.W. West, B. III, Perry & A.C. III, Mills (1982) Cryobiology, 19: 674 (abst)
- 6) Renard, J-P., Y. Heyman & J-P, Ozil (1982), Am. Med. Vet., 126: 23-32
- 7) Leibo, S.P. (1983), Cryo-Letters, 4:387-400
- 8) Leibo, S.P. (1984), Theriogenology, 21: 767-790
- 9) 鈴木達行, 下平乙夫, 酒井豊, 松田修一, 三浦秀夫, 伊藤一伸 (1986), 家畜繁殖学雑誌, 32: 118-123
- 10) 高倉宏輔, 高橋博人, 堂地修, 有山賢一, 今井敬 (1987), 北海道牛受精卵移植研究会報, 6: 42-44
- 11) 笠井浩司 (1990). ET ニュースレター, 8: 65-72
- 12) Willadsen, S., C. Polge & L.E.A. Rowson (1978), J. Reprod. Fertil., 52: 391-393
- 13) Massip, A. & P, Van Der Zwalmen (1984), Vet. Rec., 115: 327-328
- 14) Massip, A., P. Van Der Zwalmen & F, Ectors (1987), Theriogenology, 27: 69-79
- 15) Suzuki, T., M, Yamamoto, M, Ooe, A, Sakata, M, Matsuoka, Y. Nishikata & K, Okamoto (1990), Theriogenology, 34: 1051-1057
- 16) 堂地修 (1998), 日本胚移植学雑誌, 21: 28-34
- 17) 堂地修, 今井敬, 高倉宏輔 (1991), 第84回日本畜産学会大会講演要旨, 65
- 18) Kocoski, L.J., O. Douchi, H. Chan, A.B. del Sol, R.R. Velasques, L.E. Sapalli & K. Popovski (1991), In: Proc 7th Ann. Conv. AETE; (1991); Cambridge, England. p 157
- 19) Voelke, I.S.A. & X. Hu (1992), Theriogenology, 37: 23-37
- 20) Nibart, M. & P. Humblot (1997), Theriogenology, 47: 371 (abst)
- 21) Dochi, O., Y. Yamamoto, H. Saga, N. Yoshida, N. Kano, J. Maeda, K. Miyata, A. Yamauchi, K. Tominaga, Y. Oda, T. Nakashima & S. Inohae (1998), Theriogenology, 49: 1051-1058
- 22) Massip, A. (2001), Reprod. Dom. Anim., 36: 49-55
- 23) 高橋芳幸, 高倉宏輔 (1983), 北海道牛受精卵移植研究会報, 2: 28-30
- 24) 鈴木達行, 石田隆志, 酒井豊 (1989), 家畜繁殖学雑誌, 35: 125-129
- 25) Dochi, O., K. Imai & Z.H. Takakura (1995), Anim. Reprod. Sci., 38: 179-185
- 26) Széll, A., J.N. Shelton & K. Széll (1989), Cryobiology, 26: 297-301
- 27) Songsasen, N., B.C. Buckrell, C. Plante & S.P. Leibo (1995), Cryobiology, 32: 78-91
- 28) Miyamoto, H. & T. Ishibashi (1977), J. Reprod. Fertil., 50: 373-375
- 29) Miyamoto, H. & T. Ishibashi (1978), J. Reprod.

- Fertil., 54: 427-432
- 30) Tervit, H.R. & P.Q. Goold (1984),
Theriogenology, 21: 268 (abst)
 - 31) Cocero, M.J., R. Procureur, J. De La Fuente & D.
Chupin (1988), Theriogenology, 29: 238 (abst)
 - 32) Elsdon, R.P., G.E. Jr. Seidel, T. Takeda & G.D.
Farrand (1982), Theriogenology, 17: 1-10
 - 33) 浦野浩司, 高橋芳幸, 金川弘司 (1986), 家
畜繁殖学雑誌, 32: 130-133
 - 34) 堂地修, 今井敬 (1999), 日本胚移植学雑誌,
21: 28-34
 - 35) Martínez, A.G., G.M. Brogliatti, A. Valcarcel &
de las Heras (2002), Theriogenology, 58: 963
-972
 - 36) Leibo, S.P. & R.J. Mapletoft (1998), In: Proc 12th
Ann. Conv. AETA, San Antonio, TX., pp 91-97
 - 37) Hasler, J.F., P.J. Hurtgen, Z.Q. Jin & J.E. Stokes
(1997), Theriogenology 48: 563-579
 - 38) Lim, K.T., G. Jang, K.H. Ko, W.W. Lee, H.J.
Park, J.J. Kim, S.K. Kang & B.C. Lee (2008),
Anim. Reprod. Sci., 103: 239-248
 - 39) Bruyère, P., A. Baudot, C. Guyader-Joly, P.
Guérin, G. Louis & S. Buff (2012),
Theriogenology, 78: 1294-302