

セラミック被覆刃によるウシ胚のバイオプシーが胚の発育に及ぼす影響

上田修二*・森 美幸・笠正二郎・南 守¹⁾

性別の処理に伴う胚の損傷を小さくするために、セラミック (SiNx) を 1 μ m 被覆した金属刃 (フェザー Micro Feather Blade K-715) を用いて、ウシ体外受精由来拡張胚盤胞 (7日齢) の栄養膜細胞の一部を切断 (バイオプシー) した。培養24時間後、セラミック被覆刃でバイオプシーした胚 (被覆区) の体積は、バイオプシー前の体積に比べて313%に再拡張した。一方、従来の金属刃で切断した胚 (対照区) は263%であったが、有意差は認められなかった。培養24時間後、被覆区では栄養膜細胞数176個および総細胞数238個であり、対照区の各々129個、181個に比べて有意に増加した ($p < 0.01$)。また、培養24時間後の胚を、Vajtaらの報告 (1999) に準じて、ストロー内でガラス化保存し、加温・希釈後、培養48時間後の生存率は、被覆区が高い傾向にあった (85% vs 71%)。移植実証試験として、セラミック被覆刃でバイオプシーした体内受精胚をガラス化保存後、受胎牛に移植した結果、加温後生存性を確認した胚を現地で移植するセンター融解と現地で加温後全て移植するフィールド融解の受胎率は、各々50% (8/16頭)、71% (5/7頭) と、対照区の41% (12/29頭)、24% (4/17頭) に比べて良好であった。

以上の結果から、ウシ胚をセラミック被覆刃で切断すると、バイオプシー胚の再拡張や細胞数の増加が改善され、保存、移植後の受胎率が改善されることが示唆された。

[キーワード: ウシ胚, バイオプシー, セラミック被覆, ガラス化, 細胞数]

The Effects of Biopsy with a Ceramic-coated Blade on Development of Bovine Embryos. UEDA Shuji, Miyuki MORI, Shojiro KASA and Mamoru MINAMI¹⁾ (Fukuoka Agricultural Research Center, Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan, 1) Fukuoka Industrial Technology Center, 3-6-1 Norimatsu, Yahatanishi-ku, Kitakyushu City, Fukuoka 807-0831, Japan) *Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent.* 28:70-73 (2009)

In Vitro-produced bovine expanded-blastocysts (day7; IVF=day0) were biopsied with a ceramic (SiNx 1 μ m)-coated stainless steel blade in an attempt to reduce the damage to embryos in the process of sex distinction. The embryos biopsied with a ceramic-coated blade expanded to 313% of their original size 24 hours after the biopsy. On the other hand, embryos biopsied with a stainless steel blade expanded to 263% of their original size. However, the difference was not significant. In contrast, embryos biopsied with a ceramic-coated blade resulted in a significant increase ($p < 0.01$) in trophectoderm cells (176) and total cell numbers (238), compared with the ones biopsied with a stainless steel blade (129 and 181, respectively). The embryos biopsied with the two types of blades were cultured for 24 hours and were vitrified following the method reported by Vajata et al (1999). Post-thaw survival rates of embryos biopsied with a ceramic-coated blade and a stainless steel blade were 85% and 71% respectively. Compact morula and early blastocysts collected from superovulated donors were biopsied with a stainless steel blade (2002.4.1-2006.3.31) and a ceramic-coated blade (2006.4.1-2007.3.31), cultured for 3-4 hours and vitrified following the method reported by Ishimori et al (1992). Vitrified embryos were warmed in a laboratory, re-loaded in straw after confirming survivability, and transferred to recipients, or some of them were transferred to recipients after dilution in straw in a farm. The pregnancy rates processed with a ceramic-coated blade (50% and 71%) were higher than those processed with a stainless steel blade (41% and 24%).

[Key words: bovine embryo, ceramic-coated blade, cell number, vitrification, pregnancy rate]

緒 言

ウシ胚の雄特異的遺伝子の有無を識別し、性を判定する場合、胚の一部を金属刃 (ステンレス) で切断 (バイオプシー) する方法が一般的である。バイオプシーした胚を、緩慢凍結法またはガラス化法で保存すると、融解または加温後の生存率と受胎率は無処理の胚に比べて低い傾向にある (秋山ら 2001, 2005)。これは、胚をバイオプシーした際の切断面やその周辺細胞の損傷、損耗が原因の一つと考えられているが、詳細は明らかになっていない。胚の損傷を軽減すること

を目的に、マイクロチューブで胚の割球数個を吸引採取する方法 (Naitanaら 1996) や透明帯に開けた小さな穴から出てきた細胞を採取するヘルニア法 (Leoniら 2000) が報告されたが、左右のマニピュレータが必要なことや処理時期が限定されるなどの課題が残されている。一方、生体から組織を採取する場合、従来の穿刺針 (ステンレス) で見られる細胞の損傷が、セラミックを被覆した穿刺針を用いると、軽減したことが報告された (森ら 2003)。

そこで、胚のバイオプシーに一般的に使われている金属刃も穿刺針と同様のステンレスであり、従来の金属刃にセラミック (SiNx) を被覆することによって、細胞の損傷を軽減することが期待できるため、バイオプシー後の胚の発育性や保存後の生存性を比較検討後、移植実証試験を行った。

*連絡責任者

(家畜部: s-ueda@farc.pref.fukuoka.jp)

1) 福岡県工業技術センター機械電子研究所



第1図 封入後のストロー構成

1)VS: ガラス化液
2)DS: 希釈液

材料および方法

1 バイオプシー胚の発育性と保存後の生存性

食肉処理場で採取したウシ卵巣から卵子を吸引し、当場の常法（上田 1996, 上田ら 1997）に準じて、体外成熟、媒精と体外培養を行い、媒精7日目で拡張胚盤胞に発育した胚を供試した。

従来の金属刃（フェザー Micro Feather Blade K-715；基材ステンレス）に、セラミック膜の一種であるSiNxをイオンプレATING法で平均1 μ mの厚さに被覆させた刃をセラミック被覆刃とした。

バイオプシーは、供試胚の栄養膜細胞を金属刃（対照区）またはセラミック被覆刃（被覆区）で約10%切断して行った（秋山ら 2005, 上田ら 2002）。切断後の胚（バイオプシー胚）は、2mM ホスホエノールピルビン酸、100 μ M β メルカプトエタノール（ β ME）、20%ウシ胎児血清（FBS）添加199で24時間培養した（上田ら 2007）。

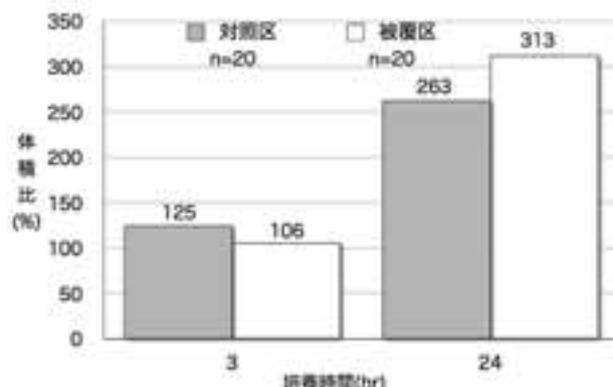
培養3, 24時間後に倒立顕微鏡のマイクロメーターで胚（細胞質）の長径（a）と短径（b, c；胚の形状からb=cとした）を計測し、体積を計算（ $V = 4\pi a b^2 / 3$ ）した。また、培養24時間後の一部の胚を二重染色（Sakataniら 2007）によって、内細胞塊と栄養膜細胞に染め分け、青色に染まった核を内細胞塊、桃色に染まった核を栄養膜細胞の核として計数した。

培養24時間後の胚を、Vajtaらの報告（1999）に準じて処理し、0.25mlプラスチックストロー（FHK）に封入後（第1図）、ガラス化保存した。25 $^{\circ}$ Cの微温水で加温後、ストロー内のガラス化液と希釈液を混和させることによって耐凍剤の希釈を行った。ストローから胚を回収後、100 μ M β ME, 20% FBS 添加199で48時間培養し、培養24, 48時間後に胚の形態を観察し、保存前の形態以上に発育した胚を生存胚とした。

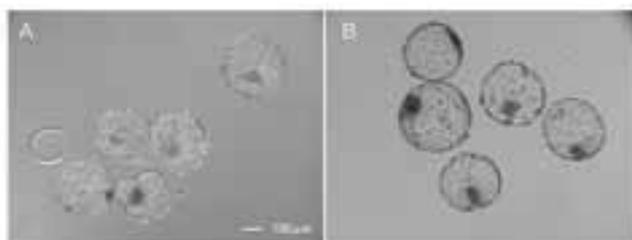
2 移植実証試験

当場では、過剰排卵処理を施した黒毛和種雌牛より採取した体内胚をバイオプシー後ガラス化保存し、移植する実証試験を実施しているが、バイオプシーは、2003～2005年度は金属刃で、2006および2007年度はセラミック被覆刃で行った。ガラス化保存は、Ishimoriら（1992）の方法に準じて行った。センター融解では、当場で加温培養後、生存を確認した胚をストローに再封入し、移植現場に輸送後、ホルスタイン種雌牛の黄体側子宮角に1胚移植した。また、フィールド融解では、移植現場で加温、希釈後、センター融解と同様に移植した。

3 統計処理

第2図 セラミック被覆刃がバイオプシー胚¹⁾の発育に及ぼす影響

1) 供試胚 体外受精由来拡張胚盤胞 (7日齢, 体外受精=0日齢; 切断前直径: 179 \pm 20 μ m)
2) バイオプシー前の体積を100としたときの体積比



第3図 金属刃 (A: 対照区) とセラミック被覆刃 (B: 被覆区) でバイオプシーし、24時間培養した胚

Stat View (Ver4. 5) を用いて、胚の体積および細胞数は Student's t-test, 生存率は χ^2 -test で有意差を検定した。

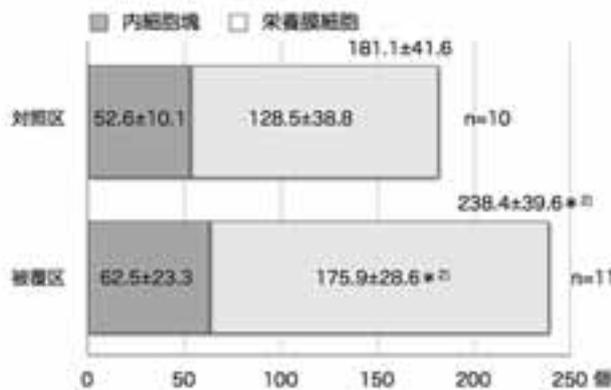
結果および考察

1 バイオプシー胚の発育性と保存後の生存性

バイオプシー前の供試胚（拡張胚盤胞）の直径は、対照区 (n=20), 被覆区 (n=20) 各々 $178 \pm 20.5 \mu\text{m}$, $180 \pm 19.1 \mu\text{m}$ であった。この直径をもとにして算出した体積を100%としたときの培養3時間後の体積は、対照区は125%, 被覆区は106%と、両者とも同程度であった（第2図）。培養24時間後では、各々 263%, 313%と被覆区が対照区に比べて大きくなる傾向にあった（第3図）。バイオプシーによる胚の損傷が小さいほど、短時間に修復し、胞胚腔が再形成されるが、損傷が大きい胚は、胞胚腔の再形成が遅いと報告されている（秋山ら 2001）。このことから、今回用いたセラミック被覆刃は、金属刃に比べて胚に対する損傷が小さかったと示唆された。

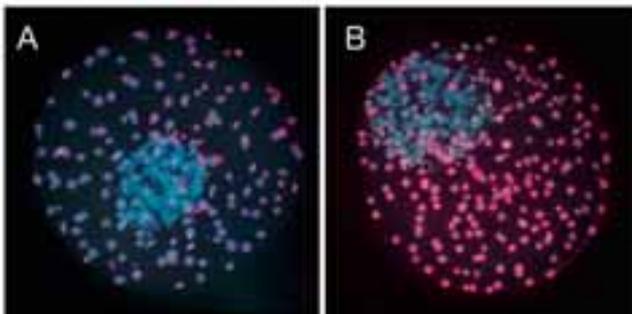
培養24時間後に、二重染色によって内細胞塊と栄養膜細胞の細胞数を計数した結果、対照区 (n=10) と被覆区 (n=11) の内細胞塊の細胞数に差は認められなかったが、栄養膜細胞の細胞数は、各々 128.5 ± 38.8 個, 175.9 ± 28.6 個と、被覆区が有意に多く (P<0.01)（第4図, 第5図）、両者を合わせた総細胞数は、対照区 (181.1 \pm 41.6個) に対して、被覆区 (238.4 \pm 39.6個) は有意に多かった (P<0.01)。

切断部位である栄養膜細胞数が、金属刃に比べてセ



第4図 セラミック被覆刃によるバイオプシーが培養¹⁾後の胚の細胞数に及ぼす影響

1) 培養時間 24hr
2) $P < 0.01$ vs 金属刃 (Student's t-test)

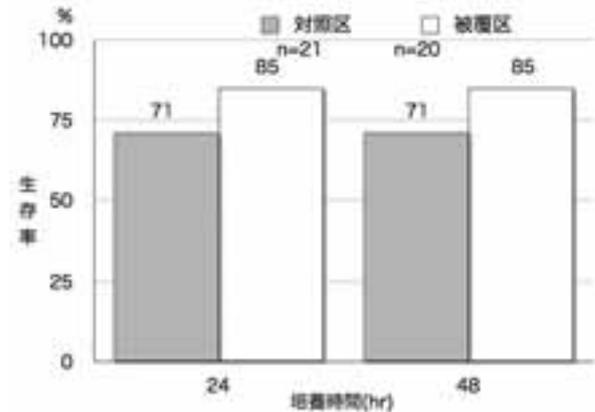


第5図 金属刃 (A: 対照区) とセラミック被覆刃 (B: 被覆区) でバイオプシーし、24時間培養した胚の二重染色像¹⁾

1) 青色: 内細胞塊, 赤色: 栄養膜細胞

セラミック被覆刃で有意に多かったことは、切断面とその周辺の細胞の損傷が小さかったためと考えられる。森ら (2003) は、生体から組織を採取する場合、ステンレス穿刺針を用いると、組織周辺の細胞が引きちぎられた状態になるが、セラミック被覆針では、切り取られた組織の表面は平滑であったと報告している。森ら (2003) は、この理由として、電気抵抗率と組織損傷度の間には負の相関があるため、電気抵抗率が低いステンレスは、針と組織の間に電気が生じ、穿刺付近とその周辺の細胞を損傷させるが、一方、セラミックを被覆した針では、電気抵抗が無限大に近いため、採取した組織や刺した穿刺針の周囲の細胞組織に対して、悪影響を及ぼす領域が小さくなると述べている。これらのことから、同様にセラミック被覆刃でバイオプシーした胚は、切断部周辺の細胞に対する影響が軽減されたため、培養後の細胞数も多く、バイオプシー胚の発育性が良好であったと考えられる。

金属刃またはセラミック被覆刃でバイオプシーした培養後の胚をストロー内でガラス化し、加温後培養した結果、24時間後の生存率は、各々71%、85%とセラミック被覆区が高い傾向にあった (第6図)。また、48時間後の生存率も同等であった。ストロー内ガラス化希釈法における性別別ウシ体内胚の生存率は、秋山



第6図 セラミック被覆刃がバイオプシー胚のガラス化保存¹⁾・加温後の生存率に及ぼす影響

1) ガラス化 20% EG, 20% DMSO, 0.6M Sac, 20% CS
+190: ストロー内ガラス化・希釈法

第1表 セラミック被覆刃でバイオプシーした胚の移植成績

区	移植方法	移植頭数	受胎頭数 (%)	流産頭数 (%)
対照区	センター融解	29	12 (41)	2 (17)
	フィールド融解	17	4 (24)	1 (25)
	小計	46	16 (35)	3 (19)
被覆区	センター融解	16	8 (50)	1 (13)
	フィールド融解	7	5 (71)	0 (0)
	小計	23	13 (57)	1 (8)

1) 移植期間 対照区: 2002~2005年度、被覆区: 2006~2007年度

ら (2005) は90.5%、小田ら (2004) は79.4%と報告しており、本試験の体外胚による被覆区の生存率85%は同様な成績であった。セラミック被覆刃でバイオプシーした胚は、胚のダメージが小さく、その後の胚の発育が良好で、ガラス化保存後の生存性が改善することが示唆された。

2 移植実証試験

バイオプシーをセラミック被覆刃で行った期間において、バイオプシー胚をセンター融解およびフィールド融解で、各々16頭、7頭に移植した結果、8頭 (50%)、5頭 (71%) が受胎したが、金属刃で行った期間において、各々29頭中12頭 (41%)、17頭中4頭 (24%) が受胎した (第1表)。小田ら (2004) は、金属刃でバイオプシーした胚を、本試験で用いた同じガラス化液で保存し、センター融解で移植した結果、受胎率は36.2% (17/47頭) と報告している。また、秋山ら (2005) は、小田ら (2004) と同様に、同じ手法でバイオプシー、ガラス化保存後、センター融解による移植で40.0% (12/30頭)、フィールド融解で42.8% (6/14頭) と報告している。これらの成績や当場での対照区の成績と比較して、被覆区の実績は、やや高い結果が得られた。また、流産率は、各々19% (3/16頭)、8% (1/13頭) と被覆区が低率であった。これらのことから、金属刃よりセラミック被覆刃でバイオプシーすると、保存後に高い受胎率が得られることが示唆された。

謝 意

性判別体内胚の移植に協力して頂いた筑後川流域農業共済組合家畜人工授精所およびふくおか県酪協久留米地区乳牛診療人工授精所の関係各位に深謝いたします。

引用文献

- 秋山清, 仲沢浩江, 仲沢慶紀, 岸井誠男 (2001) ウシ受精卵の性別判定方法の検討. 神畜研研報 **88**: 5-9.
- 秋山清, 橋村慎二, 井上信忠, 中澤慶紀, 岸井誠男 (2005) 牛性判別胚のガラス化保存方法の検討. 神畜研研報 **90**: 11-15.
- Hirayama, H., Kageyama, S., Moriyasu, S., Sawai, K., Onoe, S., Takahashi, Y., Katagiri, S., Toen, K., Watanabe, K., Notomi, T., Ymamashina, H., Matsuzaki, S. and A Minamihashi (2004) Rapid sexing of bovine preimplantation embryos using loop-mediated isothermal amplification. *Theriogenology* **62**: 887-896.
- Ishimori, H., Miki, Y., Kishi, M., Seike, K. and H. Kainuma (1992), Vitrification of bovine embryos. *Theriogenology* **37**: 228.
- Leoni, G., Ledda, S. Bogliolo, L. and S. Naitana (2000), Novel approach to cell sampling from preimplantation ovine embryos and its potential use in embryonic genome analysis. *J. Reprod. and Fert.* **119**: 309-314
- 森博太郎, 井口征夫, 福田浩之, 江原正明 (2003)

人に優しい医療用セラミック被覆穿刺針の開発. までりあ **42** (2): 151-153.

- Naitana, S., Loi, P., Ledda, S. Cappai, P., Dattena, M., Bogliolo, L. and G. Leoni (1996), Effect of biopsy and vitrification on in vitro survival of ovine embryos at different stages of development. *Theriogenology* **46**: 813-824.
- 小田頼政, 黒岩力也, 古川恵, 有安則夫, 水木剛 (2004) 雌雄判別ガラス化保存ウシ胚のストロー内希釈の検討. 岡山総畜セ研報 **15**: 28-33.
- Sakatani, M., Suda, I., Oki, T., Kobayashi, S., Kobayashi, S. and M. Takahashi (2007), Effects of purple sweet potato anthocyanins on development and intracellular redox status of bovine preimplantation embryos exposed to heat shock. *J. Reprod. Dev.* **53**: 605-614.
- 上田修二 (1996) 牛の体外受精. 西日本畜産学会会報 **39**: 1-5.
- 上田修二, 平嶋善典 (1997) 発生培地中のグルコース, アミノ酸及び浸透圧が牛体外受精胚の発育に及ぼす影響. 福岡農総試研報 **16**: 100-104.
- 上田修二, 森 美幸, 笠正二郎 (2002) ウシ初期胚の発育ステージおよび採取部位別の性別判定率と凍結条件の違いによる受胎率. 福岡農総試研報 **21**: 49-52.
- Vajta, G., Rindom, N., Peura, T. T., Holm, P., Greve, T. and H. Callesen (1999) The effect of media, serum and temperature on in vitro survival of bovine blastocysts open pulled straw (OPS) vitrification. *Theriogenology* **52**: 939-948.