

## ウシ遺伝子診断胚の再保存に対する超急速ガラス化保存の有効性

高橋 利清<sup>1\*</sup>・西宮 弘<sup>1</sup>・伊藤 隆<sup>1</sup>・眞鍋 昇<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 秋田県農林水産技術センター畜産試験場

秋田県大仙市神宮寺字海草沼谷地 13-3 019-1701

<sup>2</sup> 東京大学大学院農学生命科学研究科高等動物教育研究センター附属牧場

茨城県笠間市安居 3145 319-0206

2011年1月14日 受理

### 要 約

優良遺伝子を有するウシ胚の有効利用を図るため、既存凍結胚に対し遺伝子診断用のバイオプシーを行い、再び超低温保存した場合の保存方法について検討した。ウシの体内由来胚を用いて、ステップワイズ (SW) あるいはダイレクト (DI) 法による緩慢凍結で保存された胚を融解し、遺伝子診断用に、胚の一部を切断除去するバイオプシーを行い、DI 法による緩慢凍結および超急速ガラス化保存で再保存した。再保存胚を融解し、生存性および細胞数の測定を行った結果、超急速ガラス化による再保存を行うことで、バイオプシーした再保存胚においても高い生存性が得られ、DI による緩慢再凍結胚と比較してその細胞数も多く、ウシ遺伝子診断胚の再保存に対して、超急速ガラス化保存が有効であることが示唆された。

東北畜産学会報 60(3): 92 ~ 98. 2011

### 緒 言

ウシ胚移植は、優良遺伝形質を有する個体を増産する技術として利用されている。近年、部分的に切除した胚細胞由来 DNA を材料にして、胚段階で性別が可能となっている<sup>6,13,21</sup>。これにより、子牛の誕生前すなわち、胚を移植する段階で、希望の性を選択することが出来る。また、性以外にも遺伝性疾患などの診断にも応用が考えられ、産仔誕生前に様々な有用情報を得ることが可能となっている。しかし、これらの遺伝子診断には、胚細胞の一部を切断採取するバイオプシーを行う必要があり、胚に対する物理的なダメージの増加や、細胞数減少などに起因する、耐凍性の低下が考えられる。

一方、受精卵供給施設などで過去に採取され、バイオプシーを行わずに、従来の緩慢凍結法であるステップ

ワイズ法 (SW)<sup>3</sup> や、ダイレクト法 (DI)<sup>20</sup> により保存された胚についても、その遺伝資源としての価値から、遺伝子診断を行うことは有益と考えられる。しかし、既存胚を融解しバイオプシーを行った場合、耐凍性が低下するため凍結保存は困難である。このため、サンプル採取後、速やかに新鮮胚として移植する必要があるが、移植予定日に多数の移植適合受胎牛を確保することは困難な場合が多く、受胎牛の状態などにより移植不可となることもあり、この場合には診断胚から産仔を得ることは難しくなる。一方、胚の超低温保存に関して、既存の緩慢凍結法と比較して融解後の胚生存性が高い方法として、超急速ガラス化保存の利用が考えられ<sup>8,9,11,17,19</sup>、性別胚に対する超急速ガラス化保存の有効性も報告されている<sup>18</sup>。

しかしながら、緩慢凍結で保存されたウシ体内由来胚を、融解後に遺伝子診断用にバイオプシーし、超急速ガラス化で再保存することについての報告は無いため、本研究において、その有効性を検討した。

\* 連絡者：高橋 利清 (たかはし としきよ)  
(秋田県農林水産技術センター畜産試験場)  
〒 019-1701 秋田県大仙市神宮寺字海草沼谷地 13-3  
Tel : 0187-72-2511 Fax : 0187-72-2807  
E-mail : t-takahashi@pref.akita.lg.jp

## 材料および方法

### 供試胚の生産

ウシ体内由来胚は、黒毛和種雌牛に卵胞刺激ホルモン製剤 (FSH, アントリン R・10<sup>®</sup>, 共立製薬株式会社, 東京) を3日間減量投与 (総量 20 AU) し、FSH 処理開始 48 時間後にプロスタグランディン F2 $\alpha$  製剤 (エストラメイト<sup>®</sup>, ナガセ医薬品株式会社, 兵庫) を投与して過排卵処置を施し、黒毛和種の凍結精液を用いて人工授精 (AI) して作出した。AI 後 7 日目にエンブリオテック (日本全業工業株式会社, 福島) を回収液として非外科的に胚を採取した。採取胚は顕微鏡下 (IMT-2; オリンパス株式会社, 東京) で品質評価し、国際胚移植学会の基準により Excellent および Good の胚盤胞を試験に用いた。

### 胚の凍結保存

ステップワイズ法: 凍結液として 10% Glycerol (v/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、4 mg/ml Bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich)、1  $\mu$ l/ml, Antibiotic-Antimycotic (Gibco Inc., Grand Island, NY, USA) を添加した D-PBS (Gibco) を用いた。胚を含む凍結液を 0.25 ml のプラスチックストロー (富士平工業株式会社, 東京) に充填および封入し、プログラムフリーザー (ET-1, 富士平工業株式会社) を用いて -6  $^{\circ}$ C から毎分 0.5  $^{\circ}$ C の速度で冷却した。-35  $^{\circ}$ C まで冷却した後、液化窒素に浸漬し凍結保存した。

ダイレクト法: 凍結液として 1.5 M の Ethylene glycol (EG, Wako Pure Chemical Industries Ltd, Osaka)、Sucrose (0.1 M, Sigma-Aldrich)、BSA (4 mg/ml)、Antibiotic-Antimycotic (1  $\mu$ l/ml) を添加した D-PBS を用いた。また、移植液として 4.77 mg/ml, HEPES (Sigma-Aldrich)、0.35 mg/ml, Sodium hydrogen carbonate (NaHCO<sub>3</sub>; Sigma-Aldrich)、2.2 mg/ml, Sodium pyruvate (Sigma-Aldrich)、7.7 mg/ml, Cysteamine (Sigma-Aldrich) を含む TCM-199 (Gibco) を用いた (199A)。胚を含む凍結液および移植液を 0.25ml のプラスチックストロー (富士平工業株式会社) に充填および封入し、プログラムフリーザー (ET-1, 富士平工業株式会社) を用いて -6 $^{\circ}$ C から毎分 0.5 $^{\circ}$ C の速度で冷却した。-35 $^{\circ}$ C まで冷却した後、液化窒素に浸漬し凍結保存した。

### 凍結保存胚の融解

ステップワイズ法: 融解液として 6% Glycerol (v/v)、0.3 M, Sucrose、3 mg/ml, BSA、1  $\mu$ l/ml, Antibiotic-Antimycotic を添加した D-PBS (6% GL)、6% GL の

Glycerol を 3% (3% GL) および 0% (0% GL) にしたものを用いた。

液体窒素で保存した、胚を含むプラスチックストローを空气中で 6 秒間保持し、30 $^{\circ}$ C の温湯に 20 秒間浸漬し融解した。ストロー内容物から胚を取り出し、6%GL、3%GL および 0%GL に 5 分間ずつ平衡して凍結液の除去を行った。なお、平衡終了後は TCM-199 (Gibco) を基礎培地として、4 mg/ml, BSA、2.5  $\mu$ l/ml, Linoleic acid albumin (LAA; Sigma-Aldrich)、10  $\mu$ l/ml, Insulin Transferrin Selenium (ITS; Gibco)、2.2 mg/ml, Sodium pyruvate、7.7 mg/ml, Cysteamine、1  $\mu$ l/ml, Antibiotic-Antimycotic を添加した培養液 (m-199) を用いた。培養は、パラフィンオイル (Sigma-Aldrich) で覆った 4 穴シャーレ (Nunc, Roskilde, Denmark) 内で、38.5  $^{\circ}$ C、5% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、90% N<sub>2</sub>、飽和湿度の条件下で行った。

ダイレクト法: 液体窒素で保存した、胚を含むプラスチックストローを空气中で 10 秒間保持し、30  $^{\circ}$ C の温湯に 20 秒間浸漬し融解した。5 分間保持しストロー内容物から胚を取り出し m-199 で洗浄後、ステップワイズ法と同様の条件で体外培養を行った。

### 胚のバイオプシー

融解胚を 3 時間培養し、胞胚腔が確認できたものを生存胚とし、バイオプシーを行った。マイクロマニピュレーターシステム (ICSI/IMSI; オリンパス株式会社) にセットした、外径約 100-120  $\mu$ m のホールディングピペットと、針状に加工したカッピングピペットを用いて、胚の透明帯部分を一部切開した。なお、操作液は胚の回収液とし、ピペットの加工は PC-10、MF-900 (株式会社ナリシゲ, 東京) で行い、透明帯切開後は、m-199 にパラフィンオイル (Sigma-Aldrich) で覆った 4 穴シャーレ (Nunc) 内で、20-24 時間の体外培養を行った (38.5  $^{\circ}$ C、5% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、90% N<sub>2</sub>、飽和湿度)。バイオプシーは、透明帯から胚細胞が一部脱出している胚を用い、4 穴シャーレ (Nunc) の蓋に 38.5  $^{\circ}$ C に加温した D-PBS (Gibco) を 300  $\mu$ l のドロップ状に形成し、胚を移した。脱出した胚の一部を、マイクロマニピュレーターシステムに取り付けたマイクロフェザーブレード (K-715; フェザー安全剃刀株式会社, 大阪) により切除した。バイオプシーした胚は透明帯切開後の培養と同条件で 3 時間の修復培養を行い供試した。

### ウシ胚の超急速ガラス化保存

ガラス化液として、2.42 M EG (15% (v/v) ,

Wako)、1.9 M Dimethylsulfoxide (15% (v/v), Sigma-Aldrich)、0.2 M Sucrose (Sigma-Aldrich) を添加した 199A を用いた。また、ガラス化液を 199A で等量希釈したものを平衡液とした。

超急速ガラス化保存は Solid Surface Vitrification (SSV) 法<sup>4)</sup>の改変で行い、胚を、37℃に加温した平衡液で5分間処理した後、ガラス化液に移し、30秒以内にマイクロピペットを用いて0.8 μlのガラス化液と共に、液体窒素で冷却したアルミ板上に滴下してガラス化保存した。その後、マイクロチューブに入れ、液体窒素中にて保存した。

### 超急速ガラス化保存胚の融解および培養

融解は、液体窒素中のマイクロチューブをアルミプレート上に取り出し、37℃に加温した0.2 M Sucrose 添加 199A に保存胚を移し融解した。5分間静置後に、4穴シャーレ (Nunc) にパラフィンオイル (Sigma-Aldrich) で覆った m-199 に移し、38.5℃、5% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、90% N<sub>2</sub>、飽和湿度の気相条件下で培養した。

### 再保存胚の細胞数測定

胚の細胞数測定は二重染色を用いて行った<sup>16)</sup>。すなわち、胚を0.1 mg/ml Propidium Iodide (PI, Sigma-Aldrich) を添加した0.2% Triton X-100-PBSで1分間処理し、次いで、25 μg/ml, Bis-benzimide (Hoechst 33342; Sigma-Aldrich) を添加した99.5% Ethanol (Sigma-Aldrich) に胚を移し、4℃遮光下で3時間の染色処理を行った。さらに、VectaShield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) で余分な染色液を洗浄し、胚を含む処理液をスライドグラスに滴下し、カバーグラスを乗せることで押しつぶしを行った。観察は蛍光顕微鏡 (IMT-2; オリンパス株式会社) で行い、内細胞塊 (ICM: Inner cell mass) および栄養外胚葉 (TE: Trophectoderm) の数を測定した。

### 試験1：ステップワイズ法で保存された凍結胚の再保存についての検討

ステップワイズ法 (SW) で緩慢凍結保存した胚を融解し、24時間培養後に、体外操作によりバイオプシー (Bx) を行い、3時間の修復培養後に再度ダイレクト法 (DI) による緩慢凍結した SW-Bx-DI 区および、再保存を SSV 法による超急速ガラス化保存法 (Vit) で行った、SW-Bx-Vit 区を設定して検討した。各区で再融解を行い、3、24 および 48 時間後の生存性を検討した。なお、培養後に胞胚腔を形成した胚を生存胚とした。

### 試験2：ダイレクト法で保存された凍結胚の再保存についての検討

ダイレクト法 (DI) で緩慢凍結保存した胚を融解し、3時間培養後に再度 DI で保存した DI-DI 区、24時間の体外培養後に、体外操作によりバイオプシー (Bx) を行い、3時間の修復培養後に再度 DI による緩慢凍結した、DI-Bx-DI 区および、再保存を SSV 法による超急速ガラス化保存法 (Vit) で行った、DI-Bx-Vit 区の計3区を設けた。各区で再融解を行い、3、24 および 48 時間後の生存性を検討した。なお、培養後に胞胚腔を形成した胚を生存胚とした。

### 試験3：再保存胚の細胞数についての検討

試験2で得られた、DI-Bx-DI 区および DI-Bx-Vit 区の48時間生存胚における ICM および TE の細胞数について、二重染色を行い計測した。

### 統計処理

全ての統計処理は  $\chi^2$  検定で行った。

## 結果

### 試験1：ステップワイズ法で保存された凍結胚の再保存についての検討

ステップワイズ法 (SW) で緩慢凍結保存した融解胚をバイオプシー (Bx) 後に再度ダイレクト法 (DI) による緩慢凍結した、SW-Bx-DI 区での3,24 および 48 時間後の生存率は、80.0% (8/10)、70.0% (7/10)、50.0% (5/10) であった。一方、再保存を超急速ガラス化保存法 (Vit) で行った、SW-Bx-Vit 区では91.7% (11/12)、83.3% (10/12)、83.3% (10/12) であり、SW-Bx-DI 区と比較して有意な差は認められないものの、融解48時間後でも高い生存率が得られた (表1)。

表1. ステップワイズ法で凍結保存された胚の再保存後の生存性

区分 <sup>1)</sup>	供試胚数 <sup>2)</sup>	再保存後の生存胚数 (%)		
		3時間後	24時間後	48時間後
SW-Bx-DI	10	8 (80.0%)	7 (70.0%)	5 (50.0%)
SW-Bx-Vit	12	11 (91.7%)	10 (83.3%)	10 (83.3%)

- 1) SW-Bx-DI: ステップワイズ法 (SW) 保存胚を融解後、1日体外培養後にバイオプシー (Bx) し、再度ダイレクト法で保存  
SW-Bx-Vit: ステップワイズ法保存胚を融解後、1日体外培養後にバイオプシーし、超急速ガラス化保存法で保存
- 2) SW 保存胚を融解し、生存確認した胚数

### 試験2：ダイレクト法で保存された凍結胚の再保存についての検討

ダイレクト法 (DI) で緩慢凍結保存した融解胚を、

再度DIで保存したDI-DI区での3,24および48時間後の生存率は、75.0% (6/8)、62.5% (5/8)、62.5% (5/8)であった。また、融解胚をバイオプシー (Bx) 後に再度ダイレクト法 (DI) による緩慢凍結した、DI-Bx-DI区では60.0% (6/10)、60.0% (6/10)、40.0% (4/10)であった。更に再保存を超急速ガラス化保存法 (Vit) で行った、DI-Bx-Vit区では90.0% (9/10)、90.0% (9/10)、90.0% (9/10)であり、DI-Bx-Vit区における48時間後の生存率は、DI-Bx-DI区と比較して有意に高かった ( $p < 0.05$ ) (表2, 図1)。

### 試験3：再保存胚の細胞数についての検討

試験2で検討したDI-Bx-DI区およびDI-Bx-Vit区の再融解後48時間の生存胚における細胞数を測定した結果、内細胞塊 (ICM) では32.5個 vs 36.8個となり、栄

表2. ダイレクト法で凍結保存された胚の再保存後の生存性

区分 <sup>1)</sup>	供試胚数 <sup>2)</sup>	再保存後の生存胚数 (%)		
		3時間後	24時間後	48時間後
DI-DI	8	6 (75.0%)	5 (62.5%)	5 (62.5%)
DI-Bx-DI	10	6 (60.0%)	6 (60.0%)	4 (40.0%) <sup>a</sup>
DI-Bx-Vit	10	9 (90.0%)	9 (90.0%)	9 (90.0%) <sup>b</sup>

- 1) DI-DI：ダイレクト法 (DI) 保存胚を融解後、1日体外培養し再度ダイレクト法で保存  
DI-Bx-DI：ダイレクト法保存胚を融解後、1日体外培養後にバイオプシー (Bx) し、再度ダイレクト法で保存  
DI-Bx-Vit：ダイレクト法保存胚を融解後、1日体外培養後にバイオプシーし、超急速ガラス化保存法で保存  
2) DI保存胚を融解し、生存確認した胚数  
異符号間に有意差あり ( $P < 0.05$ )

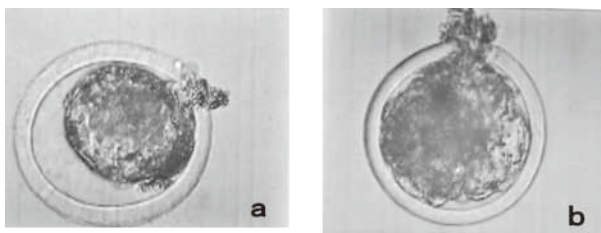


図1 ガラス化再保存後の胚

- a：DI-Bx-Vitで保存した再融解直後のウシ胚  
b：融解3時間後のa胚

表3. バイオプシーしたウシ再保存胚における融解48時間後の細胞数

区分 <sup>1)</sup>	供試胚数 <sup>2)</sup>	再保存生存胚の細胞数 (個) <sup>3)</sup>		
		内細胞塊 (ICM)	栄養外胚葉 (TE)	総細胞数
DI-Bx-DI	4	32.5 ± 1.9	51.3 ± 2.1	83.8 ± 3.8
DI-Bx-Vit	9	36.8 ± 1.7	59.3 ± 3.0	96.1 ± 3.2

- 1) DI-Bx-DI：ダイレクト法保存胚を融解後、1日体外培養後にバイオプシー (Bx) し、再度ダイレクト法で保存  
DI-Bx-Vit：ダイレクト法保存胚を融解後、1日体外培養後にバイオプシーし、超急速ガラス化保存法で保存  
2) 各区の再保存胚を融解後48時間まで生存した胚数  
3) 平均値 ± 標準誤差

養外胚葉 (TE) では51.3 vs 59.3個で、総細胞数は83.8個 vs 96.1個であり、全ての細胞数でDI-Bx-Vit区が高い値となった (表3)。

## 考察

超低温での胚の再保存に関しては、哺乳動物ではマウスやラット、ヒトでの報告があり<sup>5,7,10,14</sup>、再保存後の生存性や、その後の受胎性および産仔への異常は認められていない。また、減数分裂中期のウシ卵母細胞を用いて、Solid Surface Vitrification (SSV法) とクライオトップ法による超急速ガラス化保存を行い、どちらの方法で保存した卵母細胞も、同等の発生能を有することや<sup>15</sup>、性判別用にバイオプシーしたウシ胚を、ストロー内ガラス化保存の直接融解した場合に、高い生存性が得られ、受胎率も非ガラス化区と同等だったとの報告もある<sup>1)</sup>。本研究では、ウシの体内由来胚を用いて、ステップワイズおよびダイレクト法による緩慢凍結で保存された胚を融解し、胚の一部を切断除去するバイオプシーを行い、再保存を行ったところ、超急速ガラス化保存法による再保存を行うことで、高い生存性が得られた。これは、耐凍剤を緩慢凍結法より高濃度にして処理することにより、胚細胞内の脱水および耐凍剤の浸透を同時に行い、急激な温度低下により細胞内外の氷晶形成を抑制するというガラス化保存の効果が、凍結保存や、その後のバイオプシーなどダメージを受けた胚に対しても有効に働き、再保存胚へのダメージが軽減されたものと考えられる。マウスの8細胞期胚から1割球を除去するバイオプシーを行い、SSV法で保存した場合、ストローでのガラス化保存と比較して高い生存性が得られ、出生率もバイオプシーしていないインタクト胚と変わらないという報告もある<sup>2)</sup>。また、性判別用にバイオプシーしたウシ胚は、新鮮移植では一定程度の受胎率が得られるが、緩慢凍結による超低温保存では生存性が低下し、インタクト胚と比較して受胎率が低下することも知られている<sup>12)</sup>。今回、再保存胚の細胞数についても検討したところ、緩慢凍結で再保存した場合には、SSV法で再保存した胚と比較して、胚を構成する内細胞塊や栄養外胚葉並びに、総細胞数が低下しており、緩慢凍結において、バイオプシー胚に対するダメージが、より大きいことが示唆された。今後は、移植試験等により、再保存胚の受胎性や産仔の正常性を確認する必要がある。

以上の結果より、緩慢凍結したウシ体内由来胚を融解し、バイオプシー後に再保存する場合に、超急速ガラス化保存を用いることで高い生存性が得られ、その細胞数も、緩慢再凍結胚と比較して多いことが判明し、ウシ遺

伝子診断胚の再保存に対して超急速ガラス化保存が有効であることが示唆された。

## 謝 辞

本研究の実施にあたり、ウシ卵巢の採材に協力いただいた、秋田市食肉衛生検査所および秋田県食肉流通公社の職員諸氏に深謝します。

## 引用文献

- 1) Akiyama K, Kobayashi J, Sato Y, Sata R, Ohashi M, Sasaki E, Oda Y, Ogawa Y, Ueda S, Nabenishi H, Matoba S. Calf production from vitrified bovine sexed embryos following in-straw dilution. *Anim Sci J.*, 81: 461-466. 2010.
- 2) Baranyai B, Bodó S, Dinnyés A, Gócza E. Vitrification of biopsied mouse embryos. *Acta Vet Hung.*, 53: 103-112. 2005.
- 3) Bielanski A, Schneider U, Pawlyshyn VP, Mapletoft RJ. Factors affecting survival of deep frozen bovine embryos *in vitro*: The effect of freezing container and method of removing cryoprotectant. *Theriogenology.*, 25: 429-437. 1986.
- 4) Dinnyés A, Dai Y, Jiang S, Yang X. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod.*, 63: 513-518. 2000.
- 5) Hiraoka K, Hiraoka K, Horiuchi T, Kusuda T, Okano S, Kinutani M, Kinutani K. Case report: successful delivery following the transfer of a human re-vitrified day-7 spontaneously hatched blastocyst developed from vitrified cleaved embryos. *J Assist Reprod Genet.*, 26: 405-409. 2009.
- 6) Hirayama H, Kageyama S, Moriyasu S, Sawai K, Onoe S, Takahashi Y, Katagiri S, Toen K, Watanabe K, Notomi T, Yamashina H, Matsuzaki S, Minamihashi A. Rapid sexing of bovine preimplantation embryos using loop-mediated isothermal amplification. *Theriogenology.*, 62: 887-896. 2004.
- 7) Kumasako Y, Otsu E, Utsunomiya T, Araki Y. The efficacy of the transfer of twice frozen-thawed embryos with the vitrification method. *Fertil Steril.*, 91: 383-386. 2009.
- 8) Kuwayama M, Kato O. All-round vitrification method for human oocytes and embryos. *J Assist Reprod Genet.*, 17: 477(abstract). 2000.
- 9) Lane M, Bavister BD, Lyons EA, Forest KT. Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. *Nat Biotechnol.*, 17: 1234-1236. 1999.
- 10) Isachenko V, Folch J, Isachenko E, Nawroth F, Krivokharchenko A, Vajta G, Dattena M, Alabart JL. Double vitrification of rat embryos at different developmental stages using an identical protocol. *Theriogenology.*, 60: 445-452. 2003.
- 11) Papis K, Shimizu M, Izaike Y. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology.*, 54: 651-658. 2000.
- 12) Picard L, King WA, Betteridge KJ. Production of sexed calves from frozen-thawed embryos. *Vet Rec.*, 117: 603-608. 1985.
- 13) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.*, 239: 487-491. 1988.
- 14) Sheehan CB, Lane M, Gardner DK. The CryoLoop facilitates re-vitrification of embryos at four successive stages of development without impairing embryo growth. *Hum Reprod.*, 21: 2978-2984. 2006.
- 15) Sripunya N, Somfai T, Inaba Y, Nagai T, Imai K, Parnpai R. A comparison of cryotop and solid surface vitrification methods for the cryopreservation of *in vitro* matured bovine oocytes. *J Reprod Dev.*, 56: 176-181. 2010.
- 16) Thouas GA, Korfiatis NA, French AJ, Jones GM, Trounson AO. Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of

- mouse and bovine blastocysts. *Reprod Biomed Online.*, 3: 25-29. 2001.
- 17) Tominaga K, Hamada Y. Gel-loading tip as container for vitrification of *in vitro*-produced bovine embryos. *J Reprod Dev.*, 47: 267-273. 2001.
- 18) Tominaga K, Hamada Y. Efficient production of sex-identified and cryosurvived bovine *in-vitro* produced blastocysts. *Theriogenology.*, 61: 1181-1191. 2004.
- 19) Vajta G, Booth PG, Holm P, Greve T, Callesen H. Successful vitrification of early stage bovine *in vitro* produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. *Cryo-Letters.*, 18: 191-195. 1997.
- 20) Voelkel SA, Hu YX. Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females. *Theriogenology.*, 37: 687-697. 1992.
- 21) Zoheir KM, Allam AA. A rapid method for sexing the bovine embryo. *Anim Reprod Sci.*, 119: 92-96. 2010.

## **Feasibility of vitrification for re-preservation of frozen-thawed bovine embryos after pre-implantation genetic diagnosis**

Toshikiyo TAKAHASHI<sup>1</sup>, Hiroshi NISHINOMIYA<sup>1</sup>, Ryu ITOH<sup>1</sup> and Noboru MANABE<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Livestock Experiment Station, Akita Prefectural Agriculture, Forestry and Fisheries Research Center, Daisen, Akita  
019-1701, Japan

<sup>2</sup> Animal Resource Science Center, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Kasama  
319-0206, Japan

For the effective utilization of bovine embryos with superior genes we examined the efficacy of low-temperature preservation methods for the re-preservation of cryopreserved bovine embryos after thawing and genetic diagnosis. *In vivo* produced bovine embryos were preserved at the blastocyst stage by slow freezing either by using the stepwise (SW) or direct (DI) methods. Then the embryos were thawed and biopsied for genetic diagnosis by excising a part of the embryo, and preserved again either by slow freezing with the DI method or by Solid Surface Vitrification method. Re-preserved embryos were thawed and tested for viability and cell counts. The results revealed significantly higher viability and higher cell numbers of frozen-thawed biopsied embryos after ultra rapid vitrification compared to those of embryos re-preserved by slow freezing. In conclusion vitrification appears more effective than slow freezing for the successful re-preservation of frozen bovine embryos after thawing and genetic diagnosis.

**Key words:** vitrification, re-preservation, biopsied embryo, bovine.