

ウシ体外受精胚の最小容量冷却法に用いる耐凍剤の選定

米村 功・大下雄三・妻由道明

要 約

ウシ体外受精胚など比較的凍結に弱い胚の凍結保存改善のため、ガラス化保存の発展法である最小容量冷却法（以下 MVC 法と略す）に用いる耐凍剤について検討した。

胚の保存器具にはクライオトップを用いた。その結果、MVC 法の耐凍剤に 15% エチレングリコール (EG) 及び 15% ジメチルスルホキシド (DMSO) を混合し耐凍剤濃度を合計で 30% にした場合が胚の生存率が 83.0% (39/47) であり、EG 単独で耐凍剤濃度を合計で 30% にした場合が 68.4% であった。MVC 法の耐凍剤には EG と DMSO を混合した場合が EG 単独の場合より融解後の胚の生存率が高く、耐凍剤は混合する方が実用的と考えられた。今後はこれらの結果を性判別胚及び低ランク胚等の凍結保存へ応用が可能と考え、和牛繁殖農家で受精卵移植する場面へ普及する。

緒 言

卵子あるいは雌雄判別のためバイオプシーされた牛胚を緩慢冷却法による凍結保存した場合、その生存性が大きく減じることが知られており^{1) 2)}、これらの超低温保存法としてガラス化法の有効性が報告されている³⁾。

ガラス化保存法は、超低温保存時に氷晶が形成されないため氷晶による細胞への物理的障害の発生が低減出来る。また細胞などにとって危険とされる温度域に曝される時間を短縮することが可能となる点などの有効性を持っている。一方、ガラス化保存法は高い耐凍剤濃度の保存溶液を用いるために、耐凍剤による細胞毒性が懸念される。また高い浸透圧を持った保存液による大きい浸透圧変化の障害などの欠点が指摘されている。

近年、急速なガラス化冷却法としてマイクロドロップレット、オープンブルドストロー及びクライオループなどの器具等によるガラス化保存が開発され、従来凍結保存が困難であった卵子や性判別ウシ胚などの超低温保存で成果を得ている。さらに最近ゲルローディングチップ及びクライオトップなどの器具を用いた最小容量冷却法

（以下、MVC 法と略す）により、およそ -20,000 /分と極めて高速な冷却速度を実現した超低温保存法が開発されている⁴⁾。これら MVC 法の開発により、従来のガラス化保存法よりも低い濃度の耐凍剤濃度での保存が可能となってきた。

また、ウシ胚等の凍結保存に用いる耐凍剤の種類として EG は胚に対する毒性の低さ及び細胞内への浸潤、希釈の早さ等からその有効性が広く知られている^{5) 6)}。そこで本研究では、MVC 法に適した耐凍剤を検討するために、ウシ体外受精胚を用い、15% (V/V) EG 及び 15% (V/V) DMSO を混合し耐凍剤濃度を合計で 30% にした場合と EG 単独で耐凍剤濃度を 30% (V/V) にした場合の超低温保存後の胚の生存率を調査した。

材 料 及 び 方 法

1 供試ウシ胚

鳥取県食肉センターに出荷された、黒毛和種、交雑種及び乳用種の卵巣を用い、卵巣採取時から 21 ~ 24 時間

15 ~ 20、抗生物質（硫酸カナマイシン 100mg/l）を含む生理食塩水で保存した。体外受精方法は機能性ペプチド研究所製の「エンブリオパック」非共培養完全セットを用いて、裸化受精卵無血清培養法（低酸素培養）Ver.1.2⁷⁾により実施し、体外受精後7日～8日に生産された胚盤胞を供試した。

2 凍結保存器具

最小量冷却法が可能な器具としてクライオトップ（北里サプライ、静岡市）を用いる。

3 凍結溶液

胚を取り扱う基礎培養液には、10%（V/V）ウシ胎子血清（FBS）を含む25mM HEPES 緩衝 TCM-199（インビトロジェン）を用いた。基礎凍結溶液は、基礎培養液に0.5M シュークロース（SU）を添加し、耐凍剤を試験区分の濃度に従って調整した。耐凍剤別の試験区分には、kuwayama⁸⁾の報告している15%（V/V）EG 及び15%（V/V）DMSO を混合し耐凍剤濃度を合計で30%（V/V）にした試験区（30%CPA 区）及び基礎凍結溶液に耐凍剤にEG 単独で用い、耐凍剤濃度を30%（V/V）にした試験区（30%EG 区）で比較した。

4 胚の凍結

(1)凍結溶液への平衡と凍結

15%の耐凍剤濃度に調整した一次平衡液に4分間浸漬する。ついで凍結溶液に移し30秒以上～45秒以内に、極少量（約0.4マイクロリットル）の凍結溶液とともにクライオトップの先端部に滴下し、液体窒素に先端部を投入する。

(2)保存

クライオトップの先端部にキャップを取り付け全体を液体窒素に投入し、液体窒素中で保存する。

(3)胚の融解と培養

クライオトップの先端部を1M SUを含む培養液に1分浸漬し、ついで0.5M SUを含む培養液に3分間浸漬した後、培養液中で5%CO₂、38.5℃、24時間～48時間培養する。

(4)胚の生存性の判定

保存後、融解培養した胚が保存以前の発育段階より進

んだ発育段階になった場合に生存と判定した。

結 果

耐凍剤種類別の保存胚の生存率を表1に示した。耐凍剤別の胚の生存率においては耐凍剤に30%（V/V）CPAを用いた場合が83.0%と、30%EGを用いた場合の68.4%よりも有意差は認められないが、生存率は図1のとおり上まわっていた。

胚の発育段階別の生存率では拡張期胚盤胞（EXP）が86.5%と胚盤胞の生存率69.0%よりも有意差は無いが上まわった。これらのことより、耐凍剤の選択には、15%（V/V）EG 及び15%（V/V）DMSO を混合し耐凍剤濃度を合計で30%（V/V）にした場合がEG 単独で耐凍剤濃度を30%（V/V）にした場合よりも有効と考えた。

表1 耐凍剤種類別の保存胚の生存率

区分	胚の種類	供試胚数	生存胚数	発育無胚数	発育率(%)
30%CPA	EXP	29	25	4	86.2
	BL	18	14	4	77.8
	小計	47	39	8	83.0
30%EG	EXP	8	7	1	87.5
	BL	11	6	5	54.5
	小計	19	13	6	68.4

EXP：拡張期胚盤胞、BL：胚盤胞

考 察

クライオトップを用いた、体外受精胚の凍結利用の可能性においては、胚の生存率が30%CPA 区で83.0%と高率に生存胚が得られたことから、実用有望な方法であると考えた。クライオトップを用いて凍結された胚の利用は、緩慢冷却法と比べて作業時間が短いこと、また高価なプログラムフリーザーが不要なので設備コストが低いなどの利点がある。しかし、融解処理は施設器具の使用可能な場所で行う必要があり、農家での庭先融解に対応しにくい。またクライオトップは医療用器具であり、や

やコスト高な面もある。

今後はクライオトップ等 MVC 法によるガラス化保存された胚の農家の庭先での利用性を向上させるため、簡便な融解及び移植のシステムを構築する必要があると考える。また、これらの結果を性判別胚及び低ランク胚等の凍結保存へ応用が可能と考え、和牛繁殖農家で受精卵移植する場面へ普及可能とする技術開発に結びつける。

謝 辞

本研究の実施に当たり、株式会社鳥取県食肉センターには卵巣の提供を得た。また鳥取県食肉衛生検査所の方々には卵巣の採取、卵巣の一時処理及び保存等において多大な協力を戴いた、ここに深く感謝する。

参 考 文 献

- 1) 福島護之ら、体外受精由来胚盤胞の凍結能についての特性、J. Reprod. Dev.,38,49-54(1992)
- 2) 福島護之ら、体外受精・体外培養法で作出された牛胚盤胞の凍結融解後の受胎性、繁殖技術会誌、14.1-5(1992)
- 3) 窪田力ら、牛胚のガラス化凍結法の検討、鹿児島肉改研報、5,15-18(2000)
- 4) 富永敬一郎ら、ゲル・ローディング・チップを用いたウシ体外受精由来初期胚のガラス化保存 J. Reprod. Dev. 47: 267-273,(2001)
- 5) Kasai M.,etal: Effects of Various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos. J.Reprod.Fert.63,175-180(1981)
- 6) 福島護之ら、凍結保護物質にエチレングリコールを用いたウシ体外受精由来凍結胚のストロー内希釈・移植法の検討、兵庫農技セン報、31,1-6(1995)

7) (株)機能性ペプチド研究所製「エンブリオパック」
裸化受精卵無血清培養法(低酸素培養) Ver.1.2(1997)

8) Kuwayama M, Kato O, All-round vitrification method for human oocytes and embryos. J. Assist Reprod. and Genet. 17.8.477(2000)