

受精卵移植簡易化試験

(1)牛胚のガラス化凍結保存

山城存 比嘉直志 千葉好夫

I 要 約

牛胚の凍結融解後の生存率を高めるため、ガラス化凍結保存方法について検討した。ガラス化凍結保存溶液には、25%エチレングリコールと25%ジメチルスルフォオキシド(25%DMSO)を含む溶液を用いて実施し、ガラス化保存区とした。ガラス化凍結保存方法の比較対照としては、現在広く普及している、10%エチレングリコールを含む溶液を使用したダイレクト凍結保存方法を用いた。その結果は以下のとおりであった。

1. 体内受精胚におけるガラス化保存区の融解培養3時間後の生存率は、51.6%でありダイレクト保存区と有意差はなかった。
2. 性判別胚におけるガラス化保存区の融解培養3時間後の生存率は、50.0%でありダイレクト保存区よりやや高かった。
3. 体細胞クローン胚におけるガラス化保存区の融解培養3時間後の生存率は、33.3%でありダイレクト保存区と差はなかった。

II 結 言

現在、胚の凍結保存は低い濃度のエチレングリコール(EG)やグリセリン(GL)を用いたダイレクト凍結保存方法が広く実施されている。ダイレクト凍結保存方法は、胚をストロー内へ封入後プログラムフリーザーを用いて約1時間30分かけて-30℃まで冷却後液体窒素へ浸漬する緩慢凍結方法である¹⁾。

一方、ガラス化凍結保存方法は胚をストロー内へ封入後すぐに液体窒素へ浸漬する急速凍結方法なので凍結までの時間が短縮され、またプログラムフリーザーを必要としない点で簡易的胚の凍結方法とされる。さらにガラス化凍結保存方法は、高濃度の凍結保護物質で胚を処理して細胞内の脱水と凍結保護物質の浸透・濃縮を同時に行ない、細胞内外に氷晶形成を起こさせないため胚への物理的傷害が少なく理想的な胚凍結保存方法とされ最近検討が行なわれている²⁻⁹⁾。しかし高濃度の凍結保護物質に対する毒性などを回避する必要がある、その成績はかならずしも高く安定しているとはいえない⁵⁾。

そこで、時間の短縮と胚の凍結融解後の生存率を高めるため、ガラス化凍結保存方法の有効性について検討したのでその結果を報告する。

III 材料および方法

1. 試験場所

沖縄県畜産試験場で実施した。

2. 試験期間

試験は、1999年10月から2002年1月に実施した。

3. 供試胚

1)体内受精胚

当試験場飼養の供卵牛4頭から得られた、4種類の全兄弟体内受精胚62個をロットごとにガラス化保存区とダイレクト保存区に分けて供試した。

2)性判別胚

当試験場飼養の供卵牛1頭から得られた20個の全兄弟体内受精胚をマイクロブレードにて胚全体の約20%を性判別用サンプルとして切除した後、胚を2時間培養後ガラス化保存区、ダイレクト保存区に分けて供試した。

3)体細胞クローン胚

同一種雄牛の耳細胞をドナー細胞として作成した18個のクローン胚をガラス化保存区、ダイレクト保存区に分けて供試した。

4. 凍結方法

1) ガラス化保存区

調整リン酸緩衝液(m-PBS)を基礎液として、25%EG、25%DMSO、10%スクロースおよび0.4%牛血清アルブミン(0.4%BSA)に調整した溶液をガラス化保存液(VSED液:雪印乳業受精卵移植研究所製)として使用した。

胚の凍結処理は、シャーレ内にて胚を50%VSED液で1分間平衡後VSED液へ移し、0.25mlストローを用いて胚・VSED液の両端に6%GL溶液を満たして詰めた。胚をVSED液へ投入してからストロー内への封入までの時間は30秒以内に行なった。その後液体窒素上のガス中で2分間ストローを静置後、液体窒素へ浸漬保存した。(図1)

2) ダイレクト保存区

m-PBSを基礎液として、10%EG、20%牛胎児血清および0.4%BSAに調整した溶液をダイレクト保存液(EG液)として使用した。

胚の凍結処理は、シャーレ内のEG液に胚を移し、0.25mlのストローへ詰めた。

胚をストロー内へ封入後、-7°Cに保持したプログラムフリーザーへセットして植氷を行ない、10分経過後-30°Cまで毎分0.3°Cの速度で冷却した。-30°Cで10分間保持した後液体窒素へ浸漬保存した。

5. 融解方法

1) ガラス化保存区

液体窒素からストローを取り出し5秒間空気中に保持後、約20°Cの水中で融解した。スクロース層が完全に融解した後、シール部を持って3回振下ろしVSED液と6%GL溶液を混和させた。

ストローをカットしてシャーレ内に胚を取り出し4分間保持後、10%スクロース、0.4%BSA加m-PBSを基礎液とした4%GL添加液、2%GL添加液および0%GL液にそれぞれ2分間静置して凍結保護剤を除去した。

2) ダイレクト保存区

液体窒素からストローを取り出し5秒間空気中に保持後、約20°Cの水中で融解した。融解後ストローをカットしてシャーレ内に取り出し、凍結液とほぼ同量の培養液を加え2分間静置した後培養した。

6. 培養方法

培養条件は両区とも38.5°C、5%CO₂、5%O₂の条件で行ない、培養液には機能性ペプチド研究所製の裸受精卵培養液を用いた。

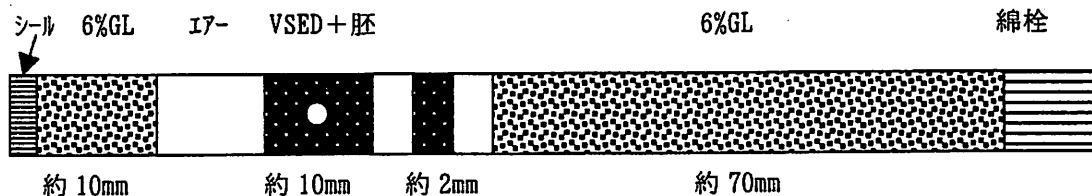


図1 ガラス化凍結保存方法のストロー内模式図

7. 調査項目

胚生存判定は通常長時間培養後に実施されている²⁻⁵⁾、今回著者らは、一部胚を移植に供したことおよび胚の培養後の修復が短時間でおこなわれること¹⁰⁾から、凍結融解直後および3時間培養後の生存率について調査した。融解直後の生存判定は、形態的に凍結前の状態を維持している胚を生存と判定した。3時間培養後の生存判定は、胞胚腔の形成を確認した胚を生存と判定した。

IV 結果および考察

1. 凍結融解後の生存率

体内受精胚の凍結融解後の生存率を表1に示した。融解直後はガラス化保存区平均87.1%、ダイレクト保存区平均100%で両区に有意な差はなかった。

表1 体内受精胚の凍結融解後の生存率

区分	ロット	胚(個数)	融解直後(%)	3時間培養後(%)
ガラス化 保存区	A	15	80.0	46.7
	B	8	87.5	50.0
	C	5	100	80.0
	D	3	100	33.3
		31(合計)	87.1(全体)	51.6(全体)
ダイレクト 保存区	A	16	100	56.3
	B	8	100	50.0
	C	4	100	75.0
	D	3	100	33.3
		31(合計)	100(全体)	54.8(全体)

表2 性判別胚の凍結融解後の生存率

区分	胚(個数)	融解直後(%)	3時間培養後(%)
ガラス化保存区	10	70.0	50.0
ダイレクト保存区	10	60.0	30.0

表3 クローン胚の凍結融解後の生存率

区分	胚(個数)	融解直後(%)	3時間培養後(%)
ガラス化保存区	9	33.3	33.3
ダイレクト保存区	9	44.4	33.3

3時間培養後はガラス化保存区平均51.6%、ダイレクト保存区平均54.8%で両区に有意な差はなかった。胚のロットによる生存率の違いが、ダイレクト保存区の融解直後生存率を除き認められた。このことについては、3時間培養後の生存率がガラス化保存区において高いロットでは、ダイレクト保存区でも高く、ガラス化保存区において生存率の低いロットは、ダイレクト保存区でも低い傾向を示したことから、形態的にほぼ同じ胚でもロットごとに凍結能力が違うことが示唆された。

性判別胚の凍結融解後の生存率を表2に示した。融解直後はガラス化保存区70.0%、ダイレクト保存区60.0%で両区に大きな差はなかった。3時間培養後は、ガラス化保存区50.0%、ダイレクト保存区30.0%でガラス化保存区がやや高かった。

性判別胚などの傷ついた胚の凍結にガラス化凍結保存方法が有効との報告^{3, 9)}があることから、供試胚を増やして他のガラス化凍結液についても検討する必要がある。

クローン胚の凍結融解後の生存率を表3に示した。融解直後はガラス化保存区33.3%、ダイレクト保存区44.4%で両区に大きな差はなかった。クローン胚の3時間培養後は、ガラス化保存区33.3%、ダイレクト保存区33.3%で両区に差はなかった。

ガラス化凍結保存方法は、緒言で述べたようにプログラムフリーザーを必要としないこと、凍結まで

の時間が短縮されること、理論上細胞内外に氷晶形成がない点などで理想的な胚保存方法とされるが、高濃度の凍結保護物質で胚を処理するため胚に対する毒性や、融解処理時のわずかな条件の違いが脱ガラス化による氷晶形成を引き起こし胚の生存性へ大きな影響を与える^{5・6・8}。今回、ガラス化保存区の凍結処理時間は、胚のVSED液への投入から液体窒素への浸漬まで約3分30秒であり凍結処理時間の短縮には有効であった。しかし、凍結融解後の生存率においては、体内受精胚およびクローン胚で従来のダイレクト凍結方法より高い生存率を得ることはできなかった。ことについては、体内受精胚において融解直後の生存率がダイレクト凍結方法より低い傾向にあったことから、融解時の脱ガラス化による氷晶形成があった可能性が考えられた。

V 引用文献

- 1)野中克治・宮里賢治・渡久地政康, 1991, 牛の受精卵移植(5)牛凍結胚のダイレクト法による移植, 沖縄畜試研報, 29, 1-5
- 2)斉藤則夫, 1997, 牛体外受精由来胚盤胞のガラス化保存, 農林水産省家畜改良センター, 4, 43-47
- 3)青柳和重・伊藤博康・齋藤真希・叶内恒雄・小林正人, 1999&2000, (2)性判別を目的としたバイオプシー胚の修正VSDによるガラス化保存, 山形県農業研究研修センター畜産研究部研究報告, 46・47, 12-13
- 4)野田準一・佐野文彦・三宅見次, 2000, 牛胚のガラス化保存液の検討, 静岡県畜産試験場試験研究報告, 26, 54-57
- 5)西宮弘・沼田恵・相澤健一・小林正樹・千田惣浩・小西潤一, 2001, 牛胚のガラス化低温保存法の検討(第2報), 秋田県畜産試験場研究報告, 16, 57-60
- 6)葛西孫三郎, 2001, 哺乳動物における卵子及び胚のガラス化保存, 日本胚移植学雑誌, 23, 12-17
- 7)富永敬一郎・浜田由佳子, 2001, ウシ体外受精由来初期胚の緩慢凍結およびガラス化保存, 日本胚移植学雑誌, 23, 19-26
- 8)浜野晴三・濱脇淳, 2001, 牛胚の保存と利用, 日本胚移植学雑誌, 23, 27-31
- 9)小淵裕子・川島敬二・須藤慶子・砂川政広, 2001, フィールド活用した牛ガラス化胚の移植成績, 日本胚移植学雑誌, 23, 32-35
- 10)小林正樹・西宮弘・千田惣浩・沼田恵・小西潤一, 1999, PCR法を用いた牛胚の雌雄産み分け技術, 秋田県畜産試験場研究報告, 16, 44-45

研究補助：宮城宏明，玉本博之