

凍結ストロー作製における 3.5 cm プラスチックシャーレの利用の有効性

○西井 里衣・小川 寅勝・宜保 敬也・近藤 伸一・佐々木 涼・白石 一馬
塚田このみ・平野 政子・小山 久一・高橋 茂・堂地 修
(酪農学園大学)

緒言

哺乳動物胚の凍結保存に関する研究は1970年代に飛躍的に進歩し、今日までに実験動物、家畜のみならずヒト胚でも成功例が多数報告されている^{1,3)}。

平成20年度農林水産省生産局の調査⁴⁾では、新鮮胚移植の受胎率が51%、凍結胚移植が46%で、過去10年以上横ばい状態が続いており、受胎率向上は胚移植の普及において大きな課題であり、特に凍結胚の受胎率向上はわが国において重要である。

ウシ胚の凍結技術は、胚移植技術を生産現場に広く普及・定着させるため移植現場でより簡単に移植できるように簡易化に重点を置いて開発が行われてきた⁵⁻¹⁰⁾。近年では凍結融解後、耐凍剤を希釈除去することなく胚を移植できる直接移植法が多く用いられるようになった⁷⁻¹⁰⁾。ウシ胚を凍結保存する場合、その手法によってストロー内の凍結培養の液層構成は異なり、胚が収納される液層の長さも異なる。富樫ら¹¹⁾は、液層の長さが凍結融解後の凍結媒液の浸透圧に影響を及ぼしていることを報告した。すなわち、胚を収納する液層の長さが2、3、5および7 cmの場合、7 cmの液層の浸透圧は2、3および5 cmに比べ、有意に高いと報告した。また、中原ら¹²⁾は凍結融解時に綿栓部に卵子が付着すると高い割合で透明帯への損傷が認められることを報告している。したがって、ウシ胚を凍結保存する場合、ストロー内の液層および空気層の長さが均一なストローを作製する必要がある。

本研究では、液層の長さが均一なストローを作製する1つの手法として、凍結媒液をストロー吸引する際に35 mm プラスチックシャーレの直径および高さを液層の長さの目安として用いることで熟練者、初心者に関係なくストロー内の液層の長さを均等に作製できるかどうかを検討した。

材料および方法

1. ストローの作製

ストローは、0.25 ml プラスチックストロー(富士平工業株式会社)を使用した。35 mm プラスチックシャーレ(Greiner, 627161)の直径および高さを目安として作製する方法(以下、シャーレ法)と見本のストローを見ながらストローを作製する方法(以下、目視法)で作製した。ストローの作製はまず、3.5 cm 溶液を吸引し、次に空気層5 mm、溶液3.5 cm、空気層5 mm、溶液1 cm、空気層5 mmを吸引し、最後に綿線まで溶液を吸引し、パウダーで封をした(図1)。シャーレ法では、最初にシャーレの直径の長さの溶液を吸引し、次に空気層5 mm、シャーレの直径、空気層5 mm、シャーレの高さ、空気層5 mm、最後に綿栓まで溶液を吸引し、パウダーで封をした(図2)。

また目視法は、見本のストローを用意し術者はこれをみながらストローを作製した。実験はウシ胚の凍結処理操作の熟練者6名、初心者11名で行い、各5本ずつ作製し合計85本で行った。

2. 統計処理

各ストローの測定結果は分散分析(一元配置)により統計分析を行った。

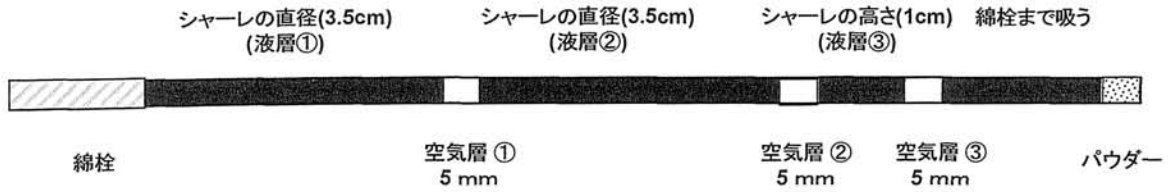


図1. ストロウの構成

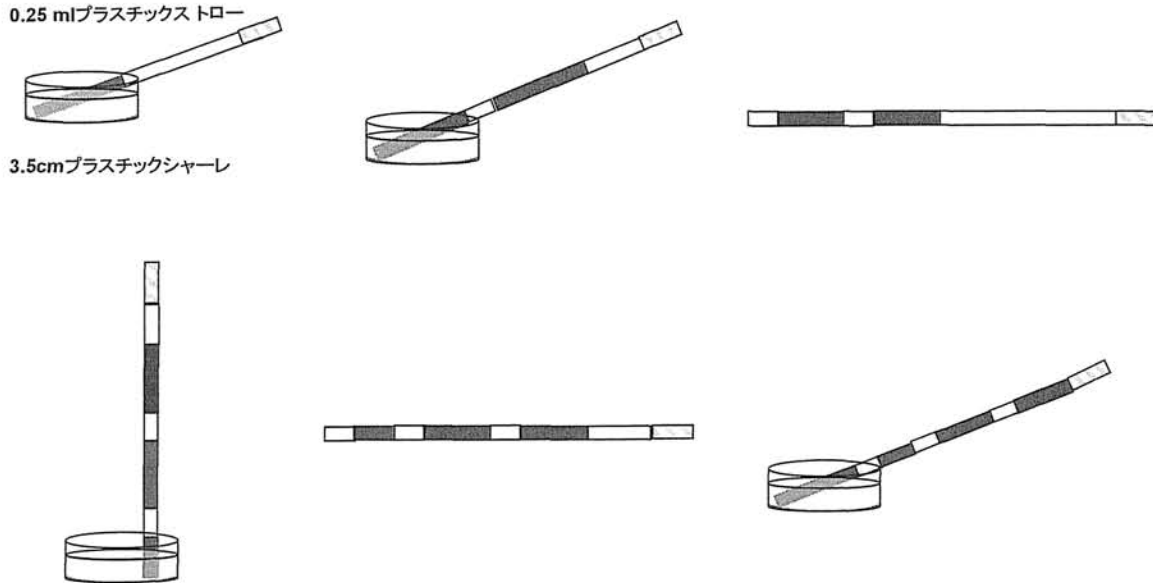


図2. 35 mm プラスチックシャーレ使用時の作製法

結果

初心者および熟練者における各液層の平均値を表1に、液層①および液層②の平均値を表2に示した。熟練者におけるシャーレ法と目視法の間には、各液層の長さに大きな差はみられなかった。初心者におけるシャーレ法と目視法の間には、各液層の長さに差がみられた。特に液層①においては有意な差が認められた ($p < 0.05$)。液層①および②の平均値は、シャーレ法と目視法ともに、初心者は熟練者よりばらつきが大きく、目視法では初心者は熟練者より有意に短かった ($p < 0.01$)。空気層は熟練者、初心者ともに 0.46 ± 0.1 cm だった。

表1：熟練者および初心者の各液層および空気層の平均値

ストロー作製法		液層①	液層②	液層③	空気層
熟練者	シャーレ法	$3.5 \pm 0.1^*$	3.4 ± 0.1	1.2 ± 0.3	0.46 ± 0.1
	目視法	3.5 ± 0.3	3.4 ± 0.2	1.4 ± 0.3	0.46 ± 0.1
初心者	シャーレ法	3.7 ± 0.1^a	3.5 ± 0.1	1.2 ± 0.2	0.46 ± 0.1
	目視法	3.4 ± 0.3^b	3.2 ± 0.3	1.3 ± 0.2	0.46 ± 0.1

*：平均値 ± 標準偏差

^a^b：異符号間に有意差あり ($P < 0.05$)

表2：熟練者および初心者の液層①と②の平均値

	シャーレ法	目視法
熟練者	$3.5 \pm 0.2^*$	$3.5 \pm 0.3^{a*}$
初心者	3.6 ± 0.2	3.3 ± 0.4^b

*：平均値 ± 標準偏差

^a^b：異符号間に有意差あり ($P < 0.01$)

考 察

本試験の結果には、熟練者におけるシャーレ法と目視法を比較した場合、液層および空気層の長さともに差がなかった。初心者におけるシャーレ法および目視法を比較した場合、液層①および②の長さはシャーレ法の方が長く、液層①ではシャーレ法が有意に長かった。熟練者と初心者の各液層および空気層の長さには有意な差はみられなかった。熟練者、初心者ともシャーレ法の方が目視法に比べばらつきが小さく、シャーレ法の有効性が認められた。初心者ではばらつきが大きかった理由はシリンジコントロールの熟練の差であると考えられた。しかし、初心者でも比較的、見本に近いストローが作製できたことから、凍結用ストローを作製する場合、ストローの見本を準備することは有効であり、より正確にかつストロー間、術者間の差を小さくするためには、シャーレの利用が有効であると考えられた。

本研究に使用した 35 mm シャーレは一般にウシ胚の凍結処理時に使用するシャーレであるため、本法によるストロー作製法は特別な器具を用意する必要もないことから、実用的であると考えられる。特に初心者が凍結処理する場合は液層の均一なストロー作製が容易であると考えられる。このことから、35 mm プラスチックシャーレの直径および高さを使用する方法は、熟練者、初心者にかかわらず均一なストローを作製する上で有効な手法であると考えられた。

要 約

本試験では液層の長さが均一なストローを作製する手法として、凍結媒液をストロー吸引する際に 35 mm プラスチックシャーレの直径および高さを液層の長さの目安として用いる方法（シャーレ法）、予めストローの見本を作製し、これを見ながら液層を作製する方法（目視法）の 2 法を用い熟練者、初心者に関係なくストロー内の液層の長さを均等に作製できるかどうかを検討した。ストローの見本を見ながらストローを作製することは有効であり、より正確にかつストロー間、術者間の差を小さくするためには、シャーレの利用が有効であると考えられた。また、35 mm プラスチックシャーレの直径および高さを使用する方法は、熟練者、初心者にかかわらず均一なストローを作製する上で有効な手法であると考えられた。

参考文献

1. Niemann H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. *Theriogenology* 1991; 35: 109-124.
2. Fahning MI, Garcia MA. Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. *Cryobiology* 1992; 29: 1-18.
3. Palasz AT, Mapletoft RJ. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnol Adv* 1996; 14: 127-149.
4. 農林水産省生産局. 統計資料. 受精卵移植の状態別受胎率の推移, <http://www.maff.go.jp/>.
5. Niemann H, Sacher B, Schilling E, Smidt D. Improvement of survival rates of bovine blastocytes with sucrose for glycerol dilution after a fast freezing and thawing method. *Theriogenology* 1982; 17: 102 (Abstract).
6. Leibo SP. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 1984; 21: 767-790.
7. Massip A, Van der Zwalmen P. Direct transfer of frozen cow embryos in glycerol-sucrose. *Vet Rec* 1984; 115: 327-328.
8. Suzuki T, Yamamoto M, Ooe M, Sakata K, Matsuoka K, Nishikata Y, Okamoto K. Effect of sucrose concentration used for one-step dilution upon in vitro and in vivo survival of bovine embryos refrigerated in glycerol and 1,2-propandiol. *Theriogenology* 1990; 34: 1051-1057.
9. Voelkel SA, Hu YX. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 1992; 37: 23-39
10. Dochi O, Imai K, Takakura H. Birth of calves after direct transfer of thawed bovine embryos stored in

ethylene glycol. Anim Reprod Sci. 1995; 38: 179-185.

11. 富樫 伶, 牧野彩音, 黒澤恵梨, 西井里衣, 宮田佳苗, 山口誠司, 小山久一, 堂地 修. 2010. ストロー内液層の長さが凍結融解後の媒液の浸透圧に及ぼす影響 (予報). 北海道牛受精卵移植研究会会報. 24-27.
12. 中原高士, 谷乃木精悟, 坊菌正恒, 岩崎英昭. 1989. 凍結ストロー内封入位置と透明体損傷との関係. 宮崎県畜産試験場研究報告書. 第三号. 10-13