

凍結媒液層内のウシ胚の位置が融解後の生存率に与える影響

○佐々木 涼・宜保 敬也・近藤 伸一・白石 一馬・武久 正也・塚田このみ
平野 政子・庄司 圭佑・小山 久一・堂地 修
(酪農学園大学)

農水省生産局調べ¹⁾による平成20年度のウシ胚の移植頭数は、約87,000頭である。そのうち、約67%は凍結胚が移植されている。今日のわが国のウシ胚移植において、胚の凍結保存技術は必要不可欠なものとなっている。凍結保存胚の受胎率は、体内受精由来胚が42%、体外受精由来胚が38%で、過去十数年間横ばいで推移している。そのため、わが国のウシ胚移植技術の生産現場への一層の普及を図るためには、凍結保存胚の受胎率向上は重要課題の一つである。

ウシ胚の凍結保存に関する研究は、1970年代初期²⁾に始まり、1980年代に入るとストロー内で凍結保護物質を希釈除去できるワンステップ・ストロー法³⁻⁵⁾が開発され簡易化が進んだ。さらに、1980年代中ごろから1990年代に入ると凍結精液と同様に、融解後、凍結保護物質を希釈除去せず凍結融解胚を直接移植できる方法(ダイレクト法)が開発された。今日では、凍結胚のほとんどがダイレクト法⁶⁻⁹⁾により移植されている。

凍結胚の融解後の生存率に与える要因については、これまで多くの研究がなされてきている。胚の発育ステージ、凍結保護物質の種類や濃度、冷却速度、液体窒素への投入温度などの影響は、すでに明らかにされ、ウシ胚の凍結保存技術はほぼ確立していると言える。しかし、まだ詳細に検討されていない凍結条件も残されている。

富樫ら¹⁰⁾は、0.25 ml ストローを用いて胚を凍結する際に、胚を収容する凍結媒液層の長さが凍結融解後の凍結媒液の浸透圧に与える影響について検討している。彼らは、1.5 M エチレングリコール (EG)、1.5 M EG + 0.1 M ショ糖 (Suc)、1.4 M グリセロール (Gly) および 1.4 M Gly + 0.1 M Suc の4種類の凍結媒液を用い、液層の長さを2、3、5および7 cm の4種類として浸透圧を測定している。その結果、全ての凍結媒液において液層の長さが7 cm の場合の浸透圧が有意に高かったことを報告している。そこで、本研究では凍結媒液として1.5 M EG + 0.1 M Suc を用いて、胚を収容する凍結媒液層の長さが、融解後の生存率に与える影響について検討した。

材料および方法

1. 体外受精由来胚の作出

1) 卵子の採取

体外受精由来胚は、食肉処理場で採取した卵巣より採取した卵子を用いて作出した。卵巣は実験室に持ち帰り36.0℃に保温した滅菌生理食塩水で数回洗浄したのち、滅菌した紙タオルで十分に水分を除去した。未成熟卵子は、18Gの注射針を装着した5 mL シリンジに3%子牛血清 (CS; Gibco, 8155322) を添加した修正ダルベッコリン酸緩衝液 (D-PBS; Gibco, 21300-025) を約1 ml 吸引して、直径2~6 mm の卵胞から未成熟卵子を吸引採取した。採取した卵子は、卵丘細胞が2層以上付着し細胞質が均一なものおよび卵丘細胞が1~2層付着し細胞質が均一なもの、または細胞質の一部に変性部位があるものを用いた。

2) 体外成熟培養

採取した未成熟卵子は3% CS を添加したD-PBSで3回洗浄したのち、FSH (アントリン R・10、川崎三鷹) 0.02 AU/mL および5% CS を添加したヘブス緩衝 TCM-199 (Gibco, 12340-030) で2回洗浄した。洗浄した未成熟卵子は、60 mm プラスチックシャーレ (Falcon, 1007) に100 μ L の成熟培養液のドロップを作製し、流動パラフィン (26114-75、ナカライテスク) で覆ったものに20個ずつ入れて、38.5℃、5% CO₂ の気相条件下で

20 時間行った。

3) 体外受精

体外受精には、1 頭のホルスタイン種雄牛の凍結精液を用いた。凍結精液は 37℃ の温湯に 30 秒間浸漬して融解した。融解した精液は Takahashi ら¹¹⁾ の方法に準じて、パーコール密度勾配法により洗浄した。パーコール溶液 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, 17-0891-01) および 10 倍濃度の BO 液を用い、90% パーコール溶液を調整した。さらに、45% パーコール溶液は 10 倍濃度の BO 液と 90% のパーコール溶液を同量加えて調整した。精液は、15 mL のプラスチック遠沈管 (Corning) に 45% パーコール溶液を入れたのち 90% パーコール溶液を底に入れ、45% パーコール溶液の上に 470 μ L を重層した。重層した精液は、2000 rpm で 20 分間遠心分離を行い、上清をアスピレーターで吸引・除去した。

精子の受精能獲得誘起法には、Brackett and Oliphant¹²⁾ の方法を一部修正して用いた。すなわち、パーコールで選抜した精子に 10 mM ヒポタウリン (Sigma, H-1384) および 4 U/mL ノボヘパリン (持田製薬, A138) を添加した精子洗浄液を 6 mL 加え、1800 rpm で 5 分間遠心分離を行い、上清をアスピレーターで吸引、除去した。

洗浄した精液は、ヒポタウリンおよびノボヘパリン添加 BO 液で 10×10^6 mL の濃度に調節したのち、さらに等量の 20 mg/mL ウシ血清アルブミン (BSA; Sigma, A-4378) 添加 BO 液を加えて最終濃度を 5×10^6 /mL に調整し、精子浮遊液とした。

精子浮遊液で 60 mm プラスチックシャーレに 100 μ L のドロップを作製し、流動パラフィンで覆ったものを体外受精培地とした。成熟卵子は BSA 10 mg/mL を添加した BO 液で 3 回洗浄したのち、1 ドロップあたり 20 個ずつ入れ、成熟培地と同様の気相条件下で 18 時間媒精を行った。

媒精の終了した卵子は、3% CS を添加した D-PBS を 2 mL 入れたガラス遠沈管に移し、ボルテックスミキサーで 2 分 30 秒間攪拌し、卵丘細胞を完全に除去したのち、同液で 2 回洗浄後、発生培養液で 3 回洗浄した。発生培養液で 60 mm プラスチックシャーレに 100 μ L のドロップを作製し、流動パラフィンで覆ったものを用いた。発生培養は、1 ドロップあたり 20 個の卵子を入れ、38.5℃、5% CO₂、5% O₂、90% N₂ の気相条件下で行った。実験には、媒精日を 0 日として 7 日目、8 日目のグレード 1 および 2 の胚盤胞を用いた。

2. 胚の凍結融解

1) 凍結媒液

凍結媒液は、20% CS を添加した修正ダルベッコリン酸緩衝液を基本液として調製した。1.5 M エチレングリコール (EG; 和光純薬) + 0.1 M ショ糖 (Suc; 和光純薬) を凍結媒液として用いた¹⁰⁾。

ストローは、0.25 mL プラスチックストロー (IMV) を用いて、図 1 に示すように胚を収納する液層部分の長さが 7 cm のストローを作製した。すなわち、まず凍結媒液を 1.5 cm 吸引し、次いで 0.5 cm の空気層を作り、さらに胚とともに凍結媒液を吸引して 7 cm の液層を作り、0.5 cm の空気層を作り最後に綿栓まで凍結媒液を吸引し、パウダーで封をした。

凍結媒液層内の胚の位置は上端、中間、下端に区分した。すなわち、上端は凍結媒液を 0.5 cm 吸引した後に胚を吸引し、中間は凍結媒液を 3.5 cm 吸引した後に胚を吸引し、下端は凍結媒液を 6.5 cm 吸引した後に胚を吸引した。さらに、ストローを垂直に立てて、胚が上端、中間、下端に位置するように調整した。

ストローは -7℃ に設定したプログラムフリーザー (フジヤ矢野科学, ET-UM) のエタノール槽に水平に浸漬し、2 分後に予め液体窒素で冷却したピンセットでストローを水平にした状態のまま綿栓側の液層 (図 1 の液層①) に強制植氷し、同温度で 13 分間保持した。次いで -7℃ から -30℃ まで毎分 0.3℃ で冷却したのち、液体窒素に投入して凍結した。

融解は、凍結したストローを液体窒素内から取り出し空气中に 7 秒間保持し、30℃ の温湯に 20 秒間浸漬して行った。融解胚は、0.1 M β -メルカプトエタノールとウシ胎子血清を 20% 添加した TCM-199 を用いて体外培養し

て生存率を調べた。生存胚は、24 および 48 時間目で拡張胚盤胞以上のもの、72 時間目で脱出胚盤胞以上のものとした。

3. 統計処理

凍結融解胚の生存率は χ^2 検定を用いて比較した。

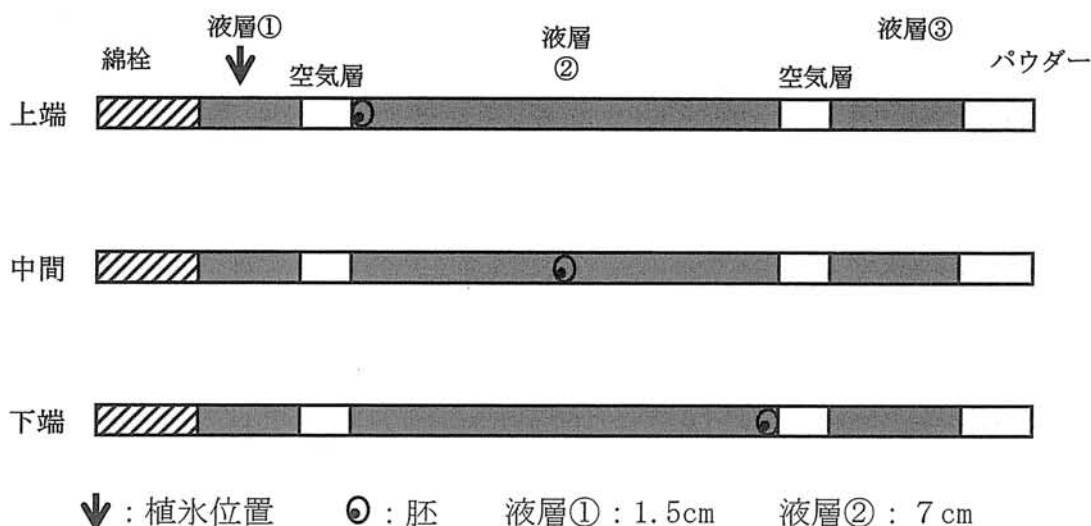


図 1. ストロー内の構成および胚の位置

結果

融解後 0 時間の生存率は、下端が他の 2 区に比べて低かったが有意差はなかった。培養後 24、48 および 72 時間の生存率は、下端が上端および中間に比べ有意に低かった ($p < 0.05$)。また、上端と中間の生存率に差はなかった。

表 1. 液層の長さ 7 cm 中で胚の収容する位置が凍結融解後の生存率に及ぼす影響

収容部位	供試胚数	0 時間 (%)	24 時間 (%)	48 時間 (%)	72 時間 (%)
上端	30	29 (96.7)	29 (96.7) ^a	28 (93.3) ^a	26 (86.7) ^a
中間	30	29 (96.7)	28 (93.3) ^a	28 (93.3) ^a	28 (93.3) ^a
下端	32	26 (81.3)	20 (62.5) ^b	19 (59.4) ^b	19 (59.4) ^b

a, b: 異符号間に有意な差あり ($p < 0.05$)

考察

本研究では、ウシ胚を凍結する際にストロー内の凍結媒液層中の胚の位置が凍結融解後の生存率に与える影響について検討した。本研究では、胚を収納する凍結媒液層の長さを 7 cm として実験を行った結果、胚の位置が凍結融解後の生存率に与える可能性が示された。すなわち、強制植氷位置から最も近い位置を上端、最も遠い位置を下端、その間を中間として区分して胚を収納して凍結融解後の生存率を比較した結果、凍結融解後の体外培養後の下端の生存率は、上端および中間に比べて有意に低かった。

富樫ら¹⁰⁾ は、ストロー内の凍結媒液層の長さが、凍結融解後の凍結媒液の浸透圧に与える影響について検討している。彼らは、凍結媒液層の長さを 2、3、5、および 7 cm とし、強制植氷位置より最も遠い部分 (最遠端部) の浸透圧を調べた結果、7 cm の場合が他より有意に高かったと報告している。この結果は、胚を収納する凍結媒液層の長さが 7 cm の場合は、氷晶の形成にともない凍結媒液が濃縮され浸透圧が高くなることを示している。このことは、凍結媒液層の胚が強制植氷位置より最遠端部に位置する場合は、凍結融解後の生存率が低下する可

能性を示している。本研究では、その可能性の高いことを裏付ける結果が得られた。本研究の下端部の凍結融解後の生存率が低かった理由として、氷晶の形成にともない凍結媒液が次第に濃縮され、胚が高い濃度の凍結媒液に曝されたため、化学的毒性を受けた可能性が考えられる。

牧野¹³⁾は、本研究と同様の実験を行い、胚を収納する凍結媒液層の長さを3.5および5 cmとした場合、胚の位置（上端、中間、下端）の違いによる生存率の差はなかったと報告している。本研究と牧野¹³⁾の結果から、胚を収納する凍結媒液層の長さが5 cmより長く、胚が下端に位置する場合は、凍結融解後の生存率が低下する危険性の高いことを示している。

ウシ胚の凍結に用いられているプログラムフリーザーは、ストローを水平か垂直にセットするようになっている。ストローを垂直にする場合、胚は凍結媒液層の最下層に落下する可能性が高く、胚を収納する凍結媒液層が長くなればなるほど、胚が位置する周辺の凍結媒液の浸透圧および濃度は高くなり、胚の生存性に悪影響を与える危険性がある。一方、ストローを水平にセットするプログラムフリーザーでもストローを垂直に立てた状態で強制植氷を行う場合が多く、強制植氷の実施中に胚が凍結媒液層の下端まで落下する可能性がある。もし、胚が下端に落下した状態で強制植氷を実施すれば凍結融解後の生存性が低下する危険性が生じると考えられる。しかし、牧野¹³⁾は本研究と同じ凍結媒液を用いて、0.25 mLのストローに凍結媒液と体外受精由来胚盤胞を吸引して、胚盤胞の落下速度を調べた結果、80～352秒/0.5 cmで、平均186.8秒/0.5 cmであったと報告している。このことから、10～20本程度のストローの強制植氷に要する時間を2～3分程度と見積もっても、胚の落下距離は1.1 cm程度になる。そのため、強制植氷中にストローを垂直に立てても凍結融解後の胚の生存性に悪影響を与える危険性は極めて小さいと考えられる。

以上のことより、ウシ胚を0.25 mLのストローを用いて凍結する場合、胚を収納する凍結媒液層を7 cmの長さにして、胚が強制植氷位置より最も遠い部分にある場合は、凍結融解後の生存率が低下することが示された。そのため、本研究のように胚を収納する凍結媒液層の長さを7 cmと長くした場合は、胚を凍結媒液層の上端または中間に位置させるべきであると考えられる。また、ウシ胚を凍結する場合は、西井ら¹⁴⁾が報告したように、胚を収納する凍結媒液層の長さを直径3.5 cmのシャーレを利用して凍結用ストローを作製すれば、簡易で生存性に悪影響を与えない凍結処理が可能であると考えられる。

参考文献

- 1) 農林水産省生産局畜産部 (http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l_katiku/index.html)
- 2) Wilmut, I. and Rowson, LEA. 1973. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet. Rec.* 92: 686-690.
- 3) Leibo, S.P. 1984. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 21: 767-790.
- 4) 鈴木達行, 下平乙夫, 酒井 豊, 松田修一, 三浦秀夫, 伊藤一伸. 1986. 改良したウシ凍結受精卵の1段階ストロー法による野外での非手術的移植. *家畜繁殖誌* 32: 118-123.
- 5) 高倉宏輔, 高橋博人, 堂地 修, 有山賢一, 今井 敬. 1987. ストロー内でグリセロール除去した牛凍結胚の移植成績について. *北海道牛受精卵移植研究会報* 6: 42-44.
- 6) Massip, A. and Van Der Zwalm, P. 1984. Direct transfer of frozen cow embryos in glycerol-sucrose. *Vet. Rec.* 115: 327-328.
- 7) 堂地 修, 今井 敬, 高倉宏輔. 1991. Ethylene glycolを用いて凍結したウシ胚のDirect transfer法による移植. 第84回日本畜産学会大会講演要旨. 65.
- 8) Voelkel, S. A. and Hu, Y.X. 1992. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 37: 23-37.
- 9) Dochi, O., Imai, K. and Takakura, H. 1995. Birth of calves after direct transfer of thawed bovine embryos stored frozen in ethylene glycol. *Anim. Reprod. Sci.* 38: 179-185.
- 10) 富樫 伶, 牧野綾音, 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報 29 : 24-27.

- 11) Takahasi, Y., Hishinuma, M., Matsui, M., Tanaka, H., Kanagawa, H. 1996. Development of in vitro matured/fertilized bovine embryos in a chemically defined medium: influence of oxygen concentration in the gas atmosphere. *J. Vet. Med. Sci.*, 58: 897-902.
- 12) Brackett, B.G. and Oliphant, G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.*, 12: 260-274.
- 13) 牧野綾音. 2012. ストロー内の凍結媒液の長さがウシ体外受精由来胚の生存性に与える影響. 酪農学園大学酪農学部酪農学科 2011 年度卒業論文.
- 14) 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. 2011. 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. 北海道牛受精卵移植研究会報 30 : 11-14.