

ナイロン糸を用いてガラス化したウシ体外受精胚の生存性

笠 正二郎*・森 美幸・上田修二

ナイロン糸で試作したガラス化用具を用いて、拡張胚盤胞期のウシ体外受精胚を材料として超急速ガラス化し、保存後の生存性および発育性を緩慢冷却法と比較検討した。その結果、超急速ガラス化で保存した胚は、緩慢冷却で保存した場合より有意に生存率、透明帯脱出率が高かった。さらに、超急速ガラス化法で用いたガラス化液間の比較では、GESX (20%グリセロール, 20%エチレングリコール, 0.3Mシュクロース, 0.3Mキシロースおよび3%ポリエチレングリコールを添加したリン酸緩衝液のガラス化液)が、糖類を含まないガラス化液ED (20%エチレングリコール, 20%ジメチルスルホキシドおよび20%仔ウシ血清を添加したTCM199)より、生存性および発育性が良好であった。これらのことから、ナイロン糸を加工したガラス化用具は、ウシ体外受精胚にとって有効であることが示唆された。

[キーワード: ウシ, 胚, ガラス化, 生存率, ナイロン糸]

Survivability of Vitrified Bovine Embryos Produced in Vitro Using Nylon Thread. KASA Shojiro, Miyuki MORI and Shuji UEDA (Fukuoka Agricultural Research Center, Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan) *Bull. Fukuoka. Agric. Res. Cent.* 24:68-72 (2005)

An experimental bovine embryo vitrification tool was made using nylon thread. Bovine expanded blastocysts produced in vitro were vitrified by a rapid cooling method using the tool. A comparative examination on survivability and growth after preservation was carried out with a slow cooling method. Rapid cooling resulted in significantly higher rates of survival and hatched zona pellucida compared to the slow cooling method. Moreover, the survivability and rate of growth of embryos with the vitrification solution GESX (20% glycerol, 20% ethylene glycol, 0.3M sucrose, 0.3M xylose, 3% polyethylene glycol in D-PBS) was better than the vitrification solution ED (20% ethylene glycol, 20% dimethylsulphoxide, 20% calf serum in TCM-199) which did not contain sugar. The results indicated that bovine embryos produced in vitro and given the rapid cooling treatment with the tool were able to maintain survivability at a higher rate compared with the slow cooling method. Moreover, the tool, which was made of nylon thread also served as an effective container for vitrified bovine embryos.

[Key word: bovine, embryo, vitrification, survivability, nylon thread]

緒 言

ウシ胚移植技術を利用して、高能力乳牛および高品質肉用牛生産が行われている。特に、酪農業では胚移植技術を活用し、後継牛である高能力乳牛を生産するかたわら、黒毛和種牛の胚を乳牛に移植して、黒毛和種産子を生産販売し、収益向上を図る農家が増加しつつある。

胚移植の多くは、受胎牛の自然発情周期に合わせるため、生産した胚を液体窒素のなかで保存する必要がある。ウシ胚の長期保存方法には、プログラムフリーザを使い、徐々に冷却しながら胚細胞中の水分を脱水し、耐凍剤に置換して凍結する緩慢冷却凍結法があり、この方法でウシ胚を0.25ml容プラスチックストローに封入し凍結保存すると、移植現場で融解できる簡易なダイレクト移植⁴⁾が可能になるため、畜産現場で利用されている。

しかし、ウシ胚を緩慢冷却凍結法で凍結し、融解して移植すると、新鮮胚移植と比較して、受胎率が低下することをHasler⁶⁾が報告している。さらに、凍結によるダメージは、体内受精胚と比べて体外受精胚に強く表れ^{3, 12)}、緩慢冷却凍結法で凍結した体外受精胚は、移植後の受胎率も体内受精胚と比べて低くなる傾向にある^{8, 11)}。

一方、哺乳類の卵子や胚を高い生存性を維持した状態で長期間保存する方法として、細胞を急速に冷却するガ

ラス化法が近年、考案されている^{2, 9, 10, 13, 16, 17)}。既存のガラス化法でウシ胚をガラス化すると、生存性を高く維持できるうえ、高価なプログラムフリーザを必要としないという利点がある反面、高濃度の耐凍剤を含有するガラス化液が室温の状態では胚細胞に毒性が高く、ガラス化液への浸漬および加温後のガラス化液希釈を速やかに行う必要があるという欠点がある。このような理由から、現在のところ、ガラス化胚を移植して高い受胎率を得るには、実験室内で一旦、加温後ガラス化液希釈を行い、ストローに詰めて移植現場へ搬出する必要がある、このことがガラス化ウシ胚移植技術の普及障害となっている。このため、ガラス化したウシ胚を移植現場で加温してガラス化液を希釈でき、その状態で移植できる技術が望まれている。

そこで、まずガラス化したウシ胚のストロー内挿入およびガラス化胚のストロー内ガラス化液希釈を容易に行うために、ナイロン糸を利用した用具を考案した。つぎに、この用具を用いて、2種のガラス化液における胚の生存性および発育性を緩慢冷却凍結法と比較したところ、良好な結果が得られたので報告する。

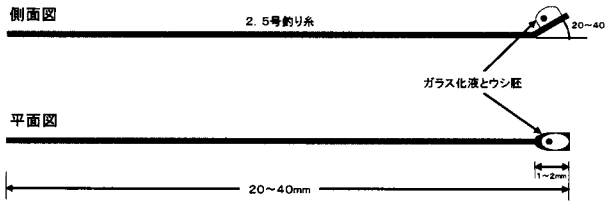
材料および方法

1. ガラス化用具

ウシ胚をガラス化する用具は、表面をテフロン加工した長さ20~40mmの2.5号(直径0.26mm)ナイロン繊維

*連絡責任者(家畜部)

製約り糸 (GOSEN GS-285C) を加工して試作した (第1図)。ナイロン糸の一端にガラス化液とともにウシ胚を滴下する部位として、1~2mm 長を平らに潰し、その部分に20~40度程度の角度を形成した。



第1図 ガラス化用具

2. 体外受精胚の生産

と畜された雌ウシの卵巣から6時間内に採取した形態的に良好な卵丘細胞卵子複合体を5% 仔ウシ血清 (以下、CSと略す: GIBCO 16010-159) を添加したTCM199 (GIBCO 12340-030) に導入し、20~22時間成熟培養した。

黒毛和種牛の凍結精液 (家畜改良事業団) を5mM テオフィリン (SIGMA T-1633) および5mM カフェイン (SIGMA C-4144) を添加したBrackett & Oliphant 液 (以下、BO液¹⁾と略す) で洗浄し、BSA (SIGMA A-4378) およびヘパリン (SIGMA H-3149) を添加したBO液で、精子濃度10⁷/ml に調製した。調製精子液に成熟卵子を導入し、4時間媒精した。

媒精後の卵子を10%CSを添加したグルコース不含修正TCM199で3または4日間培養後、10%CSを添加したTCM199に交換して、体外受精8日まで培養した。

胚生産の全ての培養は、5%CO₂、95%空気および38.5℃の気相条件下で実施した。

3. 供試胚

体外受精後7日または8日において、栄養膜細胞が単層で均一に発育したうえ、充実した内部細胞塊を有し、形態的に良質な拡張胚盤胞期胚を緩慢冷却凍結およびガラス化に供試した。

4. 緩慢冷却凍結およびガラス化

ウシ胚の緩慢冷却凍結およびガラス化処理方法の内容を第1表に示した。

緩慢冷却凍結では、胚を10%エチレングリコール (WAKO 058-00986)、0.1Mシュクロース (SIGMA S-1888) および20%CSを添加したダルベッコリン酸緩衝液 (D-PBS: GIBCO 14287-080) の凍結液 (以下、10ESと略す) に導入し15分間平衡後、0.25ml容プラスチックストロー (富士平工業 01128560) に吸引して封入した (第2図)。プログラムフリーザ (富士平工業 ET-1N) を用い、-7℃のメタノール (WAKO 136-01837) 冷媒中にストローをセットし、2分間経過後強制植水した。植水10分間経過後から0.3℃/分で-30℃まで緩慢冷却し、その後液体窒素内で保存した。

ガラス化は、試作したガラス化用具を用いて、胚を用具とともに急速に液体窒素に浸漬してガラス化する方法の超急速ガラス化を行った。また、超急速ガラス化に用いるガラス化液は含有される糖の有無で、2種類を使用した。1つは、まず、10%エチレングリコール、10%ジメチルスルホキシド (WAKO 043-07216) および20%CSを添加したTCM199で胚を5分間前平衡し、つぎに、20%エチレングリコール、20%ジメチルスルホキシドおよび20%CSを添加したTCM199である糖を含まないガラス化液 (以下、EDと略す) に胚を浸漬した。もう1つは、胚を10%グリセロール (WAKO 597-04805)、0.1Mシュクロース、0.1Mキシロース (NACALAI TESQUE 36710-55) および1%ポリエチレングリコール (SIGMA P-2139) を添加したD-PBSならびに10%グリセロール、10%エチレングリコール、0.2Mシュクロース、0.2Mキシロースおよび2%ポリエチレングリコールを添加したD-PBSに順次5分間前平衡し、次に、20%グリセロール、20%エチレングリコール、0.3Mシュクロース、0.3Mキシロースおよび3%ポリエチレングリコールを添加したD-PBSであるガラス化液 (以下、GESXと略す) に胚を浸漬した。2種類ともガラス化液に浸漬した胚をバスツールピペットで吸い上げ、実体顕微鏡下でガラス化用

第1表 胚の緩慢冷却凍結およびガラス化処理

区分	処理	胚封入または滴下部位	添加物質		
			耐凍剤 ¹⁾	糖類 ²⁾	高分子剤 ³⁾
10ES	緩慢冷却凍結	0.25ml 容ストロー内	10% EG	0.1M Suc	20% CS
ED	超急速ガラス化	ナイロン糸端	20% EG+20% DMSO	—	20% CS
GESX	超急速ガラス化	ナイロン糸端	20% EG+20% Gly	0.3M Xyl+0.3M Suc	3% PEG

1) EG: エチレングリコール, DMSO: ジメチルスルホキシド, Gly: グリセロール

2) Suc: シュクロース, Xyl: キシロース

3) CS: 仔ウシ血清, PEG: ポリエチレングリコール

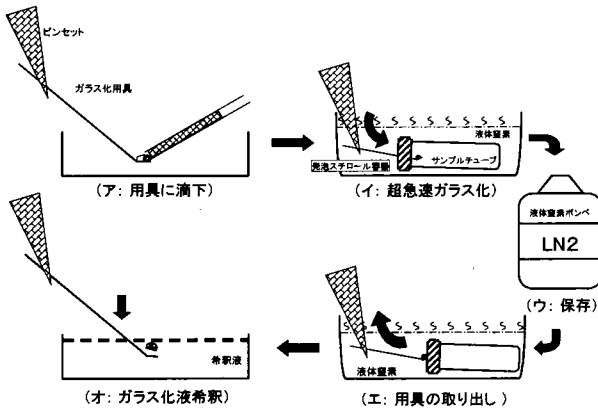


第2図 緩慢冷却凍結法のストロー封入

- 1) □: 凍結液 (10ES)
- 2) ▨: 封入用パウダー
- 3) ○: 胚
- 4) ↑: 植水部位

具に滴下した。この時、ガラス化用具に滴下するガラス化液量は、胚を保持できる最少容量とした(第3図のア)。

胚を2種類それぞれのガラス化液に浸漬して30秒後に用具を液体窒素に投入し超急速ガラス化した(第3図のイ)。保存は液体窒素中でサンプルチューブ(CORNING 430656)に導入後、封閉して液体窒素ボンベ内で行った(第3図のウ)。



第3図 胚の超急速ガラス化およびガラス化液希釈

5. 緩慢冷却凍結胚の融解、希釈および超急速ガラス化胚の加温、希釈

緩慢冷却法で凍結した胚の融解は、液体窒素からストローを取り出し、室温で6秒間保持した後、30℃の微温湯で20秒間浸して融解したストローを、次に室温で5分間保持した。その後、凍結液とともに胚を一旦シャーレ上に押し出し、胚を20%CSを添加したD-PBS(以下、保存液とする)で2回洗浄して、耐凍剤を希釈した後に保存液に導入した。

超急速ガラス化胚の加温およびガラス化液希釈は以下の方法で実施した。液体窒素ボンベからサンプルチューブを取り出し、液体窒素内から、ガラス化用具をピンセットで摘み出し(第3図のエ)、用具を室温下で0.5Mシュクロースおよび20%CSを添加したD-PBSへ投入した(第3図のオ)。この状態で5分間浸漬し、次に、胚を0.25Mシュクロースおよび20%CSを添加したD-PBSへ5分間浸漬してガラス化液を希釈後、37℃の保存液に導入した。

6. 融解または加温胚の培養

融解または加温して耐凍剤等を希釈した胚は、100 μM βメルカプトエタノール(SIGMA M-9768)および20%ウシ胎仔血清(ICN 2916854)を添加したTCM199(以下、培養液とする)で2回洗浄後、流動パラフィンで覆った1胚あたり20 μlの培養液ドロップで72時間培養した。培養の気相条件は5%CO₂、95%空気および38.5℃で行った。

7. 培養胚の生存性

培養開始から24時間、48時間および72時間における胚の生存、発育ステージおよび胚細胞の状態を観察した。生存率は供試胚数に対して、再び拡張した胚盤胞の割合、透明帯脱出率は透明帯脱出を完了した胚の割合で示した。また、培養72時間において内部細胞塊および栄養膜細胞が明瞭なうえ、発育を継続した透明帯脱出胚を良質透明

帯脱出胚としてその割合を調査した。

8. 統計処理

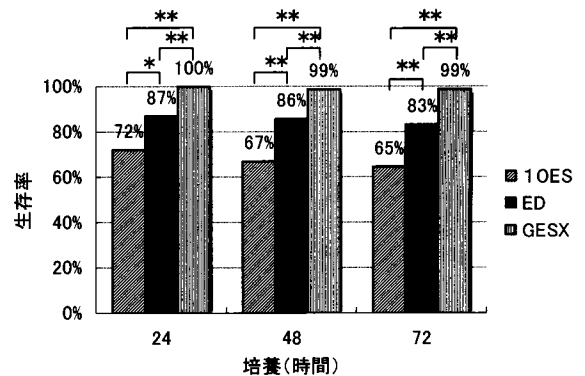
融解または加温した培養胚の生存胚率および透明帯脱出胚率等を同経過時間系列内でカイ2乗検定を行った。

結果

1. 緩慢冷却凍結胚およびガラス化胚の生存性

ガラス化用具に滴下したガラス化液量は2種類の処理液とも1胚あたり平均0.26 μlであった。

供試胚の生存率は、培養後24時間で10ES:72%, ED:87%およびGESX:100%, 48時間で67%, 86%および99%, 72時間で65%, 83%および99%であった。培養72時間で、ガラス化は80%以上の生存率を維持したが、緩慢冷却凍結は65%であり、ガラス化が有意に(p<0.05)高い生存率を示した。また、EDおよびGESXのガラス化液間では、加温24時間後以降、GESXがEDより有意に(p<0.01)高い生存率を示した(第4図)。

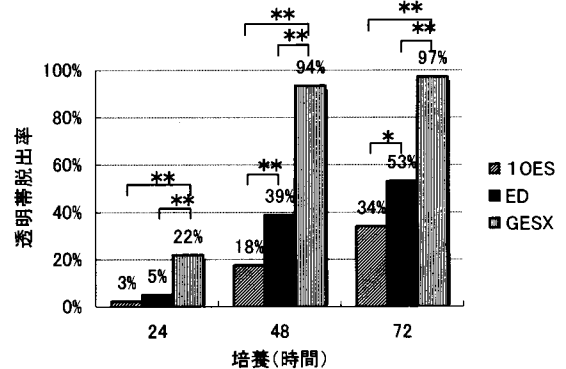


第4図 融解または加温後の生存率

- 1) 供試胚数 10ES:79, ED:77, GESX:77
- 2) *: p<0.05, **: p<0.01

2. 緩慢冷却凍結胚およびガラス化胚の透明帯脱出率ならびに発育

透明帯脱出率は、24時間で10ES:3%, ED:5%およびGESX:22%, 48時間で18%, 39%および94%, 72時間で34%, 53%および97%と全ての処理区で経時的な上昇が見られた(第5図、第6図)。48時間および72時間では、ガラス化が緩慢冷却凍結より透明帯脱出率が有意に(p<0.05)高く、また、ガラス化液間では全ての時間系



第5図 融解または加温後の透明帯脱出率

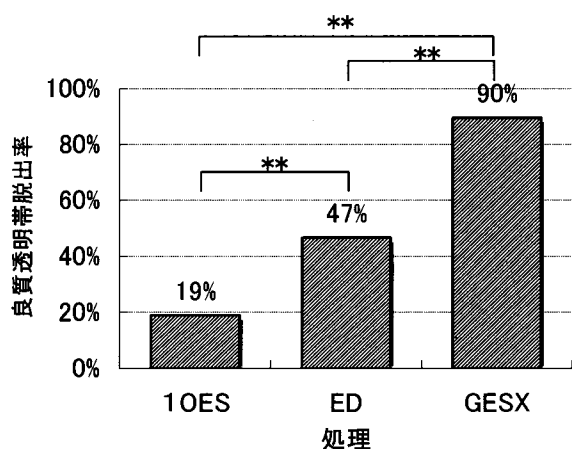
- 1) 供試胚数 10ES:79, ED:77, GESX:77
- 2) *: p<0.05, **: p<0.01

列でGESXがEDより有意に ($p < 0.01$) 高率に透明帯を脱出した。



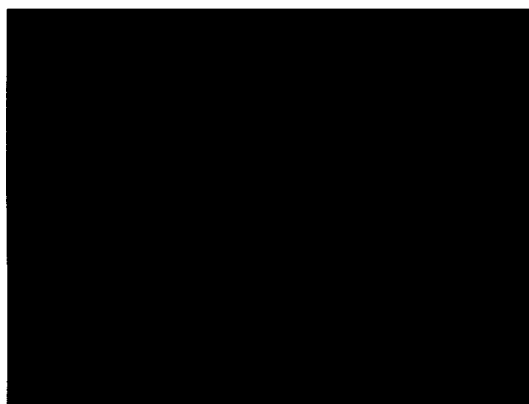
第6図 加温後24時間後の透明帯脱出中の胚盤胞 (GESX)

また、培養72時間後の透明帯脱出胚のうち、形態的に良好な発育が見られた良質脱出率は、ガラス化が緩慢冷却凍結 (10ES : 19%) より有意に ($p < 0.01$) 高く、ガラス化液間ではGESXがEDより有意に ($p < 0.01$) 高かった (第7図, 第8図)。



第7図 培養72時間後の良質透明帯脱出率

- 1) 供試胚数 10ES : 79, ED : 77, GESX : 77
- 2) ** : $p < 0.01$



第8図 加温72時間後の良質透明帯脱出胚 (GESX)

考 察

今回、ナイロン糸で試作したガラス化用具を用いてウシ体外受精胚のガラス化処理を行い、保存後の生存性および発育性を緩慢冷却凍結法と比較した。その結果、本試作用具でウシ体外受精胚をガラス化すると、緩慢冷却凍結法と比べ有意に高い生存性と発育性を示し、ウシ体外受精胚のガラス化用具として有効であることが判明した。これは、本用具を用いると既報^{7, 14, 17)}と同等に胚細胞内の水分を迅速かつ十分に脱水を可能にし、細胞内に氷晶が形成されることなく、胚細胞生存の危険温度域を急速に通過できるためと思われた。また、ガラス化液GESXでウシ体外受精胚をガラス化すると、EDでのガラス化と比べ、高い生存性 (72時間後の生存率99%) を示し、透明帯脱出率は加温後48時間で94%と有意に高く、72時間後の脱出胚の発育性も有意に良好 (透明帯脱出率97%, 良質透明帯脱出率90%) であった。この要因として、ガラス化液GESXに含まれる糖が生存性等に良好に作用したと思われる。SAITOら¹⁵⁾はガラス化液への細胞非透過型である糖を添加すると、胚細胞内への耐凍剤の急激な浸透を押さえるため、ウシ体外受精胚の生存性が改善すると報告している。このことから、糖を含まないEDよりも、シュクロースおよびキシロースを添加しているGESXがウシ体外受精胚のガラス化には有効であったと推測され、本試作用具を用いてのガラス化においても、同様の効果が見られたものと思われた。

哺乳動物細胞を長期間保存可能なガラス化法はRALLら¹⁴⁾により考案され、その後、多くの手法および用具が開発された。特に、Microdroplets法¹³⁾、OPS (Open Pulled Straw) 法¹⁷⁾、GL-Tips (Gel Loading-Tips) 法¹⁶⁾、Cryotop法⁹⁾およびCryoloop法¹⁰⁾等は急激な冷却が可能な超急速ガラス化法であり、その高い生存性が報告^{9, 16, 17)}されている。しかし、これらの超急速ガラス化法はその用具等の構造上、ウシ胚移植に汎用性が高い0.25ml容プラスチックストロー内での超急速ガラス化胚の加温およびガラス化液希釈が可能でない。そのため、超急速ガラス化したウシ胚移植の現場普及の妨げとなっている。

今回、著者らは試作したガラス化用具を用い、ウシ胚をガラス化し、その高い生存性を証明した。今後は本用具に改良を加え、ガラス化液GESXで超急速ガラス化したウシ胚を0.25ml容プラスチックストロー内で加温およびガラス化液希釈できる手法を確立し、緩慢冷却凍結法のダイレクト移植法と同様な簡易移植法を開発する予定である。

ウシ胚のガラス化用具として有効である本用具は、既成の釣り糸で簡易に製造可能であり、有色透明で光を透過するため、実体顕微鏡下で滴下したガラス化液中の胚の確認が容易である。また、胚以外の卵子、ウシ以外の動物等の細胞を保存処理する場合でも、それぞれ適正なガラス化液を用いることで利用できる。今後、本用具を用い、移植現場でのガラス化ウシ胚の加温が可能となると、受胎率向上および仔ウシ増産が期待される。

引用文献

- 1) Brackett B.G. and G.Oliphant (1975) Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.* **12** :260-274.
- 2) Dinnyes A., K. Kikuchi, A. Watanabe, Fuchimoto, M. Iwamoto, H. Kaneko, J. Noguchi, T. Somfai, A. Onishi and T. Nagai (2003) Successful cryopreservation of in vitro-produced pig embryos by the solid surface vitrification (SSV) method. *Theriogenology* **59** (1) :299 (abst.).
- 3) Dorinsky J. R. (2002) Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology* **57** (1) :285-302.
- 4) Dochi O., Y. Yamamoto, H. Saga, N. Kano, J. Maeda, K. Miyata, A. Yamauchi, K. Tominaga, Y. Oda, T. Nakashima and S. Inohae (1998) Direct transfer of bovine embryos frozen-thawed in the presence of propylene glycol or ethylene glycol under on-farm conditions in an integrated embryo transfer program. *Theriogenology* **49** (5) :1051-1058.
- 5) Fair T., P. Longergan, A. Dinnyes, D.C. Cottell, P. Hyttle, F. A. Ward and M. P. Boland (2001) Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation : effect of method of blastocyst production. *Mol. Reprod. Dev.* **58**(2): 186-195.
- 6) Hasler JF. (2001) Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rate in cattle. *Theriogenology* **56** (9) : 1041-1415.
- 7) Hochi S., T. Terao, M. Kamei, M. Kato, M. Hirabayashi and M. Hirao (2004) Successful vitrification of pronuclear-stage rabbit zygotes by minimum volume cooling procedure. *Theriogenology* **61** (2-3) : 267-275.
- 8) Kaidi S., A. Van La gendonckt, A. Massip, F. Dessy and I. Donnay (1999) Cellular alteration after dilution of cryoprotective solutions used for the vitrification of in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology* **52** (3) :515-525.
- 9) Kuwayama M. and O. Kato (2000) All-round vitrification method for human oocytes and embryos. *J. Assist. Reprod. Genet.* **17** : 477 (abst.).
- 10) Lane M., B. P. Bavister, E. A. Lyons and K. T. Forest (1999) Containerless vitrification oocytes and embryos. *Nat. Biotechnol.* **17** : 1234-1236.
- 11) Martinz A. G., D. G. de Motos, C. C. Furnus and G. M. Brogliatti (1998) In vitro evaluations and pregnancy rates after vitrification of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology* **50** (5) : 757-77.
- 12) Massip A., P. Mermillod and Dinnyes (1995) Morphology and biochemistry of in-vitro produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. *Hum. reprod.* **10** (11) : 3004-3011.
- 13) Papis K., M. Shimizu and Y. Izaike (2000) Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology* **54** (5) : 651-658.
- 14) Rall W. F. and G. M. Fahy (1985) Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196C by vitrification. *Nature* **313**: 573-575.
- 15) Saito N., K. Imai and M. Tomizawa (1994) Effect of sugars-addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced in vitro. *Theriogenology* **41** (5) : 1053-1060.
- 16) Tominaga K. and Y. Hamada (2001) Gel-loading tips as container for vitrification of in vitro-produced bovine embryos. *J. Reprod. Dev.* **47**: 267-273.
- 17) Vaijta G., P. Holm, M. Kuwayama, P. J. Booth, H. Jacobsen, T. Greve and H. Callesen (1998) Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.* **51** (1) : 53-58.