

ウシ体外成熟卵子のガラス化保存におけるガラス化液のシュクロース濃度およびフィルターを支持体とした保存手法

森 美幸*・笠 正二郎・上田修二

ウシ体外成熟卵子のガラス化保存について検討した。マイクロドロップレット法において、エチレングリコールとシュクロースを耐凍剤としたガラス化液のシュクロース濃度 (1 M vs 0.67M) を比較した。体外受精後 2 日目における胚分割率 (27.7% vs 38.0%) および 7 日目における胚発生率 (0.0% vs 4.0%) において、0.67Mの方が1 Mに比べて有意に高かった。メンブレンフィルターを用いたフィルター法と、マイクロドロップレット法の比較を行った。ガラス化液平衡処理の所要時間は、マイクロドロップレット法では卵子の個数が増えるに従い長くなったが、フィルター法では変わらなかった。また、保存卵子の体外受精後 2 日目における胚分割率および、7 日目に胚盤胞、8 日目に拡張胚盤胞へ発育した割合に有意差はなかったものの、フィルター法がマイクロドロップレット法より高くなる傾向が認められた。これらのことから、卵子のガラス化保存においては、ガラス化液の耐凍剤としてエチレングリコールと組み合わせるシュクロース濃度が保存卵子の生存性に影響を及ぼすことが明らかとなった。また、フィルター法を用いることにより、一度により多くの数の卵子を保存することが可能となった。

[キーワード：ウシ, 卵子, ガラス化, シュクロース, フィルター法]

The Effect of Sucrose in Vitrification Solution and the Use of a Membrane Filter in Vitrification. MORI Miyuki, Shojiro KASA and Shuji UEDA (Fukuoka Agricultural Research Center, Chikushino, Fukuoka818-8549, Japan) *Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent.* 24:73-77 (2005)

Experiments were conducted on the vitrification of in vitro matured bovine oocytes. The effect of the concentration of sucrose (1 M, 0.67M) in vitrification solutions consisting of a cryoprotectant (ethylene glycol and sucrose) was compared in micro-droplets. The results showed that the cleavage rates on day 2 were 27.7% and 38.0% respectively; and the rates of development to blastocysts on day 7 were 0.0% and 4.0% respectively. This attested to the fact that 0.67M in vitro fertilization was significantly higher than 1 M ($p < 0.05$). The filter method, which makes use of a membrane filter, was compared with micro-droplets. In the micro-droplets, it took a long time to complete an equilibration treatment in the vitrification solution as the number of oocytes increased, but the filter method was not affected. The cleavage rates on day 2 and rates of development to blastocysts on day 7 and expanded-blastocysts on day 8 did not differ significantly, but the filter method tended to have a higher rate than the micro-droplets. Thus, it was considered that the concentration of sucrose used with ethylene glycol as a cryoprotectant favorably influenced the survival of vitrified bovine oocytes. Also, more numbers of oocytes could be vitrified at one time using the filter method.

[Key words : bovine, oocyte, vitrification, sucrose, filter method]

緒 言

ウシでは、優良な形質を持つ子畜を増産するための胚移植技術の普及に伴い、胚を作出するための体外受精や核移植、経膈採卵技術がめざましく発展した。こうした胚生産を効率的に行うためには、体外成熟卵子の長期保存技術の確立が望まれている。

卵子の保存には、ガラス化保存法が検討されてきた。胚が数百個の細胞からなるのに対して、卵子は容積の大きな1個の細胞からなるため、凍害を防ぐためにガラス化液を細胞内へ浸透させ、かつガラス化液の持つ毒性の影響を最小限に抑えることが難しい。そのため、低温保存では不可逆的なダメージを受けやすく、体外受精後の胚発生の過程に大きく影響すると指摘されている^{3, 5)}。卵子を従来の胚と同様のガラス化法により、0.25ml容の胚

移植用ストローへ封入して保存した場合、保存後の胚発生率は非常に低い⁹⁾。このことから、卵子のガラス化では卵子の細胞への毒性ができるだけ低いガラス化液を用いること、冷却速度を速めて凍害の起こりやすい危険温度域を早く通過させてダメージを少なくすることが重要である^{5, 8)}。

ガラス化液は、細胞内の氷晶形成を防ぐ耐凍剤の他、毒性を低減させる目的で糖類あるいは高分子化合物が添加され、これらの組成の異なる多くの種類が存在する。Papisらはガラス化液の比較を行い、エチレングリコールとシュクロースを添加したガラス化液VS14が卵子に対する毒性が低く¹⁰⁾、保存後も高い胚発生率が得られたと報告¹¹⁾している。また、Otoiら⁹⁾は、エチレングリコールとシュクロースを組み合わせたガラス化液を用い、添加するエチレングリコールの濃度を詳細に検討している。しかし、シュクロース濃度については、保存卵子の生存性へ及ぼす影響は明らかにされていない。

* 連絡責任者 (家畜部)

また、ガラス化保存する手法において、胚あるいは卵子を液体窒素へ投入する際に持ち込むガラス化液の容量を極力減らし、冷却速度を飛躍的に高める方法が検討されている。ガラス化液平衡した卵子を載せる支持体として、オープンプルドストロー^{4, 10)}、電子顕微鏡グリッド⁸⁾、クライオループ⁶⁾等を用いた手法や、液体窒素に浸した金属板を用いるsolid-surface vitrification (SSV法)²⁾が報告されている。Papisら¹¹⁾は、支持体を使わずに卵子の入ったガラス化液をドロップ状に液体窒素へ滴下するマイクロドロプレット法で保存卵子の生存性を改善した。しかし、これらの既存の手法では、一度にガラス化保存処理できる卵子の個数は数個～十数個までと限られている。

そこで、本試験では、ウシ体外成熟卵子のガラス化保存について、エチレングリコールとシュクロースを耐凍剤としたガラス化液におけるシュクロース濃度を検討するとともに、平衡時間内に行う作業を簡略化し一度により多くの卵子を処理するため、フィルターを支持体として用いた保存手法を考案した。

材料及び方法

試験1 ガラス化液のシュクロース濃度が保存後の胚分割率および胚発生率に及ぼす影響

1 供試卵子の採取および成熟培養

県内のと畜場から雌ウシの卵巣を採取し、20℃に保温した抗生物質（ペニシリン、ストレプトマイシン）添加ビタミンB1加リンゲル液（全葉）に浸した状態で約24時間保存後、注射器を用いて卵巣表面の直径10mm未満の卵胞から卵胞液と共に卵子を吸引し、3 mg/mlウシ血清アルブミン（SIGMA:A7904）、抗生物質添加ダルベッコPBS（GIBCO:11500-030）溶液を用いて回収した。回収した卵子のうち、卵子の周囲全体に卵丘細胞が緻密に付着している、あるいは一部に卵丘細胞が薄く、剥がれた部分が認められるものの卵丘細胞の付着状況が良い卵子を

選んだ。成熟培養は、4 ウェルディッシュ（Nunc:176740）に成熟培地 5%ウシ血清、抗生物質添加TCM199（GIBCO:12340-030）を500 μ l入れ、表面をミネラルオイル（ナカライテスク:24144-85）で覆い1ウェルあたり50個の卵子を入れた。培養器の気相および温度条件は3%CO₂、10%O₂、87%N₂、38.5℃とした。

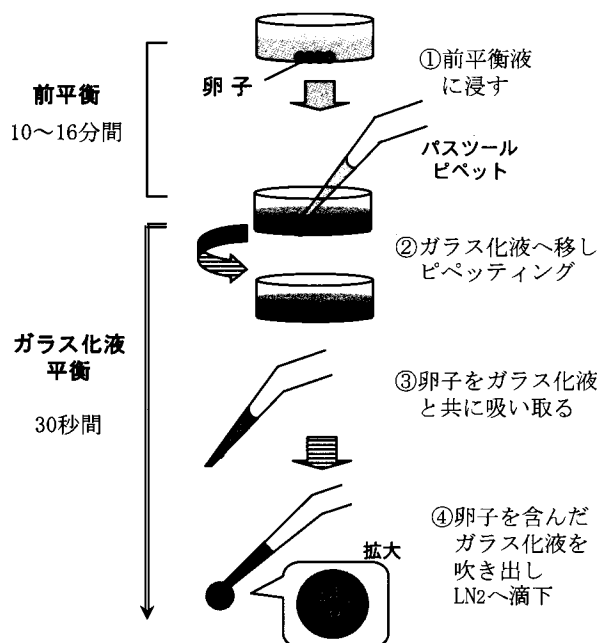
2 卵子のガラス化および加温、希釈

20～23時間成熟培養した卵子は、卵丘細胞を剥がすため0.1%ヒアルロニダーゼ、抗生物質添加TCM199溶液へ移し、裸化処理した。

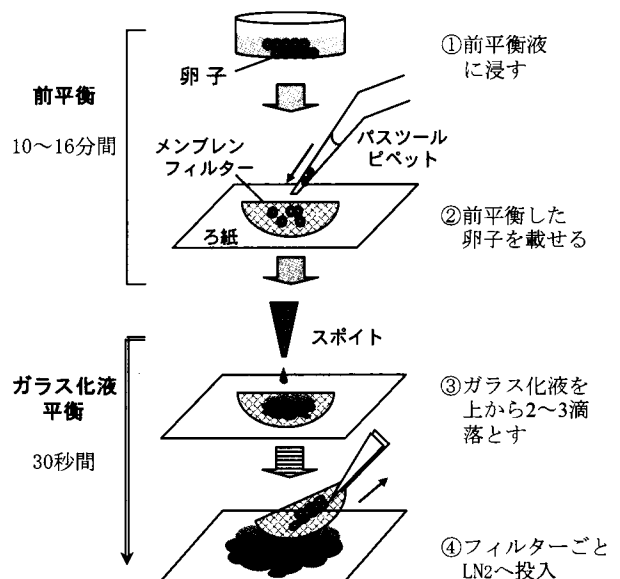
マイクロドロプレット法を用い（第1図）、エチレングリコールとシュクロースを耐凍剤としたガラス化液においてシュクロース濃度が保存卵子の体外受精後の胚分割率および胚発生率へ及ぼす影響について検討した。ガラス化および加温・希釈は全て37℃の温度条件下で行った。

5～10個の卵子を3%エチレングリコール、20%ウシ胎仔血清、抗生物質添加TCM199溶液へ移し10～16分間前平衡処理した後、ガラス化液40%エチレングリコール、1Mもしくは0.67Mシュクロース、20%ウシ胎仔血清、抗生物質添加TCM199溶液へ移した。卵子をガラス化液へ移して液体窒素へ滴下するまでのガラス化液平衡時間が30秒となるように、ピペットから卵子をガラス化液とともにドロップ状（6 μ l前後）に吹き出し、液体窒素へ直接滴下した。ガラス化保存した卵子のドロップは、液体窒素内で2 mlのサンプルチューブへ入れてケーンに装着し、ボンベで保管した。

加温、希釈の際には、希釈液0.5Mシュクロース、20%ウシ胎仔血清、抗生物質添加TCM199溶液を用いた。液体窒素中に保存していた卵子を含むドロップをピンセットでつまみとり、希釈液の入った35mmシャーレ（FALCON:1008）へ移して加温し、3分間静置して希釈した。卵子は20%ウシ胎仔血清、抗生物質添加TCM199溶液へ移し5分間保持した後成熟培地へ戻し、体外受精までの間1～2時間培養した。



第1図 マイクロドロプレット法



第2図 フィルター法

体外受精および発生培養は、当场常法¹⁾により行い、体外受精後8日目まで体外培養した。

保存した卵子の体外受精後2日目における2, 4, 8細胞以上分割した胚分割率および、7日目に胚盤胞以上、8日目に拡張胚盤胞以上へ発育した胚発生率を調査した。また、ガラス化保存処理をしない新鮮卵子を対照とし、胚分割率および胚発生率を比較した。

試験2 フィルターを利用した卵子のガラス化保存法

供試卵子の採取および成熟培養の処理方法については、試験1と同様に行った。卵巣採取後の保存時間は約6~8時間とし、成熟培養の気相条件は5%CO₂, 95%airとした。

卵子のガラス化保存において、孔径10μm, 直径13mmのメンブレンフィルター(MILLIPORE:JCWP01300, 以下フィルター)を半分に切断したものを支持体とした手法(フィルター法)を検討した(第2図)。

フィルター法では、ろ紙(ADVANTEC:No5A)の上に支持体となるフィルターを置き、その上に試験1と同様の方法で前平衡処理した卵子を載せた。スポイトを用いてガラス化液40%エチレングリコール, 0.67Mシュクロース, 20%ウシ胎仔血清, 抗生物質添加TCM199溶液を上から2~3滴落としてガラス化液平衡処理し、ガラス化液平衡時間が30秒となるよう卵子の載ったフィルターごと液体窒素へ投入した。ガラス化保存したフィルターは、試験1と同様の方法で保管した。

加温および希釈は、液体窒素中に保存していた卵子の載ったフィルターをピンセットでつまみ、試験1と同様の希釈液に浸して加温し、10分間かけて希釈した。

希釈を終えた保存卵子の体外受精および体外培養は試験1と同様の方法で行った。

フィルター法と、マイクロドロップレット法について、ガラス化液平衡処理における所要時間を比較した。1度に1~50個の卵子をガラス化液平衡し、処理にかかる所要時間を計測した。

保存卵子の体外受精後2日目における、2, 4, 8細胞以上分割した胚分割率, 7日目に胚盤胞以上, 8日目に拡張胚盤胞以上へ発育した胚発生率を調査した。この試験で一度にガラス化液平衡処理した卵子の数は、フィルター法で一度に20~30個, マイクロドロップレット法で5~10個とした。また、ガラス化保存処理をしない新鮮卵子を対照とし、胚分割率および胚発生率を比較した。

3 統計処理

試験1および試験2の胚分割率および胚発生率については、各試験区間でχ²検定を行った。

結 果

試験1 ガラス化液のシュクロース濃度が保存後の胚分割率および胚発生率に及ぼす影響

保存卵子の体外受精後2日目における胚分割率(1M区vs0.67M区)は、2細胞以上分割率(27.7% vs 38.0%)において0.67M区が1M区に比べて有意に(p<0.05)高かった(第1表)。4細胞以上分割率(13.8% vs 22.0%)および8細胞以上分割率(6.4% vs 11.3%)は有意な差で

はないものの、0.67M区が1M区に比べて高い傾向を示した。卵子の保存処理を行わなかった新鮮卵子と0.67M区および1M区との間においては、それぞれ全ての項目で有意差が認められた(p<0.01)。

体外受精後7日目に胚盤胞以上へ発育した胚発生率(0.0% vs 4.0%)は、0.67M区が1M区に比べて有意に(p<0.05)高かった(第2表)。8日目に拡張胚盤胞以上へ発育した胚発生率(3.2% vs 8.0%)は有意な差ではないものの、0.67M区が1M区に比べて高い傾向を示した。卵子の保存処理を行わなかった新鮮卵子と0.67M区および1M区との間においては、それぞれ全ての項目で有意差が認められた(p<0.01)。

第1表 ガラス化液のシュクロース濃度が保存卵子の胚分割率に及ぼす影響

濃度(M)	供試卵子数	受精後2日目 胚分割率(%)		
		2細胞≤	4細胞≤	8細胞≤
1	94	26 (27.7) ^a	13 (13.8) ^a	6 (6.4) ^a
0.67	150	57 (38.0) ^b	33 (22.0) ^a	17 (11.3) ^a
新鮮卵子	164	124 (75.6) ^b	107 (65.2) ^b	73 (44.5) ^b

注) 異符号間に有意差あり(小文字異符号:p<0.05, 大文字異符号:p<0.01): χ²検定

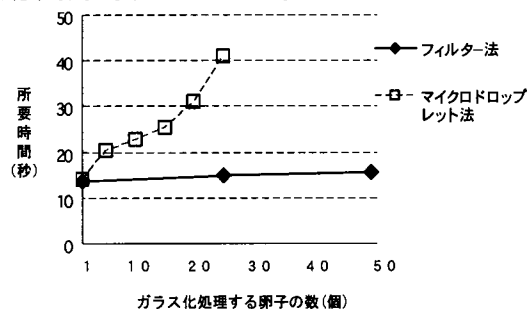
第2表 ガラス化液のシュクロース濃度が保存卵子の胚発生率に及ぼす影響

濃度(M)	供試卵子数	胚発生率(%)	
		7日目	8日目
1	94	0 (0.0) ^a	3 (3.2) ^a
0.67	150	6 (4.0) ^b	12 (8.0) ^a
新鮮卵子	164	29 (17.7) ^b	39 (23.8) ^b

注) 異符号間に有意差あり(小文字異符号:p<0.05, 大文字異符号:p<0.01): χ²検定

試験2 フィルターを利用した卵子のガラス化保存法

一度に1~50個の卵子をガラス化液平衡処理した所要時間は、マイクロドロップレット法では一度に平衡処理を行う卵子の数が増えるに従い、ガラス化液平衡処理を終えて液体窒素へ投入するまでの所要時間が長くなり、20個を超えると30秒を超過した(第3図)。一方、フィルター法では、一度に平衡処理を行う卵子の個数が増えても所要時間は変わらなかった。



第3図 ガラス化液平衡処理の所要時間

保存卵子の体外受精後2日目における胚分割率(フィルター法vsドロップ法)は、2細胞以上分割率(44.3% vs 34.1%)、4細胞以上分割率(29.5% vs 22.0%)、8細胞以上分割率(18.0% vs 12.2%)全ての項目においてフィルター法がマイクロドロプレット法に比べて有意な差ではなかったが高い傾向を示した(第3表)。卵子の保存処理を行わなかった新鮮卵子和フィルター法、ドロップ法との間においては、それぞれ全ての項目で有意差が認められた($p<0.01$)。

受精後7日目に胚盤胞以上へ発育した胚発生率(6.5% vs 3.0%)および、8日目に拡張胚盤胞以上へ発育した胚発生率(12.1% vs 7.2%)は、フィルター法がマイクロドロプレット法に比べて有意な差ではなかったが高い傾向を示した(第4表)。卵子の保存処理を行わなかった新鮮卵子和フィルター法、ドロップ法との間においては、それぞれ全ての項目で有意差が認められた($p<0.01$)。

第3表 ガラス化保存手法が保存卵子の胚分割率に及ぼす影響

手法	供試卵数	受精後2日目 胚分割率(%)		
		2細胞 \leq	4細胞 \leq	8細胞 \leq
フィルター法	61	27 (44.3) ^A	18 (29.5) ^A	11 (18.0) ^A
ドロップ法	82	28 (34.1) ^A	18 (22.0) ^A	10 (12.2) ^A
新鮮卵子	206	155 (75.2) ^B	144 (69.9) ^B	105 (51.0) ^B

注) 異符号間に有意差あり ($p<0.01$): χ^2 検定

第4表 ガラス化保存手法が保存卵子の胚発生率に及ぼす影響

手法	供試卵数	胚発生率(%)	
		7日目	8日目
フィルター法	155	10 (6.5) ^A	19 (12.3) ^A
ドロップ法	167	5 (3.0) ^A	13 (7.8) ^A
新鮮卵子	439	102 (23.2) ^B	142 (32.5) ^B

注) 異符号間に有意差あり ($p<0.01$): χ^2 検定

考 察

エチレングリコールは細胞への透過性に優れ、一細胞である卵子の細胞へ素早く浸透するため、ガラス化液を不凍溶液とし細胞内の氷晶形成を防ぐ耐凍剤として用いられる。ウシ卵子のガラス化で保存後胚盤胞が得られた報告を見ると、エチレングリコール濃度は23~50%の範囲で用いられている^{2, 4, 8, 9, 11}。これらの報告間では、エチレングリコール濃度だけでなく、組み合わせる糖等の種類や濃度、ガラス化の手法が異なるが、これらの条件を同一にしてエチレングリコール濃度を検討したOtoiら⁹の報告では、20%を除く30, 40, 50%で胚盤胞への発育が確認され、その中で40%が最も発生率が高くなっている。

また、細胞を透過しない糖であるシュクロースは、卵子のガラス化に必須の成分ではないが、ガラス化液の浸透圧を高めてガラス化しやすくすることに加え、細胞膜を保護する働きがある¹²。試験1では、40%エチレングリ

コールと組み合わせるシュクロース濃度は1Mより0.67Mの方が適しているという結果になった。卵子保存で未成熟卵子を用いたArav¹¹らの報告では、1M, 0.5M, 0.25Mのシュクロース溶液に浸漬して保存後の受精率が1Mと0.5M, 0.25Mとの間で差が認められている。胚盤胞を用いたMartinezら⁷は、エチレングリコールとグリセロールを用いたガラス化液に添加するシュクロース濃度を検討し(1M, 0.5M)、保存後の脱出率、細胞数で0.5Mが優れていると報告している。シュクロースは浸透圧を保ちつつ、耐凍剤であるエチレングリコールが持つ毒性の影響を抑えるよう働くため両者が異なる作用機序を持つこと、また保存する細胞の種類によって、両者の適切な濃度の組み合わせが存在すると考えられる。試験1の結果はこのことを示唆すると思われるが、卵子の保存において、エチレングリコールと組み合わせる最も適切なシュクロース濃度を解明するには、今後詳細な検討が必要である。

試験2では、既存の種々の支持体を用いた手法に対し、ガラス化液平衡処理の作業を簡略化し、一度により多くの卵子を保存することを可能としたフィルター法を新たに考案し、マイクロドロプレット法と比較した。ガラス化液平衡処理の所要時間は、マイクロドロプレット法では卵子の数が増えるに伴って所要時間が長くなり、20個以上では一度にガラス化平衡処理することができなくなる。これは、ガラス化液平衡処理を行うのにガラス化液中でのピペティングが必要であることが起因しており、オープンブルドストロー^{4, 14}、電子顕微鏡グリッド⁸、クライオループ⁶、SSV法²と、既報であるいずれの手法でも同様のことが考えられる。一方、フィルター法では、前平衡処理の段階で卵子をフィルターへ載せ、ガラス化液を上から数滴滴下するだけでガラス化液平衡処理できることから、卵子の個数に関わらず一度に処理ができる。さらに、マイクロドロプレット法ではドロップ内の卵子の存在を直接確認できないが、フィルター法ではガラス化液平衡の過程を通して、顕微鏡下でフィルター上の卵子の存在を確認することができる。

保存卵子の体外受精後の胚分割率及び胚発生率において、フィルター法はマイクロドロプレット法と比較して同等以上の成績が得られたことから、フィルター法の有用性が明らかとなった。

なお、試験1(実施時期2003年6~8月)における新鮮卵子の体外受精後の胚分割率および胚発生率が、試験2(実施時期2004年1~2月)と比較して低かったのは、卵巣から卵子を吸引した時間が試験2ではと畜後約6~8時間であったのに対し、試験1を実施した時期が牛海綿状脳症検査のため卵巣の持ち出しに規制があり、と畜後約24時間経過したことが原因と考えられる。

ガラス化保存した卵子の体外受精後の胚分割率、胚発生率が試験1, 2を通じ、保存を行わなかった新鮮卵子と比較して低かったことは、卵子の細胞に対する低温感作によるダメージの問題^{3, 5, 8}が依然として残されていることが示唆され、今後の課題として残された。

引用文献

- 1) Arav,A., D.Shehu, and M.Mattioli (1993) Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. *J. Reprod. Fertil*, **99**:353-358.
- 2) Dinnyes,A., Y.Dai, S.Jiang, and X.Yang (2000) High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol.Reprod*, **63**:513-518.
- 3) Fuku,E., L.Xia, and B.R.Downey (1995) Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*, **32**:139-156.
- 4) Hurtt,A.E., F.Landim-Alvarenga, G.E.Seidel, Jr. and E.L.Squires (2000) Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open-pulled straws. *Theriogenology*, **54**:119-128.
- 5) Hyttel,P., G.Vajta, and H.Callesen (2000) Vitrification of bovine oocytes with the open pulled straw method : ultrastructural consequences. *Mol.Rep.Dev*, **56**:80-88.
- 6) Lane, M., B. D. Bavister, E. A. Lyons, and K.T.Forest (2001) Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. *Nature.Biotech*, **17**:1234-1236.
- 7) Martinez,A.G., A.Valcarcel, M.A.de las Heras, D.G. de Matos, C.Furnus, G.Brogliatti (2002) Vitrification of in vitro produced bovine embryos : in vitro and in vivo evaluations. *Anim.Reprod.Sci*, **73**:11-21.
- 8) Martino,A., N.Songsasen, and S.P.Leibo (1996) Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling.*Biol.Reprod*, **54**:1059-1069.
- 9) Otoi,T., K.Yamamoto, N.Koyama, S.Tachikawa, and T.Suzuki (1998) Cryopreservation of mature bovine oocytes by vitrification in straws.*Cryobiology*, **37**:77-85.
- 10) Papis,K., B.Avery, P.Holm, H.Callesen, and T.Greve (1995) The effect of vitrification solution, equilibration time, and direct dilution method on survivability of equilibrated or vitrified bovine in vitro matured oocytes. *Theriogenology*, **43**:293 abstr.
- 11) Papis,K., M.Shimizu, Y.Izaike (2000) Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology*, **54**:651-658.
- 12) 齋藤美英・野田準一・佐野文彦・三宅晃次 (1998) 牛胚凍結保存液に用いる添加剤の細胞膜保護効果の推定, 平成10年度静岡畜試年報: 5 - 8 .
- 13) 上田修二・平嶋善典 (1997) 発生培地中のグルコース, アミノ酸及び浸透圧が牛体外受精胚の発育に及ぼす影響, 福岡県農総試研究報告**16**:100-104.
- 14) Vajta,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**:53-58.