

# 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 第2報 ストロー内ガラス化液希釈法の開発

笠 正二郎\*・森 美幸・上田修二

ナイロン糸に鉄製金属管を装着し、ストロー外部から磁石で操作できるガラス化用具を考案した。このガラス化用具を用いると、胚の超急速ガラス化後、ストロー内保存、さらには、加温時にストロー内でのガラス化液希釈が可能である。この手法で保存した体外受精胚を緩慢冷却法の凍結胚を対照として、加温または融解して、それぞれの生存率および透明帯脱出率を比較検討した。その結果、本手法による超急速ガラス化胚の生存率は緩慢冷却法と比べて有意に高く（培養72時間：94%vs66%）、同様に、透明帯脱出率も有意に高かった（培養72時間：89%vs51%）。これらのことから、本手法は超急速ガラス化したウシ体外受精胚のストロー内での加温およびガラス化液希釈を可能にし、生存率および透明帯脱出率が向上することが明らかとなった。

[キーワード：ウシ、胚、ガラス化、生存率、用具]

Survivability of Vitrified Bovine Embryos Produced in Vitro Using Nylon Thread (2) Developmental method of vitrification solution diluted in a straw. KASA Shojiro, Miyuki MORI and Syuji UEDA (Fukuoka Agricultural Research Center, Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan) *Bull. Fukuoka. Agric. Res. Cent.* 25:99-103(2006)

A vitrification straw apparatus which is composed of a nylon thread attached to an iron metal tube was created. This apparatus can be operated with a magnet from the exterior of the straw. With the use of the apparatus, bovine embryo was preserved in the straw after rapid vitrification. Moreover, while the straw is being warmed, the vitrification solution can be diluted within the same straw. The rate of survival of bovine embryo obtained and preserved in vitro with this technique was compared with embryo preserved by a slow cooling method as a control and warmed or thawed for a comparative examination for each rate of survival and hatched zona pellucida. Consequently, it was found that the rate of survival of rapid vitrified embryos using this technique was significantly higher compared with embryos preserved by the slow cooling method (94% vs. 66%), and the rate of hatched zona pellucida was also significantly higher (89% vs. 51%). This technique enabled warming and vitrification solution dilution within the straw in which bovine embryo has been preserved in vitro by means of rapid vitrification. These findings made it clear that the rate of survival and hatched zona pellucida improved.

[keywords: bovine, embryo, vitrification, survival, apparatus]

## 結 言

ウシ胚の長期保存法である緩慢冷却法は、凍結液の耐凍剤の濃度が8~10%であるため、融解時に耐凍剤の毒性が低く、耐凍剤の希釈を必要としない。そのため、移植現場で融解後、そのまま移植するダイレクト移植<sup>1)</sup>が可能である。しかし、ウシ体外受精胚を緩慢冷却法で凍結保存すると、凍結時に胚細胞脱水が不十分なため、細胞中の氷晶が細胞を傷つけ、生存率が低下する。そこで、著者は前報<sup>2)</sup>で、ナイロン糸を用いて移植用ストローに格納できるガラス化用具を考案し、この用具でウシ体外受精胚を液体窒素に浸漬し超急速でガラス化したところ、緩慢冷却法と比べて有意に高い生存率を得た。

このように超急速ガラス化はウシ胚の生存率を高く維持できる保存技術として優れている。しかし、超急速ガラス化の短所として、ガラス化液に含まれる高濃度(30~60%)の耐凍剤が胚に悪影響を及ぼすため、加温後に速やかなガラス化液の希釈が必要である。このため、緩慢冷却法のように保存したストローのままに胚移植ができず、超急速ガラス化した胚を移植するには、現在のところ、ガラス化胚を一旦シャーレに移し、ガラス化液を希釈し、移植用ストローに詰めて移植しなければならなかった。このように超急速ガラス化法は移植に伴

う事前の作業が煩雑なため、生存性に優れていても、現場普及するまでには至っていない。そのため、高い生存率を維持しつつ、緩慢冷却法と同様に移植現場で簡易に加温し、同じストロー内でガラス化液を希釈し移植できる技術の開発が望まれていた。

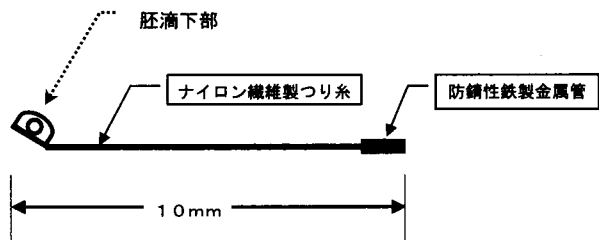
今回、ウシ胚を緩慢冷却法と同等の簡便さと超急速ガラス化の高い生存率を併せ持つ保存法を確立するために、前報<sup>2)</sup>で開発したガラス化用具に改良を加え、超急速ガラス化したウシ胚をストロー内で保存でき、加温時には詰め替えることなく、同じストロー内で高濃度のガラス化液を希釈できる手法を考案した。そして、ウシ胚保存、加温およびガラス化液希釈処理に本手法が利用できるかを検証する目的で、胚の生存率および透明帯脱出率を従来の緩慢冷却法で凍結した胚と比較した。

## 材料および方法

### 1 ガラス化用具の作製

ウシ胚をガラス化する用具は、前報<sup>2)</sup>のガラス化用具の一部を改良し作製した。第1図に示すように、10mm長の2.5号（直径0.26mm）ナイロン繊維製釣り糸（GOSENGS-285C）を用いた。糸の一端1mm程度を平面化し、20~40度の角度を形成して胚滴下部として、反対端には注射針（TERUMO 23G×11/4）を1~2

mmに切断した防錆性の鉄製金属管を通して、平面に潰し、これをガラス化用具とした。



第1図 ストロー用ガラス化用具

2 体外受精胚の生産および供試胚

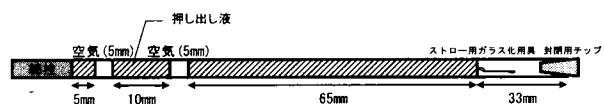
供試した体外受精胚は前報<sup>3)</sup>と同法で生産した。と畜された雌牛から吸引した卵丘細胞卵子複合体に体外受精を施し、体外受精後7日または8日間培養した拡張胚盤胞期胚を供試した。緩慢冷却法では68胚およびガラス化用具を用いた超急速ガラス化法では70胚を試験に供試した。

3 緩慢冷却および超急速ガラス化

緩慢冷却法は前報<sup>3)</sup>と同様に実施した。

超急速ガラス化胚のストロー（富士平工業16010-159）内保存は以下の手順で行った。

まず、移植用ストローにはガラス化液希釈液（0.5M スクロース（SIGMA S-1888）および20%仔牛血清（GIBCO16010-159）を添加したダルベッコリン酸緩衝液（GIBCO14287-80）を第2図に示すように吸引し、第3図の1に示すように液体窒素に浮かした発泡スチロール板上に静置し、液体窒素の冷却ガスでストロー



第2図 ストロー内ガラス化液希釈液の配置とガラス化用具の封入

1) : ガラス化液希釈液

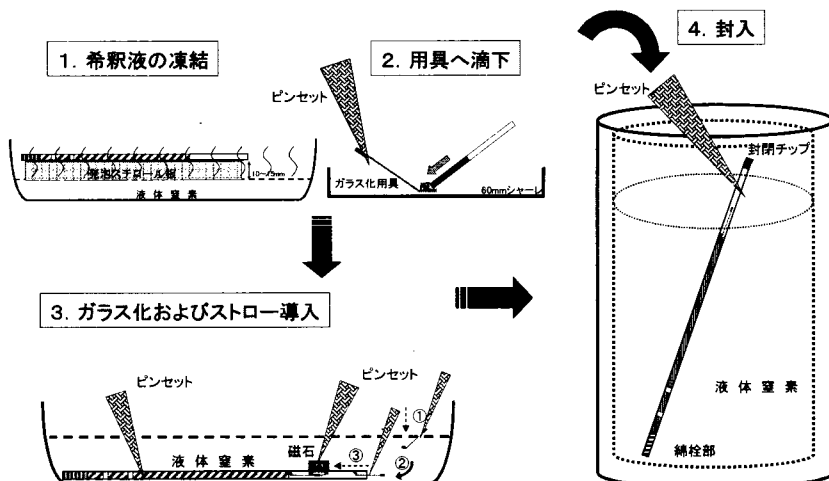
内のガラス化液希釈液を緩徐に凍結後（第3図の1）、液体窒素に沈めておいた（第3図の3）。超急速ガラス化の前平衡およびガラス化液への浸漬は前報<sup>3)</sup>と同様に実施し、ガラス化液に浸漬した胚をバスツールピペットで吸い上げ、実体顕微鏡下でガラス化用具に滴下した（第3図の2）。この時、ガラス化用具に滴下するガラス化液の容量は胚を保持する最少容量とした。胚をガラス化液に浸漬して30秒後にガラス化用具を液体窒素に投入し超急速ガラス化した（第3図の3の①）。次に、ピンセットでガラス化用具の胚滴下部から金属管の部分が入る程度まで導入し（第3図の3の②）、それ以降は磁石（アズワンAI-1158-220）を使い、ガラス化用具をストロー内の凍結したガラス化液希釈液に触れるまで誘導した（第3図の3の③）。ガラス化用具を導入したストローは綿栓部を下にして、ストロー長より10mm程低く液体窒素を満たしたデュワー瓶に素早く移した。最後に、ストローの開口部を10μlピペットチップ（アシストA720）の先端10mm程度を切断し、先端部を押し潰した封閉チップを封入用パウダー（富士平工業NFA81）で封閉した（第3図の4）。封閉後ストローは底を塞いだキャニスターに立てて液体窒素保存ボンベ内で保存した。

4 緩慢冷却胚の融解および超急速ガラス化胚の加温とガラス化液希釈

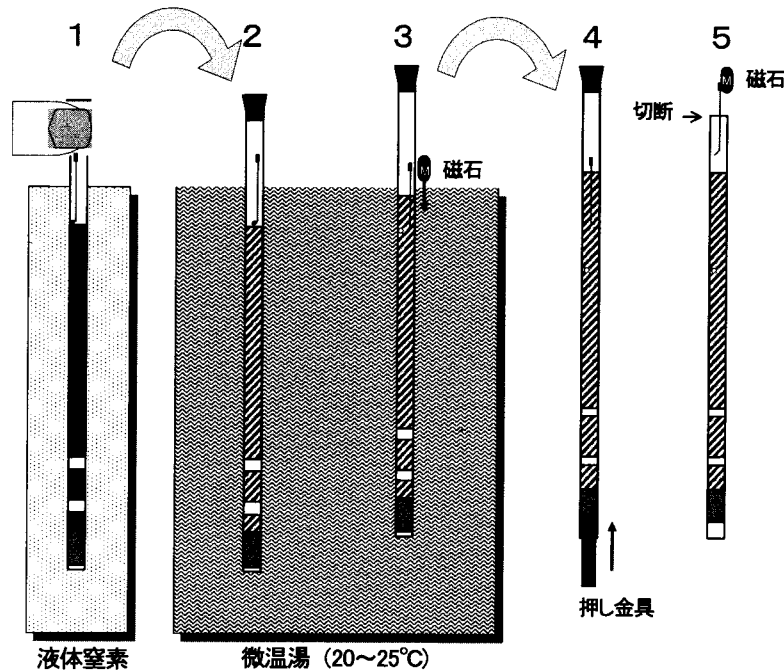
緩慢冷却法で凍結した胚の融解は前報<sup>3)</sup>と同様に行い、融解胚は20%仔牛血清を添加したダルベッコリン酸緩衝液（保存液）で2回洗浄後、保存液に導入した。

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（第4図）。

液体窒素ボンベのキャニスターの液体窒素面からストローをピンセットで10mm程摘み出した状態で、封閉チップのパウダー部を片方の指で摘んで温めることでパウダーを軟化させた後に封閉チップを緩め、ストロー内の窒素ガスを排出させた（第4図の1）。この時、ガラス化用具の位置を確かめ、滴下部がガラス化液希釈液に接していない場合は、液体窒素内で磁石を用い、ガラス化用具をガラス化液希釈液に接するように導いた。次に、



第3図 超急速ガラス化ウシ胚のストロー内封入



第4図 ストロー内に封入した超急速ガラス化ウシ胚の加温およびガラス化液希釈法

ストローを指で摘んだまま、20～25℃の微温湯にガラス化液希釈液層の上面まで浸し（第4図の2）、ガラス化液希釈液の融解を確認するとともに、ストロー外側から磁石で用具の滴下部をガラス化液希釈液に誘導した（第4図の3）。その後、速やかにストローを融解槽から取り出して、胚がストロー内壁面に付着し、ガラス化液希釈液に浸漬せずに死滅するのを避けるため、直径1mm程度の針金の押し金具で下方の綿栓を5mm程度ストローへ押し込み、ガラス化液希釈液面を押し上げた（第4図の4）。最後に、封閉チップのストロー外側を固く絞ったアルコール綿花で清拭し、ストローカッターで切断した後、磁石でガラス化用具をつり出した（第4図の5）。加温開始から5分経過後に、胚をガラス化液希釈液とともに、シャーレに押し出し、緩慢冷却胚の融解と同様に、保存液で2回洗浄後保存液に導入した。

#### 5 ストロー内のガラス化液希釈液の配置とガラス化液の希釈

ストロー内でのガラス化液希釈液の配置は、ガラス化用具、移植時のストロー切断、綿栓側の押し出し液層の配置および胚注入器の構造等を考慮したうえで、最大の希釈倍率が得られるように、第2図に示すとおり65mmとした。ストローmm単位長の内容液の容量は2.01 $\mu$ lであるため、ストローに吸引した希釈液長が65mmの時、ガラス化液希釈液の容量は130.65 $\mu$ lとなる。また、試験に供試したガラス化液の比重は1.1102g/mlであり、ガラス化用具に滴下した最少容量のガラス化液量は、ガラス化液滴下時のガラス化用具の質量3.07mgからガラス化用具の質量2.76mgを差し引いたものをガラス化液の比重で割った商の0.28 $\mu$ l（ $\pm$ 0.03）である（第1表）。このことから、65mm長のガラス化液希釈液量130.65 $\mu$ lに対して、ガラス化液量0.28 $\mu$ lであるため、希釈率は468倍である。

第1表 ストロー内でのガラス化液希釈倍率

ガラス化液滴下時 ガラス化用具質量 A(mg)	ガラス化用具質量 B(mg)	ガラス化液容量 C( $\mu$ l)	希釈倍率
3.07 $\pm$ 0.41	2.76 $\pm$ 0.39	0.28 $\pm$ 0.03	468

- 1) ガラス化用具20本の平均（ $\pm$ 標準偏差）
- 2) ガラス化液容量 C = (A - B)  $\div$  ガラス化液比重
- 3) 希釈倍率 = ガラス化液希釈液容量  $\div$  ガラス化液容量 C
- 4) ガラス化液希釈液容量：130.65 $\mu$ l
- 5) ガラス化液比重：1.1102g/ml

#### 6 融解または加温胚の培養および生存性

融解または加温およびガラス化液を希釈した胚は前報<sup>3)</sup>と同じ方法で培養し、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。

#### 7 統計処理

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

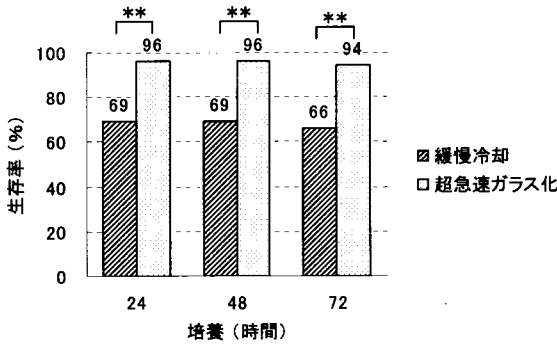
## 結果

#### 1 緩慢冷却胚および超急速ガラス化胚の生存率

供試胚の生存率は、培養後24時間で緩慢冷却法は69%（47/68）および超急速ガラス化法は96%（67/70）、48時間でそれぞれ69%（47/68）および96%（67/70）、72時間で66%（45/68）および94%（66/70）であり、培養24時間以降72時間で超急速ガラス化が有意に（ $p < 0.01$ ）高い生存率を示した（第5図）。

#### 2 緩慢冷却胚および超急速ガラス化胚の透明帯脱出率

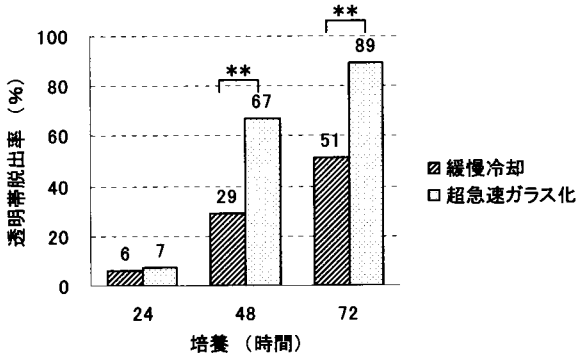
透明帯脱出率は、培養24時間で緩慢冷却法は6%（4/68）および超急速ガラス化法は7%（5/70）、



第5図 ストロー内に封入し緩慢冷却および超急速ガラス化した胚の生存率

1) \*\*: P<0.01

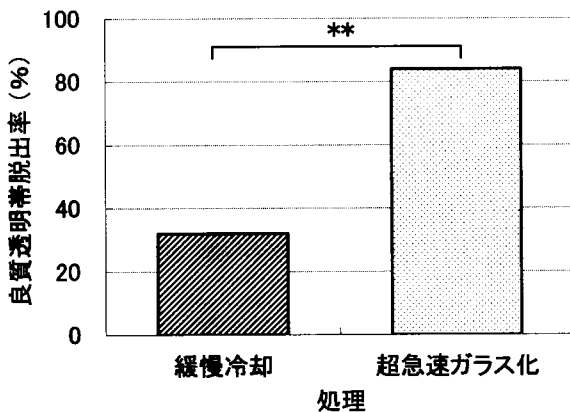
48時間でそれぞれ29% (20/68) および67% (47/70), 72時間で51% (35/68) および89% (62/70) と両試験区で経時的な上昇が見られた。培養48時間および72時間で、透明帯脱出率は超急速ガラス化法が緩慢冷却法より有意に (p<0.01) 高かった (第6図)。



第6図 ストロー内に封入し緩慢冷却および超急速ガラス化した胚の透明帯脱出率

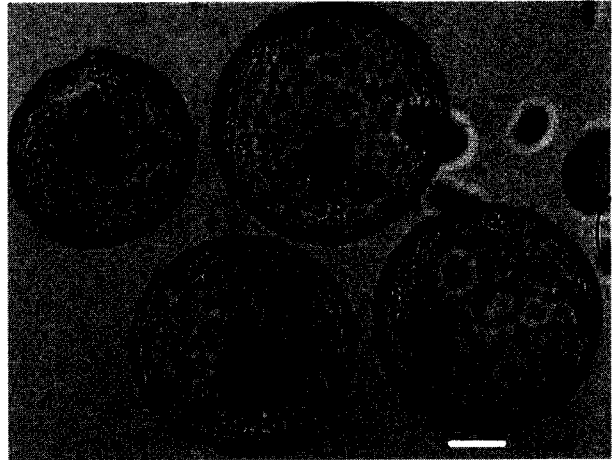
1) \*\*: P<0.01

また、培養72時間後における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透明帯脱出率は、超急速ガラス化法 (84% : 59/70) が緩慢冷却法 (32% : 22/68) より有意に (p<0.01) 高かった (第7図、第8図)。



第7図 ストロー内に封入した緩慢冷却胚および超急速ガラス化胚の培養72時間後の良質透明帯脱出率

1) \*\*: P<0.01



第8図 加温・ガラス化液希釈後培養した良質透明帯脱出胚 (培養72時間)

### 考 察

哺乳動物細胞を長期間保存可能なガラス化法はRALRら<sup>8)</sup>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<sup>7)</sup>, OPS (Open Pulled Straw) 法<sup>10)</sup>, GL-Tips (Gel Loading-Tips) 法<sup>9)</sup>, Cryotop法<sup>4)</sup>およびCryoloop法<sup>5)</sup>等は急激な冷却が可能な超急速ガラス化法であり、その高い生存率等が報告されている。しかし、これらの手法で超急速ガラス化したウシ胚を汎用性が高い移植用0.25ml容ストロー内で保存し、同じストロー内で加温およびガラス化液希釈できる胚保存および移植技術の報告はみられない。

今回、超急速ガラス化したウシ体外受精胚をストロー内に保存後、同じストロー内で加温してガラス化液を希釈できる手法を考案し、胚の生存率および透明帯脱出率を緩慢冷却法と比較した。その結果、本手法でウシ体外受精胚を超急速ガラス化すると、緩慢冷却法と比べ有意に高い生存率と透明帯脱出率が認められ、ウシ体外受精胚の超急速ガラス化胚のストロー内保存手法として有効であることが示唆された。本法により超急速ガラス化体外受精胚が有意に高い生存率等を得た要因としては、胚の生存に悪影響を及ぼす温度域を超急速に通過できる超急速ガラス化の利点<sup>2, 3, 8, 9, 10)</sup>が有効に機能しているためと思われた。また、本法の特徴はストロー内でのガラス化液希釈で加温後に磁石を用いて、ガラス化用具を希釈液に誘導できること、また、押し金具で希釈液面を上昇させて胚を強制的に希釈液内へ導入できることであり、ガラス化液希釈が確実に実行できることも高い生存率に大きく寄与していると思われた。

前報<sup>3)</sup>ではSAITOら<sup>6)</sup>の手法により0.5Mと0.25Mの2段階スクロース濃度で希釈を行い、高い生存率等が得られた。今回はストロー内で0.5Mスクロースの1段階のみのガラス化液希釈で、前報<sup>3)</sup>と同等に高い生存率等を得ることができた。この要因として、本法のガラス化液量が0.28μlと極微量であるため、1段階希釈でも希釈液量130.65μlから換算すると450倍以上の高い希釈率となり、このことが5分間での希釈を可能とし、煩雑な既存のガラス化液希釈と同等に高い生存率を得られたと推測された。

本法のガラス化用具には鉄製の管を装着しているため、磁石の磁力で間接的にガラス化用具を操作できる。このことが保存時には胚をストロー内に格納でき、また、加温時には強制的にガラス化液希釈ができるなど優れている点が多く、生存性の高い超急速ガラス化胚の簡易移植技術として、今後、移植現場で利用される事が期待される。

### 引用文献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 笠正二郎・森美幸・上田修二 (2005) 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. 福岡県農総試研究報告**24**: 68-72.
- 4) Kuwayama M. and O. Kato (2000) All-round vitrification method for human oocytes and embryos. *J. Assist. Reprod. Genet.* **17**: 477 (abst.).
- 5) Lane M., B. P. Bavister, E. A. Lyons and K. T. Forest (1999) Containerless vitrification oocytes and embryos. *Nat. Biotechnol.* **17**: 1234-1236.
- 6) Saito N. and K. Imai (1997) The effect of addition of various monosaccharides to vitrification solution on the survival of bovine blastocysts produced in vitro. *Cryobiology and cryotechnolgy* **43**(1): 34-39.
- 7) Papis K., M. Shimizu and Y. Izaike (2000) Factor affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology* **54**(5): 651-658.
- 8) Rall W. F. and G. M. Fahy (1985) Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 C by vitrification. *Nature* **313**: 573-575.
- 9) 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.
- 10) 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.