

動物胚の凍結保存 —子宮内膜、卵管上皮細胞・粘液添加の凍結に対する効果—

小林修一・前田淳一・近藤守人*・福井幸昌*・平井洋士

Additional Effects of Cells and Mucus on Cryoprotection
of Bovine and Mouse Embryos

Shuichi KOBAYASHI, Junichi MAEDA,
Morito KONDO*, Yukimasa FUKUI*,
Hiroshi HIRAI

*現福井県嶺南牧場

要 約

ウシ体外成熟、体外受精由来胚（ウシIVF胚）およびマウス体内受精由来胚（マウス胚）に細胞成分や、粘液を添加し凍結保存を行い、胚を融解し、細胞・粘液添加が胚に与える影響について検討した。ウシIVF胚はウシ卵巣の未成熟卵胞内から得た胚盤胞を用い、胚回収時の灌流液に含まれていた子宮内膜上皮様細胞・粘液を添加した群（+群）と無添加群（-群）に分け凍結し、マウス胚は、ウシ卵管の上皮様細胞・粘液を添加した群（+群）と無添加（-群）に分け凍結した。融解後、ウシIVF胚は卵丘細胞と共培養して48時間以内に胚盤胞に発育した胚を生存胚とした。マウス胚は48時間以内に胚盤胞に発育した胚を生存胚とし、72時間後のシャーレへの接着率も併せて検討した。1. ウシIVF胚の生存率は、+群71.6% (58/81) で、-群56.3% (40/71) に比較して高値を示した。2. マウス胚の生存率は、-25Cの+群は93.3% (42/45) で、-群の68.8% (28/41) に比較して有意に高値を示した。接着率は+群が有意に高値を示した。

ABSTRACT

The effects of cells and mucus on cryoprotection of embryos were studied. In bovine embryos, bovine endometrial epithelial cells and mucus were used for cryoprotector, and in mouse embryos, bovine tubal epithelial cells and mucus were used, respectively. A significant differences were found between additional and non-additional groups in the ability to protect the cell damages and promote the development of the embryos into blastocyst stage and attachment.

Key words : Cryoprotection, Mouse, Bovine, Cells effect, Mucus.

結 言

動物胚の凍結保存は、Whittingham¹⁾が1972年にマウス胚の凍結保存に成功して以来、遺伝子保存の主要な役割を果たしてきた。その後凍結方法の改良改善は主に凍結保護剤や凍結時の温度下降のプログラミングに重きが置かれてきたと言っても過言ではない。一方、凍結時に凍結保護剤以外のものを加える工夫はWilladsen²⁾らが羊胚を寒天に包み凍結保存に成功しているが、その後、同様の研究はほとんどないのが現状である。今回我々はウシ体外成熟、体外受精由来胚(ウシIVF胚)およびマウス体内受精由来胚(マウス胚)に細胞成分や、粘液を添加し凍結保存を行い、その後胚を融解し、細胞・粘液添加が胚の生存性に与える影響について検討したので報告する。

試 験 方 法

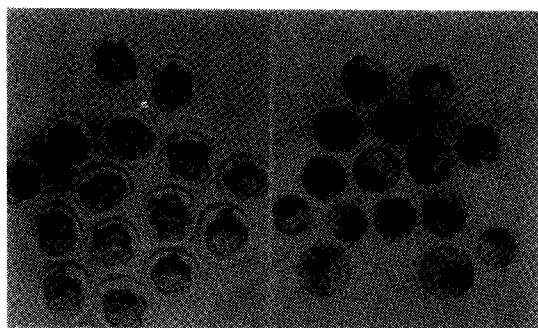
ウシ体外成熟体外受精由来胚(ウシIVF胚)作成

ウシ未成熟卵胞内卵子の採取は、食肉処理場と殺された雌ウシの卵巣の小卵胞から、注射器で吸引採取する吸引法によって行った。回収した卵子のうち卵丘細胞が卵子の周囲に緊密に付着し、細胞質が形態的に均一と思われるものを選んで体外成熟培養に供した。成熟培養液は25mM HEPES緩衝Earle's-TCM199(GIBCO)に非働化子牛血清(GIBCO)を5%、ストレプトマイシン100 μ g/ml、ペニシリン100IU/mlを加えた。培養液を流動パラフィン(アミノ酸自動分析用、半井化学)下の100 μ lの小滴にし、20個ずつの卵子を入れ39 $^{\circ}$ C、5%CO₂、95%空気の気相下で約20時間培養した。精子は黒毛和種の凍結融解精子を用い、10mMカフェイン(Sigma)添加BO液で2回遠心(500xg、5分)後、精子濃度を2.5x10⁷/mlに調整した。20mg/mlのウシ血清アルブミン(Sigma)を含むBO液で等量希釈後、100 μ lの小滴にし媒精に供した。媒精は成熟培養約20時間後に、卵子を20個ずつ精子の入った培地に入れ、媒精時間は5時間とした。発生培地はTCM 199

に子牛血清を5%加えた。媒精約48時間後に受精卵を卵丘細胞より遊離させ卵割状況の観察を行った。この時点で卵丘細胞はシャーレの底面で単層を形成しており、遊離した受精卵をこの単層上で培養を継続した。その後1日2回観察を行い、受精(0日)後7-9日の間に発育する胚盤胞期胚を凍結に使用した(写真1)。

マウス体内受精胚(マウス胚)採取

マウス胚はddy系雌に過剰排卵処置後3日に回収した桑実胚を凍結に使用した(写真1)。



Mouse Morula (Day 3) Bovine Blastocyst (Day 7)
(x 100)

写真1 使用した胚

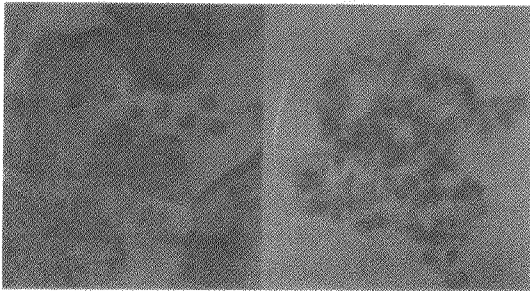
子宮内膜細胞、卵管上皮内皮、粘液採取、凍結方法

ウシIVF胚凍結時に使用した内膜上皮様細胞、粘液は生体から胚回収した灌流液に含まれていたものを用いた。マウス胚凍結時にはと殺された雌ウシの卵管より得た上皮様細胞、粘液を使用した(写真2)。細胞、粘液添加群を(+)群、無添加群を(-)群とした。

ウシIVF胚凍結時には凍結保護剤として10%(V/V) Glycerolを用い、マウス胚凍結時には10%(V/V) 1, 2-propanediolを使用した。それぞれの凍結時のプログラムは図1に示した。

凍結融解後、ウシIVF胚は卵丘細胞と共に培養し48時間以内に胞胚腔を回復し拡張胚盤胞期以上に発育したものを生存胚と判定した(写真3)。

MOUSE BOVINE



Morula + ov. epithel & mucus Blastocyst + ut. epithel & mucus (x40)

写真2 細胞、粘液添加の実際

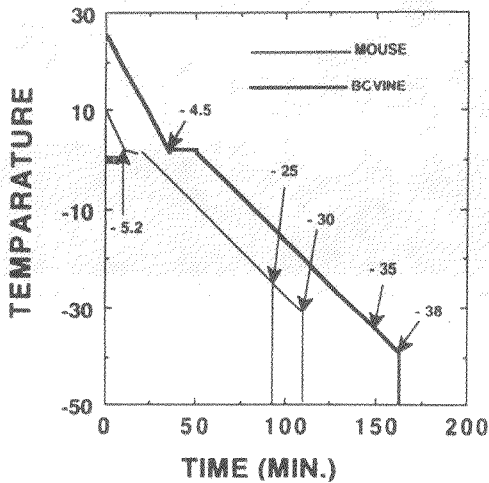
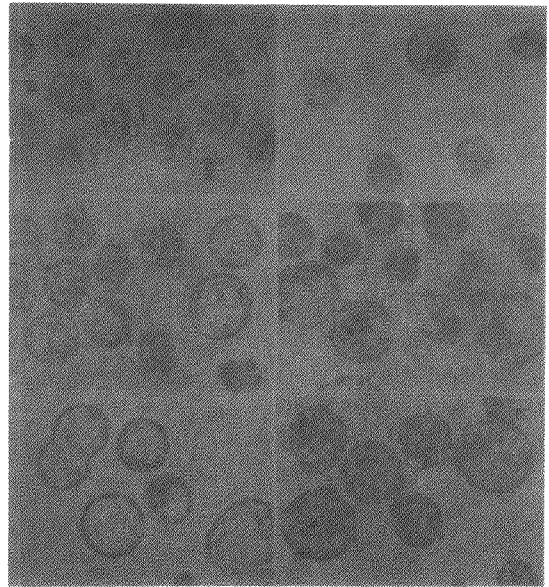


図1 凍結プログラムの実際

方、マウス胚は48時間以内に胚盤胞に発育したものを生存胚と判定した。また、72時間後にシャーレ底面に接着した胞胚から接着率を算出し比較検討した(写真4)。

結 果

ウシIVF胚の生存率を表1に示した。細胞、粘液添加群(+群)は71.6%(58/81)の生存率を示したの比べ、無添加(-群、56.3%、40/71)のものは低値を示した。また、胚盤胞の発生日ごとの生存率を表2に示した。7-9日のいずれにおいても、添加群で生存率、脱出胚盤胞率共に無



MOUSE BOVINE (x100)

写真3 凍結融解後の形態変化

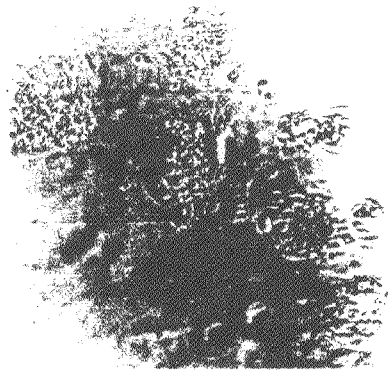


写真4 脱出、接着した胚盤胞(マウス、×100)

表1 ウシIVF胚盤胞の凍結融解後の生存性

細胞添加	胚盤胞数	脱出胚盤胞
添加	58/81(71.6%)	33/81(40.7%)
無添加	40/71(56.3%)	23/71(32.4%)

添加群に比べて高値を示した。

マウス胚の生存率を図2、3に示した。液体窒素素に投入する温度が25℃の場合+群が-群に比較して有意 ($p < 0.01$) に高値を示した。一方、-30℃では有意な差が認められなかった。

胞胚の接着率は細胞粘液添加群が無添加に比べて有意 ($p < 0.01$) に高値を示した (図3)。

表2 発生日胚盤胞の凍結融解に与える細胞成分添加の影響

	Day7	Day8	Day9
(-)胚盤胞	21	39	11
生存胚	16(76.2%)	25(59.0%)	1(9.1%)
脱出胚盤胞	9(42.9%)	14(35.9%)	0
(+)胚盤胞	19	49	13
生存胚	17(89.5%)	37(75.5%)	4(30.8%)
脱出胚盤胞	12(63.2%)	20(40.8%)	1(7.7%)

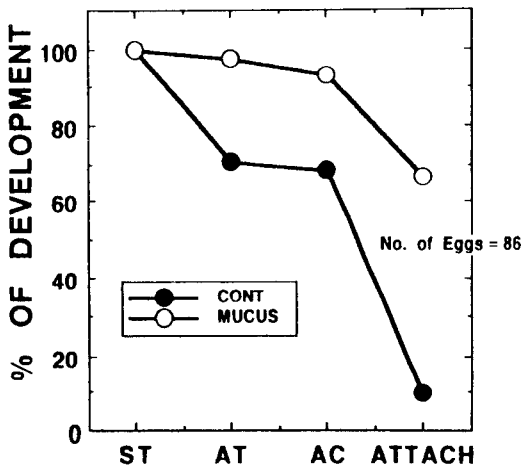


図2 マウス胚に対する細胞粘液添加の効果 (-25℃)

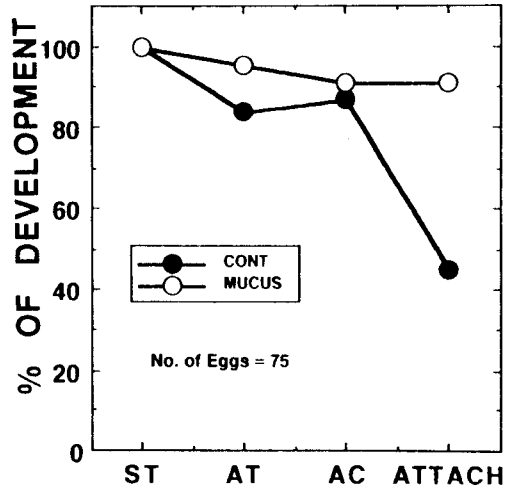


図3 マウス胚に対する細胞粘液添加の効果 (30℃)

考 察

今回我々は哺乳類初期胚凍結時に上皮様細胞や粘液を加えることによって、凍結融解後の胚の生存性が向上し、その後の胚発育も正常に観察されることを見いだした。従来細胞凍結時に凍結保護剤として glycerol や propanediol が使用され、細胞の凍結融解時の生存率の向上が計られてきた。凍結保護剤の選択は種の違いや凍結時の細胞の状態によって経験的に決定されておりその論理的基盤はあまり明確なものではない。

今回我々が使用した細胞成分や粘液成分の凍結操作への添加は

- 1) 凍結時の温度変化からの保護
- 2) 植氷時の温度および体積変化からの保護
- 3) 凍結保存時の様々な環境変化からの保護
- 4) 融解時の温度変化からの保護

等の効果があるものと思われる。生殖生理学における細胞凍結は一般的に未成熟卵子や受精した初期胚をその材料として用いることが多い。したがって通常の細胞凍結と異なり扱う細胞数が少ないことが多く、かつ大きい細胞を扱うことが多くなる。したがって凍結融解時の温度変化や、植氷時の体

積変化、従来の凍結保護剤が与える細胞障害効果は直接取り扱う少数の胚に作用することになる。今回の試みは細胞や粘液の高い粘液成分を胚に添加することによってこれらの障害をより緩慢にすることを目的とした。通常の細胞凍結には異種細胞を加えて凍結と、凍結融解後に目的の細胞を分離精製することが困難になるが、初期胚はその大きさから分離が容易である。

細胞成分や粘液成分は胚採取等で容易に採取できるものであり、また、本来胚とほぼ同等の環境下に存在したものであり、胚の発育上にとっても好都合のものであると思われる。細胞成分や粘液成分を使用した凍結融解した初期胚がシャーレ上に着床したことは、これらの効果が単に解凍融解以外にも存在することを示しているものと思われる。

現在これらの細胞成分や粘液成分の成分検討を行っており、細胞成分、粘液成分の量等の決定を行っている。また、現在までに樹立された培養細胞株を使用することが可能になればさらに定量的な成分添加の比較検討が可能になるものと考えられる。

引用文献

- 1) Whittingham, D.G. et al. : Science, 27 : 411, 1972
- 2) Willadsen, S.M. et al. : Nature, 277 : 288, 1979