

## ウシガラス化保存時のストロー内希釈液の種類と胚の生存性

田中 健・谷村英俊・笹木教隆

### Investigation of The Dilution in a Straw of Vitrified Bovine Embryos

Ken TANAKA , Hidetoshi TANIMURA and Kiyotaka SASAKI

#### 要 約

ウシガラス化保存胚の直接移植技術を確立するため、胚やガラス化溶液とともにストロー一充填する2種類の希釈液について生存性を比較するとともに胚の融解から移植までの希釈放置時間と生存性について検討した。その結果3%Glycerol・0.5M Sucrose(Gly)希釈液は5%Ethylene Glycol・0.15M Sucrose(EGS)希釈液に比べ生存性が良く、脱出胚盤胞の発生率が高かった( $P<0.01$ )。また、希釈放置時間による生存性は Gly 希釈液の最も短い4分の生存率が良く、脱出胚盤胞の発生率が高くなっていた( $P<0.05$ )。

これらのことから、ウシガラス化保存胚を直接移植するには、ストロー内希釈液 EGS 液よりも Gly 液を用いた方が、受胎率向上への可能性が示唆された。

#### I 緒 言

胚のガラス化保存法は、凍結機器を使用せず、冷却時の細胞内外における氷晶形成を抑制し物理的障害を回避することのできる有効な技術として注目され普及してきている。しかし、従来の緩慢凍結法よりも短時間で保存するために高濃度のガラス化溶液が使用されており、胚へのダメージが強いなど、直接移植はまだ改善の余地が残されている。

その中でも、胚の加温後、ストロー内でガラス化溶液を速やかに希釈するストロー内希釈液(希釈液)については、統一されておらず、生存性の高い希釈液ができれば、直接移植技術の普及がより一層図られると考えられる。

そこで、これまでに報告されている2種類の希釈液と生存性を比較するとともに胚の融解から移植までの希釈放置時間と生存性についても検討した。

#### II 材料および方法

##### 1 供試胚の作成

食肉センター由来の未受精卵子を採取し、20～22時間5%FCS加TCM199培地で成熟培養後、成熟卵子をIVF100培地で洗浄した。精子の洗浄にはPercoll分離法を用いた<sup>1)</sup>。

体外受精は、IVF100培地を用いて5～6時間の受精を行った。受精した卵子は5%FCS加CR1aa培地で裸化洗浄後培養した。

体外受精後6日目に0.1Mβ-ME+20%FCS TCM199培地で洗浄し培養した。供試胚には、体外受精後7～8日目の胚盤胞から拡張胚盤胞期胚、または、胚の一部を金属プレートで切断し0.1Mβ-ME+20%FCS TCM199培地で4時間培養後生存した胚(切断胚)を用いた。

## 2 ガラス化溶液の種類

ガラス化溶液は石森ら<sup>2)</sup>の VSED 液を用いた。希釈液は小田ら<sup>3)</sup>の 3%Glycerol と 0.5M Sucrose を混合した溶液 (以下「Gly」と略す) および小田ら<sup>4)</sup>の 5%Ethylene Glycol と 0.15M Sucrose を混合した溶液(以下「EGS」と略す)を用いた。

## 3 ストロウの作成

ストロウの作成は直接移植を目的として、希釈液、ガラス化溶液、胚の入ったガラス化溶液および希釈液の順にストロウへ充填した (図 1)。

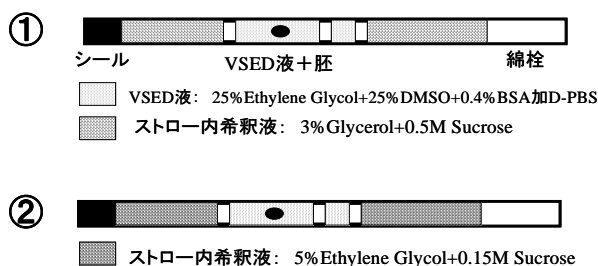


図1 直接移植用のストロウ内カラム

## 4 ガラス化保存

保存は、50%VSED 液で 1 分間平衡した後、30 秒以内に胚を含む VSED 液と希釈液をストロウ内に充填し、ストロウを液体窒素ガス中にて 2 分間静置した後、液体窒素内に投入して行った。

## 5 加温・融解

保存胚は 20℃微温湯中で加温し、希釈液層の融解を確認後シールした部分をもって振り、希釈液と混合してシャーレ内に全量を取り出した。試験で設定した時間が経過した後、0.1M β-ME +20%FCS TCM199 にて 3 日間培養した。

## 6 培養条件

培養はすべて 38.5℃、5%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>、90%air、100%湿度飽和の条件下で行った。

## 7 試験方法

### (1) 試験 1 : 移植時間を 4 分と設定した場合の希釈液別生存性

加温後、シャーレに全量取り出してから培養液へ投入するまでの時間 (以下「希釈放置時間」とする) を、現場で移植器へのストロウ装填か

らウシに直接移植するまでの時間を 4 分と設定し、4 分後に培養液へ投入し生存性を比較した。

表 1-2 希釈液の違いによる保存胚の生存性(発育ステージ別)

加温した胚の 発育ステージ	希釈液	加温胚数	生存胚数		脱出胚盤胞数 (%)
			24hr(%)	48hr(%)	
胚盤胞	Gly	56	51 (91.1)	48 (85.7)	46 (82.1) <sup>a</sup>
	EG	43	40 (93.0)	34 (79.1)	24 (55.8) <sup>b</sup>
：希 積 液	Gly	46	40(87.0)	36(78.3)	31(67.4) <sup>c</sup>
	EG	61	49(80.3)	42(68.9)	28(45.9) <sup>d</sup>

a-b c-d : 同一項目内の異符号間に有意差あり (a-b:p<0.01 c-d:p<0.05)

### 混合後の放置時間別生存性

移植時間が延長した場合のガラス化溶液の影響をみるため、希釈放置時間を 4,10,15,20 分として生存性を比較した。

## 7 統計処理

データの統計処理は  $\chi^2$  検定で行った。

## III 結 果

### 1 試験 1 : 移植時間を 4 分と設定した場合の希釈液別生存性

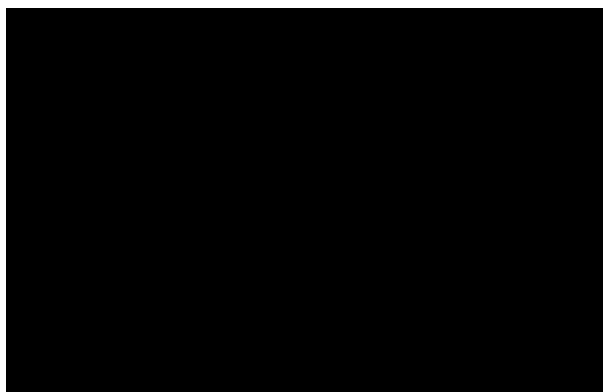
Gly 希釈液の 24 時間後の生存率、脱出胚盤胞の発生率はそれぞれ 84.1%、67.5%であり、EGS 希釈液では同じくそれぞれ 81.3%、46.7%であった。EGS 希釈液は Gly 希釈液に比べ脱出胚盤胞の発生率が低かった (P<0.01) (表 1-1)。

表 1-1 希釈液の違いによる保存胚の生存性

希釈液	加温胚数	生存胚数		脱出胚盤胞数 (%)
		24hr(%)	48hr(%)	
Gly	126	106(84.1)	98(77.8)	85(67.5) <sup>a</sup>
EG	107	87(81.3)	73(68.2)	50(46.7) <sup>b</sup>

a-b : 同一項目内の異符号間に有意差あり (a-b:p<0.01)

発育ステージ別の生存性を比較したところ、胚盤胞および拡張胚盤胞期胚とも、Gly 希釈液の脱出胚盤胞の発生率が高く、特に胚盤胞期胚では 82.1%と高率であった (表 1-2)。切断胚ではどちらのステージにおいても 24,48 時間後の生存率に差はみられなかった (表 2)。



2 試験 2：希釈液混合後の放置時間別生存性

Gly 希釈液では希釈放置時間 10 分以上において生存率に差はみられなかった。しかし、4 分では他時間に比べ、脱出胚盤胞の発生率が高かった (P<0.05) (表 3)。

EGS 希釈液では希釈放置時間と生存率や脱出胚盤胞の発生率に差はみられなかった。

表3 希釈液混合後の放置時間と生存性

希釈液	混合放置時間(分)	加温胚数	生存胚数		脱出胚盤胞数 (%)
			24hr(%)	48hr(%)	
Gly	4	102	91(89.2) <sup>a</sup>	84(82.4) <sup>c</sup>	77(75.5) <sup>f</sup>
	10	21	16(76.2)	13(61.9) <sup>d</sup>	9(42.9) <sup>g</sup>
	15	12	8(66.7) <sup>b</sup>	7(58.3) <sup>e</sup>	7(58.3) <sup>h</sup>
	20	8	6(75.0)	6(75.0)	4(50.0) <sup>i</sup>
EG	4	104	89(85.6)	76(73.1)	52(50.0)
	10	61	48(78.7)	45(73.8)	38(62.3)
	15	49	39(79.6)	38(77.6)	21(42.9)
	20	27	23(85.2)	21(77.8)	15(55.6)

a-b,c-d,c-e,f-g-h-i:同一項目内の異符号間に有意差あり(a-b,c-d,c-e,f-g-h-i:p<0.05)

IV 考 察

ガラス化保存法は、凍結機器が不用で開業獣医師の間で、農家の庭先で採胚から胚の保存ができる有効な方法として現場で普及してきている。しかし、保存には高濃度のガラス化溶液を用いるため、緩慢凍結保存のような直接移植法が確立されておらず、直接移植法の生存性が高くなればより一層の普及が図られるものと考えられる。

そこで今回、小田ら<sup>3) 4)</sup>が報告した2種類の

ストロー内希釈液を用いて生存性を比較した。直接移植を4分と設定した時の24・48時間後の生存率に差は認められなかったが、Gly希釈液はEGS希釈液に比べ良い傾向がみられ、脱出胚盤胞の発生率は高くなった。また、发育ステージ別にみても同様な結果が得られた。

このことから、いずれの希釈液でも生存性には差がないものの、脱出胚盤胞の発生率の高いGly希釈液が、直接移植用のストロー内希釈液として有効と考えられた。

小田ら<sup>3) 4)</sup>はバイオプシーした生体保存胚においていずれの希釈液でも1~5時間培養では生存率に差がなく、发育ステージが進むにつれて受胎率が高いことを報告している。今回のintact胚では胚盤胞よりも拡張胚盤胞は生存率や脱出胚盤胞の発生率が悪くなったが、切断胚では小田らに一致して胚盤胞よりも拡張胚盤胞の生存率が良くなった。

また、小淵ら<sup>5)</sup>は低ランクの胚盤胞や拡張胚盤胞の透明帯を一部切除することで凍結保存後の生存性が高まると報告している。今回の保存前に切断した胚は透明帯を外された状態で保存されることが拡張胚盤胞の生存性を良くした可能性も考えられる。また、保地<sup>6)</sup>は体外受精胚の培養にリノール酸アルブミンを加えることにより耐凍性が高まることを報告している。

今回の試験においても、拡張胚盤胞の生存性を良くするために、培養液への添加物が必要なかもしれない。今後さらに、希釈液の濃度や脂肪酸などの添加等を検討していく必要があると思われる。

直接移植法では、加温から移植終了までの時間が長くなった場合の受胎率の低下が懸念される。加温後の混合希釈放置時間を4,10,15,20分として生存性を比較したところ、Gly希釈液では生存率には差が認められなかったが、4分が最も良く、脱出胚盤胞の発生率が高くなった。このことから、Gly希釈液を用いた直接移植では、加温後、速やかに移植した方が、生存率が高くなると考えられる。EGS希釈液ではどの混合放置時間でも生存率や脱出胚盤胞の発生率に差がみとめられないことから、放置時間が20分以内であれば生存性に影響が無いと考えられた。

Ethylene Glycolの緩慢凍結保存の直接移植では、融解後30分以内では胚の生存率の有意な

低下はなく<sup>7)</sup>、融解後 15 分以内に移植を終えれば受胎率の低下はみられない<sup>8)</sup>。また、凍結前の平衡時間が 60 分以内であれば生存性に影響がない<sup>9)</sup> など Ethylene Glycol は胚の生存性に影響がないとの報告がある。

本試験では、ESG 希釈液による生存性には影響しなかったが Gly 希釈液では 4 分での生存性が良い傾向が認められた。さらに例数を重ねて検討していきたい。

これらのことから、ウシガラス化保存胚を直接移植するには、ストロー内希釈液に ESG よりも Gly を用いた方が、受胎率向上への可能性が示唆された。

## 参考文献

- 1) 塩谷康生.体外受精(媒精)家畜人工授精講義キスト(家畜体外受精卵移植編),3版:96-107.2001.
- 2) H.Ishimori *et al.* VITRIFICATION OF BOVINE EMBRYOS. THERIOGENOLOGY,37 : 228.1992
- 3) 小田頼政ら.雌雄判別ガラス化保存ウシ胚のストロー内希釈の検討.岡山県総合畜産センター研究報告,15:28~33.2004.
- 4) 小田頼政ら.バイオプシーしたウシ性判別胚のストロー内ガラス化保存における希釈法の簡便化.日本胚移植学会誌,27-2:65~70.2005.
- 5) 小淵裕子ら.透明帯を切開したダイレクト凍結胚の野外移植.東日本家畜受精卵移植技術研究会報,20:50~51.2004.
- 6) 保地眞一.リノール酸アルブミンによる体外受精由来ウシ胚の耐凍性増強効果.日本胚移植学会誌,21:101~105.1999.
- 7) 中側邦昭ら.Ethylene Glycol を耐凍剤としたウシ胚の Direct Transfer 法.新潟県畜産試験場研究報告,11:27~31.1995.
- 8) 堂地修ら.ウシ凍結胚の直接移植法.日本移植学会誌,22- 1 :28~34.
- 9) 的場里理子ら.凍結媒液への平衡時間がウシ IVP 胚の凍結融解後の生存性に及ぼす影響.東日本家畜受精卵移植技術研究会報,22:52~53.2006.

## Investigation of The Dilution in a Straw of Vitrified Bovine Embryos

Ken TANAKA, Hidetoshi TANIMURA and Kiyotaka SASAKI

We attempted to develop the good method to dilute vitrification medium with 3% glycerol and 0.5M sucrose (Gly) or 5% ethylene glycol and 0.15M sucrose (EGS) after vitrification and warming of bovine embryos derived from IVF. We first examined the influence of in-straw dilution of the vitrified embryos on the survival and hatched blastocyst rates.

As the results, survival and hatched blastocyst rates in-straw dilution of Gly were 84.1% (106/126) after 24h culture of in vitro and 67.5% (85/126), respectively, while those of EGS were 81.3% (87/107) and 46.7% (50/107), respectively. There was no significant difference in the survival rate between the two dilution methods. But the hatched blastocyst rates in-straw dilution of Gly were significantly higher ( $p < 0.01$ ) than those of EGS. In sensitization experiment after mixing in-straw dilution of Gly or EGS, survival rates were no significant difference before sensitization for 20 minutes.

But only, the hatched blastocyst rates in sensitization after mixing in-straw dilution of Gly were 77.5% (77/102), 42.9% (9/21), 58.3% (7/12) and 50.0% (4/8) respectively after 4, 10, 15 and 20 minutes, showing a significant high ( $P < 0.05$ ) after sensitization for 4 minutes.