

ウシガラス化保存胚のストロー内希釈液濃度と生存性の関係

田中 健・竹内隆泰・笹木教隆

Relationship between Survivability and Concentration of sucrose into in-straw rehydration of Vitrified Bovine Embryos

Ken TANAKA, Takayasu TAKEUTI and Kiyotaka SASAKI

要 約

ガラス化保存胚の直接移植技術を確立するため、加温融解（加温）後ストロー内で保存液を希釈するストロー内希釈液（希釈液）の組成や濃度を解明する。平成19年度は、2種類の希釈液を比較し Glycerol (Gly) + Sucrose 液は Ethylene Glycol (EG) + Sucrose 液よりも生存率や透明帯脱出率が高くなった。そこで今回は、Gly 液中の Sucrose (Suc) 濃度と生存性の関係について検討した。その結果、保存胚の加温後の生存率は、Suc 濃度 0.25M は 0.15M や 0.5M に比べ、24 および 48 時間後の生存率が高く、透明帯脱出率も高くなった。また、ステージ別でみると、胚盤胞期では Suc 濃度別の生存率に差はみられないが、拡張胚盤胞期では 0.25MSuc で 24 および 48 時間後の生存率や透明帯脱出率が高くなった。直接移植には 3%Gly 液に 0.25M Suc を添加した希釈液が有効と推察された。

I 緒 言

胚のガラス化保存は、緩慢凍結法に比べ耐凍剤の濃度が濃いため、冷却時に細胞内外に氷晶形成が起こりにくい利点がある。しかし、加温時は、胚細胞内に多量の水が流れ込むため細胞崩壊が起こりやすい欠点がある。そのため、保存胚の加温は耐凍剤を段階的に希釈する必要があり、直接移植はまだ改善の余地が残されている。そこで、冷却時に胚や耐凍剤とともに充填される希釈液の組成や濃度について検討した。前回は、2種類の希釈液を比較し Gly 液は EG 液よりも生存率や透明帯脱出率が高いことを報告した¹⁾。今回は、細胞膜表面で加温融解時に細胞内への水分の流れ込みに影響する Gly 液中の Suc 濃度と生存性の関係について検討を行った。

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²⁾。

体外受精は、機能ペプチド研プロトコールのとおり、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。供試胚は体外受精後7～8日目の胚盤胞から拡張胚盤胞期胚を用いた。

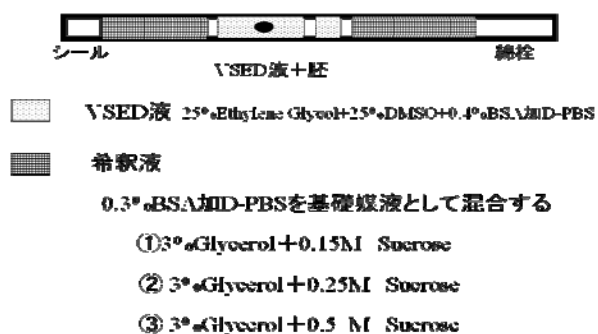
2 ガラス化溶液の種類

ガラス化溶液は石森ら³⁾のVSED液とした。

希釈液は 0.3%BSA 添加 D-PBS に 3%Glycerol を加え基礎媒液とし、①0.15M ②0.25M ③ 0.5MSuc を混合した 3 種類の溶液を作成した。

3 ストローの作成

ストロー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そして希釈液の順にストローへ充填した(図 1)。胚はストロー 1 本に 1 個として、同一濃度の希釈液を充填してそれぞれ 3 種類のストローを作成した。



図一 直接移植用ストロー充填方法

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ーに充填し、ストロー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°C 微温湯中で加温し、希釈液層の融解を確認後、シールした側を持って振り下し、各溶液を混合後、シャーレ内に全量を取り出した。現場で移植器へのストロー装填からウシに直接移植するまでの時間を 4 分と仮定し、シャーレに取り出して 4 分後に、0.1M β -ME + 20%FCS TCM199 培養液で洗浄後 3 日間培養した。

6 培養条件

培養はすべて 38.5°C、5%CO₂、5%O₂、90%air、100%湿度飽和の条件下で行った。

7 試験方法

希釈液の Suc 濃度と生存性を調べるため、培

養開始から 24,48 時間後に生存した胚数や透明帯脱出数を実体顕微鏡で観察した。

8 統計処理

データの統計処理は χ^2 検定により行った。

III 結果

1 希釈液の Suc 濃度と生存性

0.25M Suc の生存率は、24 時間培養で 76.1%、48 時間培養で 63.2%、透明帯脱出率は 52.1% であった。0.25M Suc では、88.9%、85.7%、73.0%、0.5M Suc は、78.9%、63.4%、45.1% であった。0.25M Suc の 48 時間培養の生存率や透明帯脱出率が高かった(表 1)。

表1 ストロー内希釈液濃度と生存性

ストロー内希釈液 Sucrose濃度(M)	加温胚数	生存胚数		透明帯脱出胚数 (%)
		24hr (%)	48hr (%)	
0.15	117	89(76.1) ^b	74(63.2) ^B	61(52.1) ^D
0.25	63	56(88.9) ^a	54(85.7) ^A	46(73.0) ^C
0.5	71	56(78.9)	45(63.4) ^B	32(45.1) ^D

同一項目内の異符号間に有意差あり(a-b:p<0.05, A-B-C-D:p<0.01) χ^2 検定

2 ステージ別にみた希釈液の Suc 濃度と生存性

胚盤期胚では Suc 濃度別の生存率に差はみられなかったが、拡張胚盤胞期では 0.25M Suc で 24、48 時間後の生存率や透明帯脱出率が高かった(表 2)。

表2 発育ステージ別のストロー内希釈液濃度と生存性

ステージ	ストロー内希釈液 Sucrose濃度(M)	加温胚数	生存胚数		透明帯脱出胚数 (%)
			24hr (%)	48hr (%)	
胚盤胞	0.15	48	36 (75.0)	33 (68.8)	24 (50.0)
	0.25	19	15 (78.9)	14 (73.7)	9(47.4)
	0.5	30	24 (80.0)	22 (73.3)	13(43.3)
拡張 胚盤胞	0.15	69	53 (76.8) ^a	41 (59.4) ^B	37 (53.6) ^D
	0.25	44	41 (93.2) ^b	40 (90.9) ^A	37 (84.1) ^C
	0.5	41	32 (78.0)	23 (56.1) ^B	19 (46.3) ^D

同一項目内の異符号間に有意差あり(a-b:p<0.05, A-B-C-D:p<0.01) χ^2 検定

IV 考 察

ガラス化保存は、加温時に細胞内に多量の水分が流れ込む希釈性ショックを受けやすいため農家の庭先で保存胚を直接移植するには問題がある。また、緩慢凍結法のような直接移植技術が確立されておらず、改善の余地があり、生存性の高いものができればより一層の普及が図られる。

今回、細胞膜表面で水分調整の作用がある内希釈液中の Suc 濃度と生存性の関係について検討した。ガラス化保存に関する Suc の必要性について、斉藤ら⁴⁾はガラス化液に Suc を添加することで、ガラス化液の浸透圧を高めてガラス化しやすく、細胞膜を保護する効果があると報告している。また、森ら⁵⁾は未成熟卵子では 40%EG と組み合わせる Suc 濃度は 1 M よりも 0.67M の方が受精後の発生が良いことや胚細胞のステージによって耐凍剤と希釈液との適切な組成や濃度の組み合わせが存在すると報告している。

今回の成績からも希釈液に Suc を添加したことが生存率や透明帯脱出率に影響を与えたものと考えられる。ガラス化液に VSED 液を用いた場合、小田ら⁶⁾は直接移植用の希釈液として 3%Gly 液中に 0.5MSuc を、秋山ら⁷⁾は 5%EG 液中に 0.5MSuc を、小林ら⁸⁾は 0.1% Polyethen-glycol 液中に 0.3MSuc を混合したものを用いて加温後の生存率や受胎率の向上を報告している。

今回の成績では 3%Gly 液に 0.15M や 0.5MSuc よりも 0.25MSuc の方が生存率や透明帯脱出率が高い成績が得られた。今後は、移植による実証試験を行い、受胎状況を調査して現場での応用を調査する必要がある。

参考文献

1)田中健ら. 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. 福井県畜産試験場研究報告, 21 : 11-15, 2008

- 2)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),3:96-107, 2001.
- 3)H.Ishimori *et al.* VITRIFICATION OF BOVINE EMBRYOS. *Theriogenology*.37.228.1992
- 4)齋藤美英ら. 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 年度静岡畜産試験場年報 5~8. 1998
- 5)森美幸ら. 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ークロース濃度およびフィルターを支持体とした保存方法. 福岡県農業総合試験場研究報告 24 : 73-74. 2005
- 6)小田頼政ら. イオプシーしたウシ性別別胚のストロー内ガラス化保存における希釈液の簡便化. 日本胚移植学会誌. 27-2 : 65-70. 2004
- 7)秋山清ら. 牛の雌雄産み分け技術の実用化試験. 関東東海北陸農業研究成果情報. 2006
- 8)小林章二ら. Open pulled straw および Standard straw を用いてガラス化保存したマウス胚の生存率比較. 愛知農業総合試験場研究報告. 31 : 225-232. 1999

Relationship between Survivability and Concentration of sucrose into in-straw rehydration of Vitrified Bovine Embryos

Ken TANAKA ,Takayasu TAKEUTI and Kiyotaka SASAKI

Comparative after vitrification and warming experiments with the effect of the concentration of sucrose (0.15M,0.25M,0.5M) into in-straw rehydration were performed on 7 or 8 days bovine embryos derived from IVF. We examined the influence of in-straw dilution the vitrified embryos on the survival and hatched blastocyst rates.

As the results,survival and hatched blastocyst rates in-straw dilution of 0.25M sucrose was 85.7%(54/63) after 48h culture of in vitro and 73.0%(46/63),respectively, while those of 0.15M or 0.5M sucrose were 63.2%(74/117), 63.4%(45/71) and 52.1%(61/117), 45.1%(32/71) respectively. The survival and hatched blastocyst rates in-straw dilution of 0.25M sucrose was significantly highest ($p < 0.01$) than those of 0.15M or 0.5M sucrose .

Looking for developmental stage. There was no significant difference on blastocyst between the three concentration of sucrose methods. But the survival and hatched blastocyst rates in-straw dilution of 0.25M sucrose on expanded blastocyst was significantly higher ($p < 0.01$) than those of sucrose .

These results suggest for direct transfer method that it is possible to dilute the vitrification medium with in-straw dilution of 0.25M sucrose was most conception rates than those concentration of sucrose .