

ドライタイプ ET フリーザーを用いた胚凍結における エチレングリコールの濃度とシュクロースの添加および 冷却速度の違いが生存率と孵化率に及ぼす影響

小林崇之・竹内隆泰・近藤守人

The survival rate and a hatching rate of in vitro bovine embryos frozen by in the presence of ethyleneglycol, addition of the sucrose and the cooling rate in dry type ET freezer.

Takayuki KOBAYASHI, Takayasu TAKEUCHI and Morito KONDO

要 約

ドライタイプ ET フリーザーを用いた場合の効率的な凍結方法を探るため、エチレングリコールの濃度、シュクロース添加の有無および冷却速度の違いが融解後の胚の生存性に与える影響を牛体外受精胚を用いて比較検討した。その結果、1.5M (EG) および 1.5M (EG)、また冷却速度 0.3°C/分および 0.6°C/分では生存性に差はなかったが、シュクロースの添加は孵化率を有意に向上させることが認められた。また、冷却速度 0.6°C/分は、生存率、孵化率に影響を及ぼすことなく、約 35 分処理時間の短縮が図られた。

I 緒 言

従来、牛胚の凍結には、アルコールタイプの凍結機が用いられてきた。しかし最近ペルチェ素子を用いたドライタイプの凍結機が開発され⁹⁾、その取り扱いの利便性から利用が広がっている。そこで、ドライタイプの凍結機を用いた場合の効率的な凍結方法を探るため、耐凍剤濃度、糖添加および冷却速度の違いが胚の生存性に及ぼす影響を比較検討した。

II 材料および方法

1 供試胚

食肉センター由来の牛卵巣より未成熟卵子を

採取し、体外成熟培養、媒精を行い⁷⁾ その後 7～8 日目の胚盤胞期胚および拡張胚盤胞期胚で A, A', B, C, D の 5 段階評価で B ランク以上のものを用いた。

2 凍結方法

凍結は、20%子牛血清 (CS) 加 PBS を基礎溶液とし、耐凍剤としてエチレングリコール (EG) を用いた。EG の濃度の違い (1.5MEG, 1.8MEG)、糖 (0.1M シュクロース (Su)) 添加の有無および冷却速度の違い (0.3°C/分、0.6°C/分) により 5 区に分け凍結を行った (表 1)。

胚を凍結溶液に投入し、10～15 分間平衡した後ストローに封入した。胚を封入したストローは、あらかじめ -7°C に設定したドライタイプフリーザー (ペルチェ ET フリーザー、富士平工

業) に入れ2分後に植氷して10分保持した。その後-30℃まで冷却し、液体窒素中に投入して凍結保存した。

表1 試験区

区分	基礎溶液	耐凍剤	糖添加の有無	冷却速度
1	20%CS加PBS	1.8MEG	0.1MSu	-0.3℃/m
2	20%CS加PBS	1.8MEG	0.1MSu	-0.6℃/m
3	20%CS加PBS	1.8MEG	-*	-0.3℃/m
4	20%CS加PBS	1.8MEG	-*	-0.6℃/m
5	20%CS加PBS	1.5MEG	0.1MSu	-0.3℃/m

CS:子牛血清 EG:エチレングリコール Su:シュークロース
※-:添加無

3 融解および培養方法

ストローを液体窒素中から取り出し空气中に10秒保持後、30℃の温湯中で融解した^{1) 10)}。農家等で移植する時間を5分と仮定し、5分後に20%CS加TCM199+0.1Mβメルカプトエタノール培養液へ投入し5%CO₂、95%AIR、38.6℃の条件下のマルチガスインキュベーター(MCO-18M、三洋電機)で培養した。培養24時間後、48時間後に倒立顕微鏡で観察し、胚盤胞期胚から拡張胚盤胞へ発育した胚を生存、生存した胚が透明帯を脱出したものを孵化していると判定し、その結果を耐凍剤の濃度間、糖添加の有無および冷却速度の違いで比較を行い、最も効率的な凍結方法を検討した。

III 結果

耐凍剤の濃度の違いで融解後の生存率・孵化率に及ぼす影響を比較した結果、24時間後、48時間後の生存率・孵化率は、1.8MEG区が上回ったが有意な差は認められなかった。しかし、1.8MEG区が高い傾向にあったことから、1.8MEGを糖添加の有無および冷却速度の違いによる比較検討での耐凍剤とした(表2)。

糖添加の有無で比較したところ24時間後、48時間後の生存率では差は認められなかった。しかし、孵化率において糖添加区で24時間後24.2%、48時間後60.6%と糖無添加区に比べ有意に高い結果であった(表3)。

また、冷却速度の違いでは0.3℃/分と比べ

表2 エチレングリコール濃度別の凍結・融解後の培養成績

EG	n	24H後		48H後	
		生存数(%)	孵化数(%)	生存数(%)	孵化数(%)
1.8M	16	11 (68.8)	3 (18.8)	11 (68.8)	9 (56.3)
1.5M	17	11 (64.7)	3 (17.6)	10 (58.8)	8 (47.1)

表3 1.8MEチレングリコールにおける0.1Mシュークロース添加の有無による凍結・融解後の培養成績

糖添加	n	24H後		48H後	
		生存数(%)	孵化数(%)	生存数(%)	孵化数(%)
有	33	27 (81.8)	8 ^a (24.2)	27 (81.8)	20 ^a (60.6)
無	40	29 (72.5)	1 ^b (2.5)	28 (70.0)	9 ^b (22.5)

(異符号間:P<0.05)

表4 1.8MEチレングリコールにおける冷却速度の違いによる凍結・融解後の培養成績

冷却速度(℃/分)	n	24H後		48H後	
		生存数(%)	孵化数(%)	生存数(%)	孵化数(%)
0.3	36	25 (69.4)	3 (8.3)	25 (69.4)	11 (30.5)
0.6	37	31 (83.8)	6 (16.2)	30 (81.1)	17 (45.9)

表5 1.8MEチレングリコールにおける凍結・融解後の培養成績

区分	n	24H後		48H後	
		生存数(%)	孵化数(%)	生存数(%)	孵化数(%)
1	16	11(68.8)	3(18.8)	11(68.8)	9(56.3) ^{ab}
2	17	16(94.1)	5(29.4)	16(94.1)	11(64.7) ^a
3	20	14(70.0)	0(0.0)	14(70.0)	3(15.0) ^d
4	20	15(75.0)	1(5.0)	14(70.0)	6(30.0) ^{bcd}

(異符号間 :P<0.05)

0.6°C/分の方が24時間後、48時間後の生存率・孵化率ともに高い結果であったが有意な差は認められなかった(表4)。

各区別では、生存率・孵化率ともに試験2区が最も高かった(表5)。

IV 考 察

ドライタイプフリーザーを用いて効率的な凍結方法を検討した。その結果、糖を添加することによって孵化率が有意に向上することが認められた。大下ら¹⁾は、糖添加によって孵化率が向上すると報告しており、本試験も同様の結果であった。これは糖の細胞膜保護効果が凍結融解時の障害を緩和したことや、細胞膜非透過性という特性が脱水を促進させ、胚への凍結融解時の障害を緩和したためと考えられた^{2) 3) 8)}。

冷却速度0.3°C/分と0.6°C/分の違いを比較したところ24時間後、48時間後の生存率・孵化率ともに有意な差は認められなかった。S.Hochiら⁴⁾は、最も生存率が高かった冷却速度は0.3°C/分であったと報告している。冷却速度は、遅いと浸透圧障害、速いと細胞内での氷晶形成を起こすことが知られており、そのため細胞を破壊するといわれている。そのため0.3°C/分で冷却する緩慢凍結法が最も良いとされている^{5) 6)}。しかしドライタイプフリーザーを用いた結果では、0.6°C/分でも冷却時の細胞内氷晶形成による障害は少なく生存率、孵化率には影響を及ぼさないと考えられた。また冷却速度0.6°C/分での凍結は、処理時間が約35分程度短縮できると考えられた(図1)。

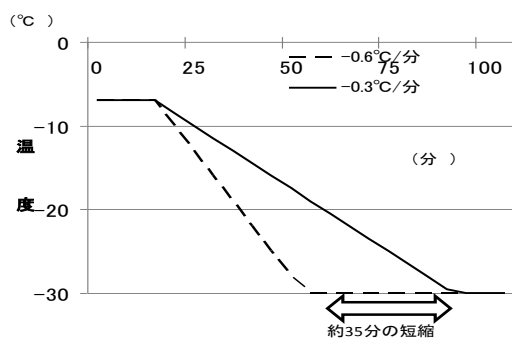


図1 冷却速度の違いによる処理時間の違い

以上のことから、ドライタイプフリーザーを用いた場合、1.8MのEGに0.1MのSuを添加した凍結溶液で、従来の倍の速度である0.6°C/分で凍結しても、生存率、孵化率の低下を引き起こすことなく処理時間を短縮することができ採卵凍結作業の効率化が図れる可能性が示唆された。

参考文献

- 1) 大下雄三ら, ウシ胚移植における受胎率向上のための凍結・融解方法の検討, 鳥取畜試研報, 32, 1-4, 2004.
- 2) 齋藤美央ら, 牛胚凍結保存液に用いる添加剤の細胞膜保護効果の推移, 静岡畜試研報, 24, 5-8, 1998.
- 3) 酒井昭, 凍結保存—動物・植物・微生物—, 15-2, 初版, 朝倉書店, 東京, 1987.
- 4) S.Hochi, Effect of cooling and warming rates during cryopreservation on survival of in vitro-produced bovine embryos, THERIOGENOLOGY, 46, 837-847, 1996.
- 5) 家畜改良事業団, 家畜人工授精講習会テキスト 88-100, 家畜改良事業団, 東京, 2010.
- 6) 中川邦昭, 実用化に向けた牛胚移植技術: 新潟畜試研報, 12, 3-6, 1998.
- 7) 谷村英俊ら, 野外で実施した優良牛生産のための経膈生体卵子吸引法の検討, 福井畜試研報, 20, 11-14, 2007.
- 8) 柿野淳ら, 牛受精卵移植技術の簡易化に関する研究(第4報), 秋田畜試研報, 11, 37-38, 1996.
- 9) 宮村元晴ら, ペルチエ素子を用いた凍結保存機器の開発, 第23回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会, 64-65, 2009.
- 10) 飛田府宣ら, 受胎率向上のための胚の凍結・融解方法に関する試験, 栃木酪試研報, 128, 3-9, 2005.

The survival rate and a hatching rate of in vitro bovine embryos frozen by in the presence of ethyleneglycol, addition of the sucrose and the cooling rate in dry type ET freezer.

Takayuki KOBAYASHI, Takayasu TAKEUCHI and Morito KONDO

The aim of this study is to examine the influence of ethyleneglycol concentration, sucrose addition and the difference of the cooling rate on survival of the bovine embryos after the thawing to decide the effective freeze method in the dry type ET freezer. As a result, it is realized that the sucrose addition improved a hatching rate significantly. In addition, cooling rate of $-0.6^{\circ}\text{C}/\text{m}$ is able to shorten processing time approximately for 35 minutes without having influences on a survival rate and a hatching rate of bovine embryos.