

マイクロドロプレット (MD) 法によりガラス化した牛体外受精由来胚のストロー内保存融解技術の検討

笠井 裕明, 福見 善之, 渡辺 裕恭, 立川 進

要 約

MD 法でガラス化した牛体外受精由来胚を人工授精用ストロー (0.5cc) 内に保存し, 農家の庭先で融解しストローからダイレクトに受胎牛の子宮へ移植することを目的にガラス化保存胚のストロー内での融解希釈方法について検討した結果, 希釈液に 20%FCS-PBS を用いたⅢ区が生存率 96.7%, 0.1MSuc-20%FCS-PBS のⅡ区が 89.6%, 0.3MSuc-20%FCS-PBS のⅠ区が 71.4%であった。MD法によりガラス化保存した体外受精胚は 0.5cc の人工授精用ストローに保存可能で, 20%FCS-PBS の希釈液とストロー内で混和し, ガラス化液を除去することで高い生存性を維持できることがわかった。

1 目 的

超急速ガラス化法で保存された牛初期胚の融解後の生存性は高く, また, 移植後の受胎率も高い^{1,2,3)}。ガラス化保存胚の簡易移植技術の開発を目的に, マイクロドロプレット (MD) 法によりガラス化保存した牛体外受精由来胚盤胞期胚のストロー内保存方法及びストロー内での希釈方法について検討し, 野外応用に向けて若干の知見を得たので報告する。

2 材料及び方法

(1) 体外受精胚の作出

体外受精は卵巣の表面に存在する直径 5mm 以下の卵胞より吸引採取した卵子を 10%FCS と FSH を添加した TCM199 で 22 時間培養し, 当場の常法に基づいて媒精を実施した。媒精後は 3mg/ml BSA 添加 CR1aa (5% CO₂-5% O₂-90% N₂) で 72 時間目まで培養し, 以降は 144 または 168 時間目に保存するまで IVD101 (5% CO₂-5% O₂-90% N₂) で培養し, 胚盤胞期～拡張期胚盤胞期胚 (Blast) を試験材料として用いた。

(2) ガラス化液除去方法の検討

ガラス化液に EFS40 を用い, 従来の受精卵移植

用ストロー (0.25cc) に Blast の牛体外受精由来胚を封入しガラス化保存させ, 融解希釈後ダイレクトにストローより受胎牛へ胚を移植する既存の簡易移植法について融解後の希釈液中での胚の保持時間と生存率を検討した。

胚のガラス化は山崎ら⁴⁾の方法を参考に実施し, 希釈液は 0.3MSuc-20%FCS-PBS または 20%FCS-PBS とし, 融解後はシャーレに胚を含むガラス化液と希釈液をストローから押しだし, 混和し, 0, 5, 10, 15 分間放置の 4 区に分類し, その生存性と脱出率を比較した。なお, 融解操作は 38.5 度の温湯に浸漬し, 融解後は 38.5 度の加温板上のシャーレの上に押し出して保持した。また, 回復培養液には 10%FCS 添加 199 培地を用いマウス胎子線維芽細胞と融解後 72 時間共培養し生存性を判定した。

(3) マイクロドロプレット法によりガラス化保存した牛体外受精由来胚のストロー内保存及びストロー内希釈技術の検討

MD 法でガラス化した牛体外受精由来胚を人工授精用ストロー (0.5cc) 内に保存し, 農家の庭先で融解しストローからダイレクト受胎牛の子宮へ移植することを目的に MD 法により保存したガラス化保存胚のストロー内での融解希釈方法につい

て検討した。

ガラス化液には20%ジメチルスフォキシド(DMSO)-20%エチレングリコール(EG)-0.6 M Sucを用い、富永ら²⁾の方法に準じガラス化液に胚を浸漬し、今井ら⁵⁾の方法に基づきMDを作成した。人工授精用ストローへのMDの挿入は、液体窒素中に沈下しているMDを精密ピンセットではさみ、あらかじめ希釈液を注入し液体窒素上で保持させたストロー内へ移し、200 μ lチップで開封栓をして液体窒素へ投入し保存した。また、ストロー内での胚の希釈液には0.3 M Suc-20% FCS-PBS(Ⅰ区)、0.1 M Suc-20% FCS-PBS(Ⅱ区)及び20% FCS-PBS(Ⅲ区)を設定し、融解は38.5度の温湯中にストローの開栓部分を上にして立てた状態で浸漬して融解し、胚を含むMDが融解し希釈液と混和後10分間、38.5度の加温板上で、胚をストロー内に保持したまま放置した。10分放置後、シャレーに押し出した希釈液中から胚を取

り出し、10% FCS 添加 199 培地を用いマウス胎子線維芽細胞と72時間共培養し胚の生存性及び脱出率を観察した。

3 結 果

試験1：希釈液に20%牛胎子血清(FCS)添加PBSを用いた区は、希釈液中での胚の保持時間の延長とともに生存率が低下し、5分浸漬区では20% FCS-PBSを用いた区の生存率73.3%、0.3MSuc-PBSを用いた区の生存率は86.7%、10分保持では各々生存率は56.7%、40.0%と低下した(表1)。

試験2：生存率は、希釈液に20%FCS-PBSを用いたⅢ区が96.7%、0.1MSuc-20%FCS-PBSのⅡ区が89.6%、0.3MSuc-20%FCS-PBSのⅠ区が71.4%であった(表2)。

表1 ガラス化(EFS40)保存体外受精由来胚の融解成績

希釈液	浸漬時間	供試胚数	胚のステージ	生存胚数(%)	脱出胚数(%)
20%FCS -PBS	0分	30	Blast	26(86.7)	24(80.0)
	5分	30	Blast	22(73.3)	20(66.7)
	10分	30	Blast	17(56.7)	16(53.3)
	15分	30	Blast	11(36.7)	10(33.3)
0.3MSuc-20% FCS-PBS	0分	30	Blast	29(96.7)	28(93.3)
	5分	30	Blast	26(86.7)	25(83.3)
	10分	30	Blast	12(40.0)	10(33.3)
	15分	30	Blast	8(26.7)	8(26.7)

表2 MD法による体外受精由来胚の超急速ガラス化保存後のストロー内融解希釈試験

ガラス化法	区	希釈液	供試胚由来	供試胚数	生存胚数(%)	脱出胚数(%)
MD	I	0.3MSuc 添加	体外受精	49	35(71.4)	22(44.9)
	II	0.1MSuc 添加	体外受精	67	60(89.6)	52(77.6)
	III	20%FCS-PBS	体外受精	60	58(96.7)	52(86.7)
対照区			体外受精	38	37(97.4)	34(89.5)

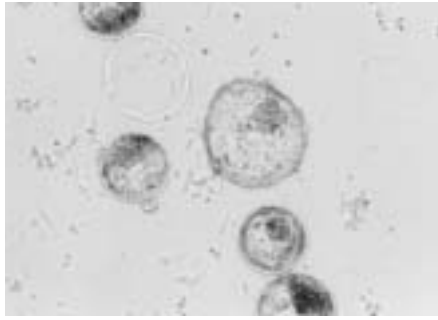


写真1 MD法によるストロー内融解希釈後の体外受精由来胚(培養開始後24時)

4 考 察

試験1において、希釈液中での胚の保持時間と生存性とを検討した結果、0.3M シュクロースを添加したPBSを用いた場合には5分以内であれば生存性は高く、その後は著しく低下した。保持時間が10分を越えた場合生存性が低下するのは高濃度のシュクロース液を用いたために細胞毒性がでたためと考えられる。通常の受精卵移植においては、胚の融解から5分以内の移植が励行されており、この保存方法でも実用性は高いと考えられる。しかし、クローン胚や性判別胚等のように透明体の一部が破損したり、透明体を除去された胚では、超急速ガラス化法による保存融解後の生存性及び受胎性が高く実用的である¹⁾。その生存性の高さを維持し、かつ、野外応用での簡易化を図るため、試験2では超急速にガラス化させた胚をストロー内で希釈シダイレクトに受胎牛の子宮へ移植することを目的にMD法でガラス化した胚のストロー内での希釈方法を検討した。

試験2では、MD法により作成したドロップの直径は0.25ccの移植用ストローより大きかったため0.5ccの人工授精用ストローを用いて実施した。また、受精卵移植器よりも太い人工授精用精液注入器を用いるために、融解から移植までに費やす時間を10分間にし、希釈液中のシュクロース濃度の検討を実施したところ、胚盤胞期胚に限定して、試験を実施した影響もあり、シュクロースを含まない希釈液での生存性がもっとも高く、シュクロース濃度が増す毎に生存率は低下傾向に

あった。Ⅱ、Ⅲ区では10分間の保持時間の間に細胞毒性の影響を受けなかったためと考えられるが、保持時間が短かった場合、差は少ないと予想される。また、MD法ではガラス化液量が少なく、0.5ccのストローを用いたことで希釈液も十分に用いることができたことも生存率を高める要因として考えられた。

以上のことにより、MD法によりガラス化保存した体外受精胚は0.5ccの人工授精用ストローに保存可能で、20%FCS-PBSの希釈液とストロー内で混和し、ガラス化液を除去することで高い生存性を維持できることがわかった。今後、同様の方法で保存した胚を移植し、その受胎性について検討するとともに、移植器具の開発に向けた取り組みを実施したい。

参 考 文 献

- 1) 笠井裕明, 福見善之, 立川進 ストローカット法による牛性判別胚のガラス化保存及び融解移植後の受胎性. 徳島県立農林水産総合技術センター畜産研究所研究報告 2003;3
- 2) 富永敬一郎, 浜田由佳子, 有吉哲志 エチレングリコールを用いたゲルローディングチップ(GL-Tip)による牛体外授精由来胚のガラス化保存. 日本繁殖生物学会講演要旨. 2000;93:86.
- 3) Vajta G, Holm P, Kuwayama PJ, Booth PJ, Jacobson H, Greve T, Callesen H. Open pull-ed straw(OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. Molec Repro Develop 1998;51:53-58
- 4) 山崎慎一郎, 野村泰弘, 川井昭雄, 高木英彦, 市川恭子 ウシ胚の凍結保存方法の簡易化に関する研究 高知県畜産試験場研究報告 2002;18:28 ~ 31.
- 5) 今井昭, 尾形康弘, 志水学, 堀内俊考 マイクロドロプレット法で凍結保存したレシピエント卵子による核移植. 日本繁殖生物学会講演要旨. 2000;93:76.