

# ストローカット法による牛体外受精由来胚のガラス化凍結

笠井 裕明・福見 善之・後藤 充宏

## 要 約

牛体外受精由来胚に対して簡易的で、再現性と融解後の生存性の高い胚の凍結方法を確立するため、凍結液に 20%EG 20%DMSO 0.3MSuc BSA PBS を用い、先端部分をカットしたストローに胚を含む極少量のガラス化液でドロップを作りガラス化させる凍結方法で培養方法の異なる 3 種類の牛体外受精由来胚盤胞期胚を凍結し、20%FCS 添加 PBS で融解後 10%FCS と 100  $\mu$ M メルカプトエタノールを添加した 199 でマウス胎子線維芽細胞(MFF)と 72 時間共培養し生存性を比較検討した。その結果、5% FCS 添加 CR1aa で低酸素培養した I 区の融解後の生存率及び脱出率は 97.2 及び 77.8%、IVD101(機能性ペプチド研)で低酸素培養した II 区は 90.5 及び 77.8%、10%FCS 添加 199(5%CO<sub>2</sub> 95%N<sub>2</sub>)で MFF と共培養を行った III 区は 93.3 及び 86.7%であった。以上のことからストローカット法によるガラス化凍結では凍結前の胚の培養方法に影響されず融解後高い生存率を示すことが解った。

## 目 的

牛胚の凍結方法にはグリセリンを用いて 0.25ml のストローに封入した胚を緩慢冷却し、胚細胞内の自由水を脱水後に液体窒素中に投入して 2 段階冷却で凍結する方法が、融解後の生存性も高く体内受精胚の凍結方法として最も普及している。しかし、この方法では -30 付近まで緩慢(-0.3 ~ -0.5 /分)に冷却する凍結機と融解後耐凍剤を段階的に希釈する必要がある。1 回の操作で大量に作出される、体外受精由来胚や核移植胚の凍結にはもっと簡易的で安価に、時間がかかず、融解後の生存性の高い凍結方法の開発が必要である。

ガラス化法による凍結保存方法<sup>7)</sup>は胚細胞からの脱水を高濃度の透過型耐凍剤中で行い液体窒素中へ直接投入する方法であり、プログラムフリーザーを必要としない簡易的な方法である。

近年、ガラス化法ではガラス化液への胚の浸漬時の温度、時間等の平衡条件や融解時の耐凍剤の除去方法が改良され高い生存性を得ることができ、本県でも移植により産子の生産にも成功している。

最近、これらのガラス化法による凍結方法を更に改良し、極少量の胚または卵子を含むガラス化液を液体窒素で超急速に凍結させる方法が開発され、凍結融解後に高い生存性が確認された<sup>1,3,6,10,12)</sup>。今回、我々は 0.25ml のストローを用い極少量のガラス化液で胚を凍結する方法について検討を行ったので報告する。

## 方 法

### 1) 試験 1：凍結融解速度の比較

ガラス化液のストローへの封入方法の違いにより 3 区(図 1)に分類し,ストローカットした I 及びストロー内にドロップを作った II について凍結では,液体窒素へ直接浸漬(写真 1)したとき,融解は液体窒素中から 20%FCS 添加 PBS へ浸漬したときの温度変化を比較した。また,ストロー内に封入した III では,液体窒素に浮かべた発泡スチロール上(写真 2)で凍結したときの温度変化または直接液体窒素中へ浸漬したときの温度変化と,融解は 24 の微温湯中へ浸漬したときの温度変化を観察した。

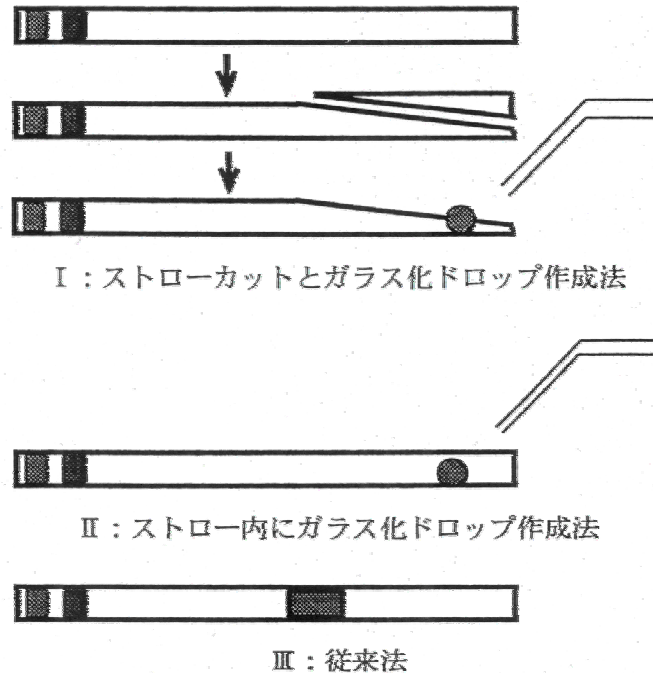


図 1 ガラス化ドロップの作成方法

凍結融解速度の測定はガラス化液に 20%EG 20%DMSO 0.3MSuc BSA PBS を用い,ストロー内のドロップの中に電極(CHINO EB 22005)を挿入し温度変化を記録紙に記録した。

ガラス化液の作成方法は 3mg/mlBSA と 0.3M/ml シュクロースを含む PBS6ml にエチレングリコール 2ml , DMSO2ml を加え 10ml とし,濾過滅菌しガラス化液とした。

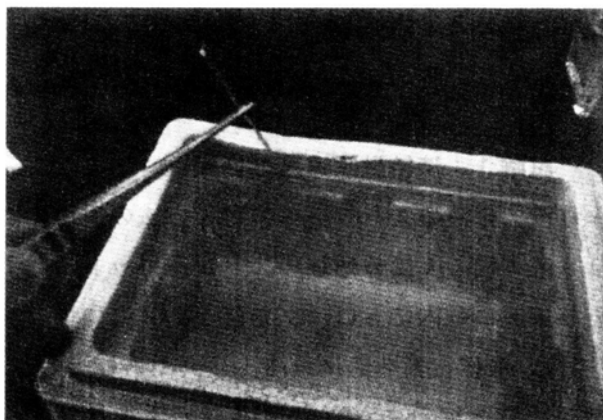


写真 1

## 2) 試験 2：ストローの比較

5%FCS 添加 CR1aa で低酸素培養(5%CO<sub>2</sub> 5%O<sub>2</sub> 90%N<sub>2</sub>)した体外授精由来胚盤胞期胚を材料にクリスタルストローとクリアストローの2種類のストローを用いストローの種類が融解後の生存性に及ぼす影響を調査した。

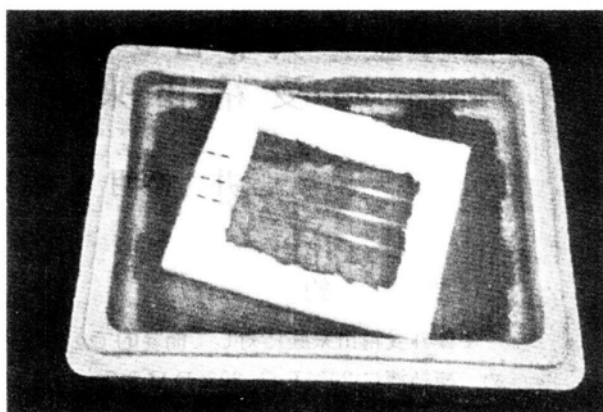


写真 2

### (1) 体外受精

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<sup>8)</sup>に基づいて媒精を実施した。媒精後は 3mg/mlBSA 添加 CR1aa(5%CO<sub>2</sub> 5%O<sub>2</sub> 90%N<sub>2</sub>)で 72 時間目まで培養し、以降は 144 または 168 時間目に凍結するま 5%FCS 添加 CR1aa(5%CO<sub>2</sub> 5%O<sub>2</sub> 90%N<sub>2</sub>)で培養した。

### (2) ガラス化液及び凍結方法

ガラス化液は試験 I と同様のものを用いた。ガラス化液への胚の浸漬は 3 段階に分けて行った。すなわち、希釈液に 0.3mg/mlBSA 添加 PBS を作成し、この希釈液でガラス化液を 2:1, 1:2 に希釈し、各々を 4 穴マルチシャーレに 750 μl とり、胚をおよそ 20 秒間ずつ各希釈液に浸漬した後にガラス化

液に浸漬し、先端部分をカットした 0.25ml クリスタルストローの開口部分に 1  $\mu$ l 程度のガラス化液とともに胚を吹き出してドロップを作り、液体窒素中へ浸漬し凍結した。

(3) 融解及び培養

融解は 20%FCS 添加 PBS を用い、液体窒素中から取り出したストロー上の胚を含むガラス化部分を速やかに浸漬し融解した。融解後は 10%FCS とメルカプトエタノールを含む 199 液で MFF と 72 時間回復培養した。生存胚の判定は供培養開始から 24 時間目に胞胚腔の再形成がありステージ進んだものを生存胚とした。

3) 試験 3：体外受精由来胚の凍結

試験には 3 種類の培養方法で作出した体外受精由来胚を用い、媒精終了後 144 ~ 168 時間目の A ランクの胚盤胞期胚のみを凍結試験に供試し、融解後は 72 時間 MFF と供培養し、体外受精由来胚の培養方法がストローカット法によるガラス化凍結融解後の生存性に与える影響について比較検討した。胚の作出及びガラス化凍結融解方法は以下に示すとおりである。

(1) 体外受精

体外受精は試験 II と同様に実施し、媒精後は 3mg/mlBSA 添加 CR1aa(5%CO<sub>2</sub> 5%O<sub>2</sub> 90%N<sub>2</sub>)で 72 時間目まで培養し、以降は表 1 に示すとおり培養方法毎に 3 区に分類し 144 または 168 時間日に凍結するまで培養した。すなわち、5%FCS 添加 CR1aa(5%CO<sub>2</sub> 5%O<sub>2</sub> 90%N<sub>2</sub>)で培養した区を I 区、IVD101(5%CO<sub>2</sub> 5%O<sub>2</sub> 90%N<sub>2</sub>)で培養した区を II 区、10%FCS とメルカプトエタノールを含む 199 でマウス胎子線維芽細胞(MFF)と共培養(5%CO<sub>2</sub>-air)を行った区を III 区とした。また、ガラス化液及び凍結融解方法並びに回復培養と生存胚の判定は試験 2 と同様の方法で行った。

表 1 体外受精卵の培養方法

区	培養液及び気相	
	~ 72h	72 ~ 144, 168h
I	BSA - CR1aa (低酸素)	5% FCS - CR1aa (低酸素)
II	BSA - CR1aa (低酸素)	IVD 101 (低酸素)
III	BSA - CR1aa (低酸素)	MFF - 199 $\beta$ (5% CO <sub>2</sub> - air)

結 果

1) 試験 1

凍結融解時の温度変化を記録した結果、ストローカット法による I 区の凍結速度 - 23000 /min, 融解速度が 21000 /min で最も温度変化が急速であった。ストローに封入して行った III 区では凍結時が - 3000 /min, 融解時 4700 /min であり、最も緩やかな温度変化を示した。また、ストローをカットしないでストローの内壁にドロップを作った II 区では凍結時 - 10800 /min, 融解時 6700 /min であった(表 2, 3)。

表 2 ガラス化凍結速度

凍結方法		凍結速度 (0 → -170°C)
I	液体窒素浸漬	-23000°C/min
II	液体窒素浸漬	-10800°C/min
III	液体窒素浸漬	-3000°C/min
	液体窒素上	-250°C/min

表 3 ガラス化融解速度

凍結方法		融解速度 (-170 → 0°C)
I	20% FCS - PBS	21000°C/min
II	20% FCS - PBS	6700°C/min
III	微温湯中	4700°C/min

2) 試験 2

2 種類のストローを用いてストローの違いが融解後の生存性に及ぼす影響について検討した結果、クリスタルストローを用いてストローカット法により凍結保存した 36 個では融解後の生存胚数 35 個で、生存率 97.2%、脱出胚数 27 個で脱出率 75.0%であったのに対し、クリアーストローでは凍結した 33 個中生存胚数は 25 個で生存率 75.8%、回復培養終了時の脱出胚数 16 個で脱出率 48.5%であった。また、クリアーストローでは融解後 14 個の胚についてフラクチャー傷害が認められた(表 4)。

3) 試験 3

体外受精の結果は表 5 に示す通りである。5%FCS 添加 CR1aa(5%CO<sub>2</sub> - 5%O<sub>2</sub> - 90%N<sub>2</sub>)で培養した I 区は他の区に比べステージが早く進み媒精終了後 144 時間目には II 及び III 区が 6.3, 2.0%であるのに対し 14.2%が胚盤胞期に達していた。168 時間目における胚盤胞期胚の発生率は 30.2 ~ 33.6%で培養方法による胚の発生率に差は認められなかった。

表4 ストロー別の凍結融解成績

ストロー	クリスタル	クリアー
供試胚数	36	33
ステージ	B la	B la
培養液	C R1aa	C R1aa
生存胚数	35	25
生存率(%)	97.2	75.8
脱出胚数	27	16
脱出率(%)	75.0	48.5
フラクチャー数	0	14
フラクチャー(%)	0	42.4

各培養液で作出した胚を凍結融解した結果，I区では生存率97.2%(35/36)，脱出率77.8%(28/36)，II区では生存率90.5%(19/21)及び脱出率77.8%(18/21)，III区では生存率93.3%(28/30)及び脱出率86.7%(26/30)であり(表6)，培養方法による生存性への影響は認められなかった。なお，凍結を行わないで供培養させた結果，各区の生存率及び脱出率はI区が100及び95.0%，II区が97.4及び92.1%，III区が97.8及び93.5%であった。

表5 体外受精成績

区	供試卵数	分割(%)	144h後		168h後 B la～
			CM～e B la	B la～	
I	183	73.2	33(18.0)	26(14.2)	60(32.8)
II	205	82.0	62(30.2)	13(6.3)	62(30.2)
III	229	71.2	109(47.6)	5(2.2)	77(33.6)

表6 凍結融解培養成績

区	培養時間	ステージ	供試胚数	生存胚数(%)	脱出胚数(%)
I	144	B la	36	35(97.2)	28(77.8)
対象	144	B la	45	45(100)	43(95.0)
II	168	B la	21	19(90.5)	18(77.8)
対象	168	B la	38	37(97.4)	35(92.1)
III	168	B la	30	28(93.3)	26(86.7)
対象	168	B la	46	45(97.8)	43(93.5)

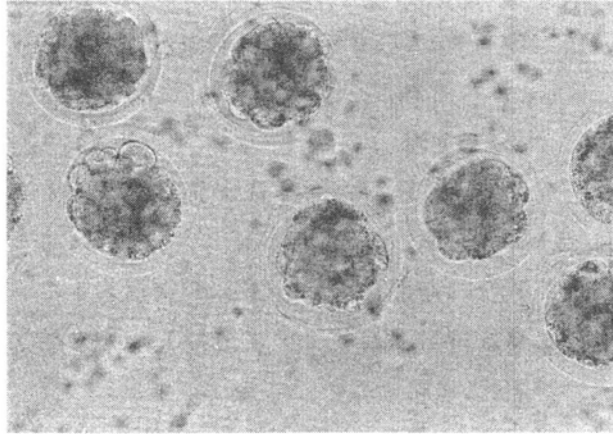


写真3 融解後6時間目

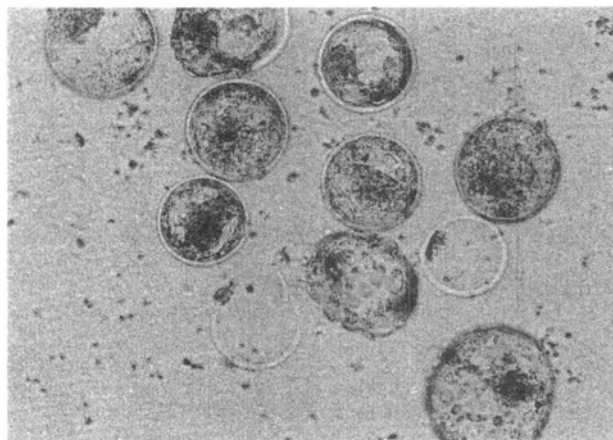


写真4 融解後24時間目

## 考 察

ガラス化凍結は、ガラス化液の液量を極端に少なくしてストロー壁が薄い極細の OPS(open pulled straw)やゲルロードチップ等に吸引し直接液体窒素に浸漬して凍結することで融解後の生存性が向上する。OPS 法における凍結速度は  $-22500 \text{ /min}$  ( $-25 \sim -175$ ) で従来の方法よりも急速であることが Vajta ら<sup>11)</sup>により報告されている。ストローへの保存方法の違いで温度変化を測定した試験1の結果、液体窒素にガラス化液が直接ふれるI区の温度変化は彼らの報告と同様に急速な変化をしたが、ストロー内部にドロップを作ったII区では、 $-10800 \text{ /min}$ であった。これは、胚を含むガラス化液のドロップを囲むストローの体積が大きすぎて、ガラス化液は液体窒素に直接浸漬する前に沸騰した窒素ガスによつてストロー全体が冷却されながら凍結するためと考えられる。特にI区では  $-170$  に到達するのに要した時間はおよそ1秒程度であった。

試験3においてガラス化液への浸漬は、浸漬時間を短縮させて耐凍剤の毒性による影響を低減させるため3段階で行った。各々20秒ずつ浸漬し、胚の体積がおよそ半分以下に収縮した段階でストローへ移しガラス化させ、浸漬開始からガラス化までの時間は1分以内であった。融解時の観察でガラス

化液が白濁し、部分的に脱ガラス化状態になっていることが確認されるものがあったが、生存率が低下することはなかった。胚盤胞期胚には胞胚腔が存在し、耐凍剤を十分に浸透させるには時間を要する。この間に毒性<sup>7,9)</sup>の影響を受けてしまうが、段階的に浸漬<sup>4)</sup>することでガラス化液への浸漬時間を短縮し、かつ、胞胚腔内がある程度の耐凍剤に置換することができたため、細胞内でも氷晶の形成を防止できたと考えられる。また、凍結前の培養方法と融解後の生存性について、今回は胚盤胞期胚にステージを限定して凍結したので培養方法による生存性への影響は認められなかったが、再構築胚の凍結に応用することを考慮して後期桑実期～初期胚盤胞期胚の凍結について慎重<sup>2)</sup>に検討していきたい。

凍結胚の融解は脱ガラス化の発生しやすい温度域を急速に通過させる必要がある。また、フラクチャー傷害の発生を防ぐためには傷害の発生しやすい温度域をやや緩慢に通過させることが重要とされている<sup>5)</sup>。ストロー内にガラス化液を充填しガラス化させる方法では、液体窒素ら取り出したストローを空中で保持しフラクチャーの起こりやすい温度域を緩やかに通過させた後、微温湯中に浸漬して急速に加温し脱ガラス化の発生を防ぐこともできるが、ストローカット法では室温で空中保持すると数秒で融解してしまうため、液体窒素からとり出すと同時に融解液中に浸漬した。ストローカット法は凍結融解時の容器の体積変化に影響されにくい凍結方法であると考えたが、用いるストローの種類によっては高率にフラクチャーが発生することが確認された。クリアストローに比べ柔軟でストロー壁の薄いクリスタルストローを用いた場合、フラクチャーの発生を防ぐことが可能であることが確認できたが、用いる容器とフラクチャーの発生については今後引き続き検討していきたい。

融解時における耐凍剤の除去方法には sucrose を用いることが一般的である。今回の試験では融解方法の検討を行わなかったが20%FCS PBSにガラス化状態から浸漬して融解する方法で十分に高い生存性が得られた。単位容積あたりの細胞数が増加した胚盤胞期胚を用いたため簡易的な融解方法でも生存率が高かったと考えられる。

以上のことから、ストローカット法による牛体外授精由来胚盤胞期胚のガラス化凍結は、従来の方法よりも短時間で処理することが可能であり、また、融解後の生存性も高いことが確認された。今後は、胚の凍結ステージ及び融解方法並びにダイレクト移植方法について検討するとともに移植後の受胎性について例数を重ねていきたい。

## 参考文献

- 1) 浜脇淳, 浜野晴三, 桑山正成 体外授精由来ウシ胚盤胞のガラス化保存(最小容量のガラス化液での超急速凍結法の検討)。西日本胚移植研究会講演要旨。1998;9:24.
- 2) H Jacobsen, M Schmidt, P Holm, P T Sangi-Id, G Vajta, T Greve and H Callesen Body dimensions and birth and organ weights of calves derived from vitro produced embryos cultured with or without serum and oviduct epithelium cells. Theriogeonlogy 2000;53:1761-1769.
- 3) 今井昭, 尾形康弘, 志水学, 堀内俊考 マイクロドロ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.

- 4) 石森久雄 牛受精卵のガラス化低温保存獣医畜産新報 1992;45:928-931.
- 5) 葛西孫三郎 受精卵の凍結保存 緩慢法とガラス化法 家畜人工授精 1997;183:12-21.
- 6) 桑山正成 ,浜野張晴三 体外授精由来胚のガラス化凍結(マイクロシリンジを用いた超急速凍結法の検討)。西日本胚移植研究会講演要旨。1998;9:23.
- 7) Rall WF , Fahy GM Ice-free cryopreservation of mouse embryos at-196 by vitrification.Nature 1985;313:573-575.
- 8) 立川 進,仁木明人,中久保昌邦,井上 侃 牛の体外受精(第1報)徳島県肉畜試験場 研究報告 1989;17:1-9.
- 9) 立川 進,音井威重,近藤正治 牛の体外受精(第6報:牛体外受精胚のガラス化保存) 徳島県肉畜試験場研究報告 1992;20:6-11.
- 10) 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.
- 11) Vajta G, Holm P, Kuwayama PJ, Booth PJ Jacobson H, Greve T, Callesen H.Open pulled straw(OPS) vitrification:A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos.Molec Repro Develop 1998;51:53-58.
- 12) Vajta G, Rindom N, Peura TT, Holm P, Greve T, Callesen H The effect of medium, serum and temperature on in vitro survival of bovine blastocysts after open pulled straw(OPS)vitrification.Theriogenology 1999;52:939-948.