ウシ卵子の超急速ガラス化保存法の検討

瀬田剛史[1]，福留信司，篠川温[2]，内山保彦[3]，中川浩，佐藤義政，中川邦昭[4]
現：[1]中央家畜保健衛生所，[2]新潟県農業大学校，[3]下越家畜保健衛生所，[4]中央家畜保健衛生所佐渡支所

Various methods for vitrification of bovine oocytes

Takeshi SETA[1], Shinji FUKUDOME，Tazunu SASAGAWA[2],Yasuhiko UCHIYAMA[3],
Hiroshi NAKAGAWA, Yoshimasa SATO and Kuniaki NAKAGAWA[4]
Niigata Agricultural Research Institute Livestock Research Center
[1]Niigata Chuo Livestock Hygiene Service Center, [2]Niigata prefectural Agricultural Collage,
[3]Niigata Kaetsu Livestock Hygiene Service Center
[4]Niigata Sado Substation of Chuo Livestock Hygiene Service Center

要　約　ウシ卵子の超急速ガラス化保存（ガラス化）を，2 種類のガラス化保存液に対してそれぞれ 2 種類の前平衡方法と，3 種類のガラス化保存用容器で実施した．ガラス化した卵子を加温後に体外受精を行い，分割率および胚発生率を比較検討した．また、ガラス化した卵子を加温後 3 種類の希釈方法で実施し、体外受精後の分割率および胚発生率を比較検討した。いずれの方法でも分割率と胚発生率が低く，差が認められなかった．

これまで, 優良種畜の遺伝子保存は精子および胚で行われていたが，ウシ未受精卵子（以下，卵子）に関しては凍結保存技術が確立されていないため, 精子および胚の凍結ほど盛んに行われていなかった. ウシ卵子を長期間保存することが可能となれば, 将来現れる高い資質を持った雄ウシの遺伝子と, 高い資質を持った現在の雌ウシの遺伝子を掛け合わせ，高能力の産子を得られる可能性が出てくる．また, 一個体から採取し保存した多数の卵子を一度に融解し体外受精を行うことで, 精液使用効率の向上および産子の効率的生産が期待できる．

超急速ガラス化保存法は，緩速冷却・急速融解法で用いる耐凍剤よりもかなり高濃度の耐凍剤を使用し, 胚を平衡した後に液体窒素中で冷却して保存する方法である（林ら 2004）. 特徴としては細胞内外の氷晶形成を起こさないので, 氷晶形成に伴う直接的および間接的傷害を回避することができる．しかし，高濃度の耐凍剤を含む凍結媒液中で平衡するので, その間の浸透圧衝撃や耐凍剤の毒性が胚や卵子の生存性を損なう危険性がある．現在，卵子に対しては比較的毒性が低いエチレングリコール（以下，EG）とシュークロース（以下，Suc）を添加したガラス化保存液が卵子の超急速ガラス化に使用されている（森 ら 2005）．そこで，卵子の超急速ガラス化保存法に用いるガラス化保存液の構成を決定するため，4 種類の EG 濃度で構成したガラス化保存液でと畜場由来卵子の超急速ガラス化保存方法の検討（試験 1）を行うとともに，卵子のガラス化保存容器の検討（試験 2）を行い，体外受精後の分割率および胚発生率を比較検討した．また，ガラス化保存後に加温した卵子の希釈液の検討（試験 3）を行い，体外受精後の分割率および胚発生率を比較検討した．

材料および方法

試験 1. ガラス化保存液および前平衡液の検討

【卵子の採取および成熟培養】

県内のと畜場から雌ウシの卵巣を採取し, 25℃に保温した抗生物質（ベンジルペニシリン 100IU/ml とストレプトマイシン 0.1mg/ml）添加生理食塩水中で 6～24 時間保存後, 注射器を用いて卵巣表面の直径 2～6mm の小卵胞中の卵子を卵胞液と共に吸引し，5%ウシ胎仔血清（FBS），抗生物質添加ダルベッコ PBS 溶液を用いて回収した．回収した卵子のうち, 卵丘細胞が 2 層以上かつ透明帯周囲全体に付着しているものを選択した．成熟培養液には

IVMD-101（機能性ペプチド研究所）を用い，卵子 1 個当たり 10μl のドロップで卵子成熟培養を行った．培養器の気相および温度条件は 5%CO_2，38.5℃とした．21 時間の成熟培養後，5～10 個の卵子を 0.1%ヒアルロニダーゼ，10%FBS/TCM199 へ移し，1 分間で卵丘細胞を 1～2 層程度に剥離し，10%FBS/TCM199 へ移した．

【卵子のガラス化保存】

超急速ガラス化保存法に使用するガラス化保存液の組成を表 1 に示した．保存法は各試験区を前平衡液で処理後，5 個の卵子を孔径 10μl，直径 13mm のメンブレンフィルター（Millipore: JCWP01300 以下，フィルター）に乗せ，各試験区のガラス化液をフィルターに 2～3 滴落とした後，フィルターごと液体窒素中に投入して卵子のガラス化保存を行った．試験区 1-1 および 1-3 では前平衡 1 液に 12 分間，ガラス化液に 30 秒間それぞれ平衡処理した．試験区 1-2 および 1-4 では前平衡 1 液に 10 分間，前平衡液 2 液に 2 分間，ガラス化液に 30 秒間それぞれ平衡処理した．全ての作業は室温 20～22℃で行った．また，対照区としてガラス化していない新鮮卵子を使用した．

表 1　ガラス化保存液の構成

試験区	前平衡 1 液	前平衡 2 液	ガラス化液
1-1	3%EG	-	30%EG,1.0MSuc
1-2	3%EG	15%EG	30%EG,1.0MSuc
1-3	4%EG	-	40%EG,1.0MSuc
1-4	4%EG	20%EG	40%EG,1.0MSuc
対照区	ガラス化せず（新鮮卵子）		

10%FBS/TCM199 を基礎液とした

【保存卵子の加温およびガラス化液の希釈】

1 日～数日間卵子を液体窒素内で保存した後，0.5MSuc,10%FBS/TCM199 内で卵子保存に用いたフィルターを加温し，浮遊した卵子を 0.5MSuc/10%FBS/TCM199, 0.25MSuc/10%FBS/TCM199, 0.125MSuc/10%FBS/TCM199, 10%FBS/TCM199 の順に移し，各 5 分間静置して段階的希釈した．希釈後 IVF-100（ペプチド研）で 30 分～1 時間の前培養を行った．全ての作業は室温 20～22℃で行った．

【体外受精および発生培養】

体外受精は，38.0℃の微湯温で融解した精液を IVF100（機能性ペプチド研）で 2,000rpm で 2 回遠心洗浄した後，最終精子濃度が 5.0×10^6 個/ml になるように調整した．調整した精子液で 100μl ドロップを作成し，前培養しておいた卵子を入れて 6 時間の体外受精を行った．

体外受精終了後，卵丘細胞および付着精子をピペッティングにより除去し，5%FBS/CR1aa（小林，2007）で 7～8 日目まで体外培養した．培養器の気相および温度条件は 5%CO_2，5% O_2，90%N_2，38.5℃とした．

体外受精後 2 日目において 2 細胞以上に分割した分割率，および 7～8 日目に胚盤胞以上に発育した胚発生率を調査した．

試験 2. ガラス化保存容器の検討

【供試卵子の採取および成熟培養】

供試卵子の採取および成熟培養の処理方法については，試験 1 と同様の方法で行った．

【卵子のガラス化保存】

10%FBS/TCM199 へ移した卵子を 3%EG,10%FBS /TCM199 で 12 分間前平衡処理後，30%EG,1.0MSuc のガラス化液に 30 秒間平衡処理し，試験 1 のフィルターを使用してガラス化する方法（試験区 2-1）と，5 個の卵子を上記と同様に前平衡処理し，ガラス化液に投入後 30 秒以内に孔径 0.5～0.7mm の Mounted Cryoloop（HAMPTON RESEARCH:HR4-963 以下，Cryoloop）に付着させ液体窒素に投入する方法（試験区 2-2），同様に 5 個の卵子をガラス化液に投入後 1 分以内に内径 185μm，膜厚 15μm，長さ 30 mm，孔径 15nm のセルロースアセテート製中空糸（以下，中空糸）に卵子を吸引し，液体窒素に投入する方法（試験区 2-3）とで卵子ガラス化を行った．また，対照区としてガラス化していない新鮮卵子を使用した．

【保存卵子の加温およびガラス化液の希釈】

試験区 2-1 の加温，希釈は試験 1 と同様の方法で行った．

試験区 2-2 および 2-3 では，液体窒素から取り出した Cryoloop 及び中空糸を 0.5MSuc,10%FBS/TCM199 中で振とうして卵子を離脱させ，浮遊した卵子を 0.5MSuc/10%FBS/TCM199，0.25MSuc/10%FBS/TCM199，0.125MSuc，10%FBS/TCM199 の順に各 5 分間静置して段階的に希釈を行った．希釈後 IVF-100 で 30 分～1 時間の前培養を行った．

【体外受精および発生培養】

体外受精および発生培養は試験 1 と同様の方法で行い，体外受精後 2 日目の分割率および 7～8 日目の胚発生率を調査した．

試験 3. 希釈液の検討

【供試卵子の採取および成熟培養】

供試卵子は当センター飼養の黒毛和種 2 頭から生体卵子吸引法（OPU）により採取した． OPU 実施 48 時間前に FSH（アントリン R・10、共立製薬）10AU を 1 回筋肉内に投与した．OPU 時に尾椎硬膜外麻酔を実施し，採卵針（COVA Needle、ミサワ医科工業社）を取り付けたプローブ（UST9109、Aloka 社）を挿入し，超音波画像診断装置（SSD1200、Aloka 社）で卵胞を確認しながら採卵針を卵胞に穿刺し，吸引器（VACUUM PUMP MODEL4、FHK）により卵胞液とともに卵子を回収した．灌流液は，10 単

位/ml ヘパリンナトリウム（ヘパリンナトリウム、富士製薬工業社），1%牛血清(Calf Serum　GIBCO 社)，および抗生物質を加えた乳酸加リンゲル液（ハルゼン V 注射液、日本全薬工業社）を用いた．

【卵子ガラス化保存】

卵子ガラス化は試験 2 の試験区 2-2 と同様に Cryoloop を用いて行った．

【保存卵子の加温およびガラス化液の希釈】

加温は試験 2 の試験区 2-2 と同様に行い，加温後のガラス化液の希釈は，1~3 段階の希釈法を用いた．各区の希釈液は 10%FBS/TCM199 を基礎液とした．試験区 3-1 の希釈は表 2 に示す希釈 1 液，希釈 2 液，希釈 3 液の順に各 5 分間静置して段階希釈した．試験区 3-2 では希釈 1 液，希釈 2 液の順に各 5 分間静置して段階希釈した．試験区 3-1 では希釈 1 液に 5 分間静置した．各区で希釈後 IVF-100 を使用して 30 分～1 時間の前培養を行った．

表 2　希釈液の組成

試験区	希釈 1 液	希釈 2 液	希釈 3 液
3-1	0.5MSuc	0.25MSuc	0.125MSuc
3-2	0.5MSuc	0.25MSuc	-
3-3	0.5MSuc	-	-
対照区	ガラス化せず（新鮮卵子）		
	10%FBS/TCM199 を基礎液とした		

【体外受精および発生培養】

試験 2 と同様の方法で行い，体外受精後 2 日目における 2 細胞以上に分割した分割率および 7～8 日目に胚盤胞以上に発育した胚発生率を調査した．また，ガラス化していない新鮮卵子を 4 区とし，分割率および胚発生率を比較した．

統計処理

体外受精後の分割率および胚発生率について，各試験区間で Tukey-Kramer の多重検定を行った．

結　　果

試験 1. ガラス化保存液の検討

4 種類のガラス化保存液を用いて卵子をガラス化保存し，加温・ガラス化液希釈後の体外受精成績を表 3 に示した．ガラス化保存区（試験区 1-1～4）の分割率および胚発生率に有意な差は認められなかった．全てのガラス化保存区の分割率及び胚発生率は，新鮮卵子を体外受精した対照区よりも有意に低かった（$p<0.01$）．

表 3　超急速ガラス化保存液の EG 濃度が保存卵子の分割率および胚発生率に及ぼす影響

試験区	供試卵子数	培養卵子数	分割数（%）	発生数（%）
1-1	67	57	13（22.8^{B}）	3（5.3^{B}）
1-2	67	62	14（22.6^{B}）	3（4.8^{B}）
1-3	67	63	9（14.3^{B}）	1（1.6^{B}）
1-4	64	62	21（33.9^{B}）	1（1.6^{B}）
対照区	54	54	43（79.6^{A}）	24（44.4^{A}）

（A, B：$p<0.01$）

試験 2. ガラス化保存容器の検討

3 種類のガラス化保存容器を用いて卵子をガラス化保存し，加温・ガラス化液希釈後の体外受精成績を表 4 に示した．フィルターおよび Cryoloop から回収できた卵子数は少なかった．中空糸は加温中に容器本体が破損したことにより卵子を回収することが出来なかった。ガラス化保存区（試験区 2-1～3）の分割率および胚発生率に有意な差は認められなかった．全てのガラス化保存区の分割率及び胚発生率は，新鮮卵子を体外受精した対照区よりも有意に低かった．

表 4　3 種類のガラス化保存容器によるガラス化保存が分割率および胚発生率に及ぼす影響

試験区	供試卵子数	培養卵子数	分割数（%）	発生数（%）
2-1	20	8	2（25.0^{b}）	1（12.5^{b}）
2-2	20	13	2（10.0^{b}）	1（7.7^{b}）
2-3	20	0	0（0.0）	0（0.0）
対照区	10	10	8（80.0^{a}）	5（50.0^{a}）

（a, b：$p<0.05$）

試験 3. 希釈液の検討

ガラス化保存後に加温した卵子を 3 種類の希釈液を用いて希釈し、体外受精した結果を表 5 に示した．いずれの区も回収卵子数が少なく，ガラス化保存区（試験区 3-1～3）に分割および胚発生は認められなかった．

表 5　希釈液の Suc 濃度と希釈回数が保存卵子の分割率および胚発生率に及ぼす影響

試験区	供試卵子数	培養卵子数	分割数（%）	発生数（%）
3-1	27	12	0（0.0）	0（0.0）
3-2	29	15	0（0.0）	0（0.0）
3-3	21	9	0（0.0）	0（0.0）
対照区	31	31	20（80.0）	14（45.2）

考　　察

本試験では，いずれのガラス化保存法でも加温・ガラス化液希釈後の卵子の体外受精成績が低く，試験区の評価に

いたらなかった。

超急速ガラス化保存は, 細胞を微量の高濃度のガラス化液と共にガラス化保存容器に付着させ, 液体窒素に投入したときの冷却速度を飛躍的に高める方法である. 細胞が大きく，水が多い卵子のガラス化保存は，微量のガラス化液で細胞内の耐凍剤濃度を上げることと, 高濃度の耐凍剤の毒性増加の相反する条件を克服する必要がある．しかし，今回使用したガラス化液は粘稠度が高く, 超急速ガラス化保存を成功させるのに必要な, 卵子のガラス化液へ暴露時間を短くすることと, ガラス化保存容器に付着させるガラス化液量を極力少なくすることが難しかった．また，加温時にガラス化保存器具から卵子が遊離しない, 耐凍剤の希釈作業時に耐凍剤の拡散と表面張力により卵子を紛失するなどのトラブルも発生した.

ガラス化した卵子は少数ながら胚盤胞に発生したことから, 少しでも簡易に実施可能な方法を開発できれば成績を上げることができると考える.

謝　　辞

本研究の実施にあたり，ご指導，ご協力いただいた九州沖縄農業研究センター，山口大学大学院，石川県畜産総合センター，福岡県農業総合試験場，長崎県畜産試験場，佐賀県畜産試験場，鹿児島県肉用牛改良研究所の皆様に，また, 卵巣の採材にご協力いただいた長岡食肉衛生検査センターの皆様に深謝いたします.

引用文献

林史弘，窪田力，溝下和則．2004．牛卵子の超急速ガラス化保存，鹿児島県肉用牛改良研究所研究報告 9.

森美幸，笠正二郎，上田修二．2005．ウシ体外成熟卵子の超急速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手法．福岡県農業総合試験場研究報告 24, 73-77.

小林修司．2007．ウシ生体卵子吸引・体外受精技術マニュアル．家畜改良センター技術マニュアル 19, 58-59.