

2 牛胚の超急速ガラス化保存

ねらいと成果

近年、経膈採卵・体外受精技術や核移植技術が進歩したことにより、牛初期胚を利用する機会が多くなり、これらの凍結保存技術を確立することが必要不可欠となった。しかし、受精後5日目までの初期胚、特に体外受精由来胚では凍結が困難である。これは初期胚では脂肪が多く、細胞膜及び細胞内脂肪と関係して起こる凍結傷害が大きいことや、体外受精・体外発生胚では体内発生胚のような細胞間結合を十分構築しないで分割を進めることが原因と考えられている。ガラス化法は、植氷後 -30°C から -36°C まで $0.3^{\circ}\text{C}/\text{分}$ のゆっくりした冷却速度で凍結する緩慢凍結法とは違い、高濃度のエチレングリコールやDMSOなどの凍結保護物質を含む培養液中で急速に冷却するので、氷晶の形成はなく、胚細胞内脂肪の影響を受け難いため、初期胚の凍結に適していると考えられている。そこで、ガラス化容器として極めて細い内径をもつゲル・ローディング・チップ(GL-Tip)を用いた超急速ガラス化法を体外受精後のあらゆる発育ステージの胚に応用した結果、実用的に利用可能な高い生存率が得られた。

内容

市販 GL チップの先端を約10mm切断し、 $2\mu\text{l}$ の

オートピペットに付け、 $0.6\sim 0.7\mu\text{l}$ のガラス化液とともに胚を吸引した。そして、オートピペットにチップをつけた状態で液体窒素にチップ先端部を浸漬しガラス化させた。次に、チップをオートピペットからはずし、液体窒素に沈めた。それから、先端部を約20mm切断し、切れ目をいれた0.5mlストローにGL-Tipを差込み、液体窒素タンクで保管した(図1)。加温は、 37°C の0.25Mスクロース液にチップ先端部を浸漬することにより行い、チップのオートピペットへの取り付け部を指で封じることによって胚をウェルの中へ移動させた。この液で1分間保持し、0.13Mスクロース液で5分間保持後、培養液へ移した。このガラス化法を体外受精由来胚の全ての発育ステージに応用し、新鮮非凍結胚と比較した。その結果、ガラス化区で胚盤胞への発生率(生存率)が少し低下したが、全ての発育ステージで新鮮胚区との間に有意差($P\geq 0.05$)はみられなかった(図2)。得られた胚盤胞の細胞数でも両区に差はみられなかった($P\geq 0.05$)。

今後の方針

経膈採卵・核移植・性判定胚及び卵子などの緩慢凍結が困難な胚に利用する。

富永敬一郎(中央農技・生物工学研究所)

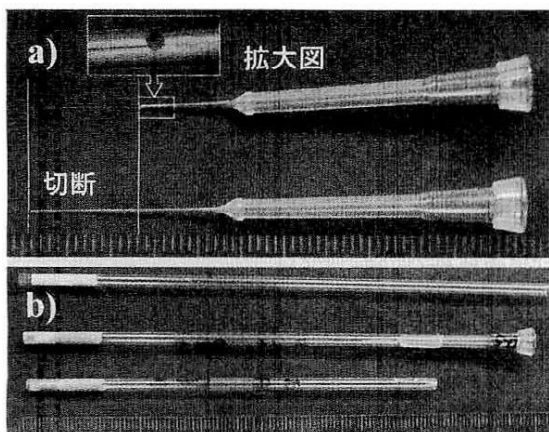


図1 ゲルローディングチップ(GL-Tip)
a) 市販チップと先端部拡大図(中央に胚)
b) 液体窒素でのGL-Tipの保管法
上: 0.5cc精液ストロー、中: GL-Tip保管容器
下: 先端部を切断した0.5cc精液ストロー

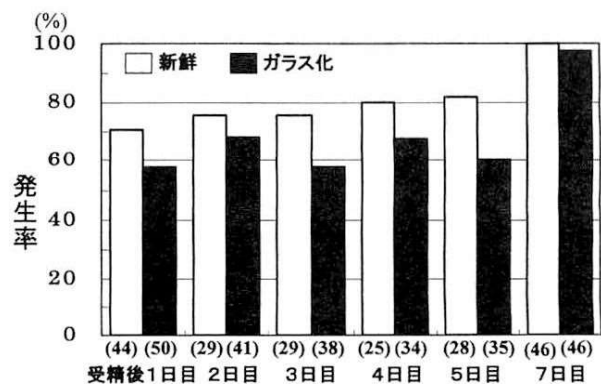


図2 ガラス化した牛体外受精胚の胚盤胞への発生成績
()内は供試胚数