

2 牛高付加価値胚（受精卵）を利用するための凍結保存技術の改良

ねらいと成果

1982年8月に兵庫県で第1号の凍結受精卵移植産子が誕生後約20年間に、胚の長期保存技術は胚操作技術とともに飛躍的に進歩している。

体内回収胚の移植では耐凍剤としてエチレングリコール(E)を用いたダイレクト法が普及している。このような緩慢凍結法では、1～2Mの濃度、凍結点より高い温度での植氷、-30～-40℃までの0.3～0.5℃/分での冷却速度、30～37℃の融解温度が胚の生存に大きな影響を与え、浸透圧ショック、細胞内外の氷晶や細胞内塩類濃度の上昇が細胞傷害の要因と考えられている。

一方、ガラス化法は4～5Mという高濃度の耐凍剤を用いるために、胚を含む溶液は超低温下でも無定型構造をとり、氷晶を作らない。しかし、高濃度の耐凍剤による細胞毒性、浸透圧ショック、脱ガラス化した場合の氷晶形成が胚の生存に大きな影響を与える。

近年、ガラス化を容易にするために、ガラス化容器を工夫することにより冷却速度を著しく速める超急速ガラス化法が開発された。

著者らはゲル・ローディング・チップを用いた超急速ガラス化法（GL-Tip法）を開発し（本誌No.119）、凍結が困難な高付加価値胚の超低温保存にこの方法を応用した結果、良好な成績が得られた。

表1 体外受精由来7日目胚盤胞の生存性

凍結方法	供試胚数	生存率
ダイレクト法	48	68.5 ^b
GL-Tip法	46	97.8 ^a

ab 異符号間に有意差(P<0.05)

表2 性判定・体内回収胚の移植成績

ガラス化方法	移植		受胎率
	頭数	頭数	
VSED法	320	119	37.0 ^a
GL-Tip法	131	62	48.1 ^b
新鮮胚区	53	26	49.1 ^b

ab 異符号間に有意差(P<0.05)

平成14年度受精卵移植普及定着化事業共同試験における14県の成績

内容

体外受精7日目胚盤胞の凍結後の生存性について、GL-Tip法と緩慢凍結法のダイレクト法（1.5ME+0.2Mトレハロース、-6℃で植氷後-30℃まで0.3℃/分で冷却）とを比較した。その結果、GL-Tip法はダイレクト法より生存率が有意に高くなった（表1）。また、性判定した体内回収胚を用いたガラス化加温胚の移植による受胎率について、GL-Tip法とVSEDガラス化法（25%E+25%DMSO、0.25ml精液ストロー使用）とを比較した。その結果、GL-Tip法がVSED法より受胎率が有意に高く、対照区の新鮮胚と差がみられなかった（表2）。さらに、性判定のために、3～4日目の8～16細胞期胚をサンプリングし、発生した7日目胚盤胞を用いて、GL-Tip法によるガラス化、加温後の生存性を調べた。その結果、対照区のサンプリングしない胚と差がみられなかった（図）。

高付加価値を与えるために、人為的に種々の操作を行った胚は凍結が難しいと言われるが、GL-Tipガラス化法を利用することにより、高い生存率及び受胎率が得られることが明らかとなった。

今後の方針

経陰採卵・核移植・性判定胚及び卵子などの超低温保存に利用する。

富永 敬一郎（部長（生工））

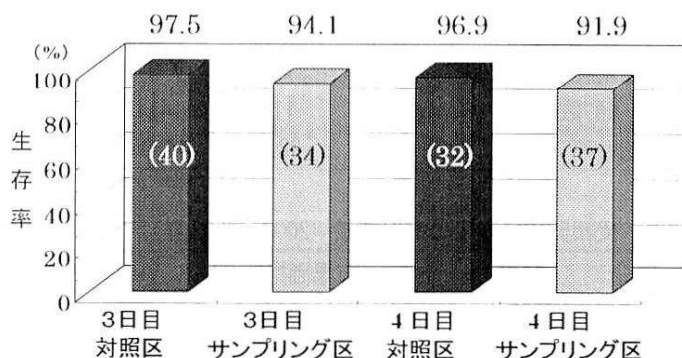


図 GL-Tip法でガラス化した7日目胚盤胞の生存性 ()は検査胚数。