

凍結保護物質にエチレングリコールを用いたウシ体外受精 由来凍結胚のストロー内希釈・移植法の検討

福島護之・富永敬一郎・秦谷 豊

要 約

エチレングリコール (以下 EG という) を用いて凍結保存したウシ体外受精由来胚盤胞を融解後、ストロー内希釈後直接移植を行うために、1.4 mol/l EG の胚盤胞内への浸透性並びに凍結融解後の凍結保護物質希釈方法による生存性の比較を行った。さらに、ストロー内へ 1.4 mol/l EG と BMOC-3 液を封入し、凍結及び融解後の希釈方法による生存性と受胎性を比較した。

- 1 EG は、グリセロール (以下 GL という) に比較して胚への浸透性が高かった。
- 2 GL は段階希釈法で生存胚率が高かったが、EG では段階希釈法と直接希釈法の間に有意な差は認められなかった。
- 3 凍結融解後に EG 存在下で 10 分以上放置すると生存性が 78 % に低下し、さらに 30 分以上放置した場合にその生存性が極端に低下する。
- 4 ストロー内 EG 希釈・直接移植した場合の受胎率は、35.7 % (10/28) で対照とした GL の 2 段階希釈・直接移植後の受胎率は 58.6 % (17/29) であった。

Effects of Dilution Procedure and Encapsulation Method on Viability of Bovine IVM-IVF-IVC Embryos Frozen by Ethylene Glycol

Moriyuki FUKUSHIMA, Keiichiro TOMINAGA and Yutaka HATAYA

Summary

The purpose of this study was to improve the dilution procedure and encapsulation method for high viability of bovine IVM-IVF-IVC embryos frozen using ethylene glycol. The results were obtained as follows.

- (1) Permeability to embryo of ethylene glycol (EG) was higher than that of glycerol (GL).
- (2) Stepwise method had a high survival rate in GL as cryoprotectant, but there was no difference in EG as cryoprotectant during the stepwise method and the direct elimination method.
- (3) After thawing, when the embryo was kept for 10 min. in cryoprotective medium added 1.4 mol/l EG, the survival rate fell to 78 %. If kept for another 30min, the survival rate fell greatly.
- (4) The conception rate of the direct transfer method of EG as cryoprotectant was 35.7 % and the rate of the 2-step method of GL as cryoprotectant was 58.6 %.

キーワード：エチレングリコール、体外受精由来胚、胚盤胞、凍結保存、直接移植

緒 言

ウシ胚の凍結保護物質にはグリセロール (以下 GL という) が広く用いられている。GL は、細胞毒性が低く保護効果も高いが融解後に段階的又はシュークロス (以下 Su という) 等を用いて GL を希釈してやる必要があり、現場での簡易な融解には不向きである。Kasai⁹⁾

は、エチレングリコール (以下 EG という) は、GL と同様にマウス胚への毒性が低く、凍結保護物質として有効であることを報告している。また、浦野ら⁹⁾ はマウス胚を用いた凍結実験で種々の凍結保護物質のうち EG が直接希釈した場合においても高い生存率が得られることを示した。ウシ胚においても EG を用いた直接希釈・直接移植によって高い受胎率を得たとする報告が成されるようになった^{2, 10)}。

本研究では、EGを用いて凍結保存したウシ体外受精由来胚盤胞を融解後、ストロー内希釈後直接移植を行うために、1.4 mol/l EGの胚盤胞内への浸透性並びに凍結融解後の凍結保護物質希釈方法による生存性の比較を行った。さらに、ストロー内へ1.4 mol/l EGとBMOC-3液を封入し、凍結及び融解後の希釈方法による生存性と受胎性を比較した。

材料及び方法

体外受精由来胚盤胞は、福島ら³⁾の方法により作出した。

実験1：凍結保護物質の浸透性の検討

体外受精由来胚盤胞への凍結保護物質の浸透性を検討するために、以下の実験を行った。凍結基礎媒液は、33%子牛血清を添加したリンゲル氏液を用いた。また、発生培地は、1%子牛血清を添加した25 mmol/lへpes緩衝TCM-199(GIBCO社製)を用いた。直径90 mmの滅菌シャーレに1.4 mol/l EG, 1.4 mol/l GL及びTCM-199の発生培地の3種類の媒液をそれぞれ0.5 mlの小滴とし、37℃に保温した。計18個の体外受精由来胚盤胞を各区に7個、5個と6個配置し、胚盤胞を小滴中へ1個ずつ浸漬して3, 5, 10, 20, 30及び60分後に個々の胚盤胞の写真を撮影した。各胚盤胞の写真の直角に交差する直径を測定し、その平均値が浸漬前の同じ胚の平均直径に対する割合を求め時間的変化を検討した。各処理区間の結果を、Duncan's new multiple range test⁵⁾により統計処理した。

実験2：凍結保護物質の希釈方法による胚の生存性

1.4 mol/l EGとGLで凍結融解した胚を凍結保護物質を6段階又は、直接発生培地へ投入する直接希釈を行い、培養後の胚の生存性を検討した。凍結曲線は、室温から-5.2℃まで1℃/分で冷却後、植氷を行い、さらに10分間を-5.2℃で保持した後に-35℃まで-5℃

/分で冷却後-196℃の液体窒素中に直接投入して凍結した。37℃の温湯中にストローを投入し、15秒で胚を融解した。

6段階法では、融解胚をEG又はGLを1.15, 0.92, 0.7, 0.46, 0.23及び0 mol/l含む凍結基礎媒液に5分間ずつ浸漬し、発生培地で洗浄した後、単層培養した卵丘細胞と供培養して胚盤胞への回復又は脱出胚盤胞への発育を観察した。直接希釈区では、融解直後の胚を、微量の凍結保護物質を含む培養液とともに発生培地へ投入し、洗浄後に6段階希釈区と同様に培養した。

実験3：EG中での凍結・融解胚の放置時間が胚の生存性に及ぼす影響

EGで直接希釈を行うにあたって、移植(洗浄)までの放置時間が、その後の胚の生存性に及ぼす影響を検討した。1.4 mol/l EGとBrinster's mouse ova culture medium-3(以下BMOC-3という)を1:8の割合で封入し、ストロー内でEG希釈を実施した。ストロー内で10~30分間放置(37℃の温湯中)し、洗浄、培養した後、胚の生存性を検討した。無希釈区でも同様に10~30分間ストロー内に放置後、胚を培養液で洗浄、培養し、生存性を検討した。対照区は実験3の融解直後に胚を直接希釈したものと同様とした。

実験4：EG希釈後直接移植による受胎性の検討

発情7日目の未経産F₁雌牛のうち黄体の形成が確認されたウシのみにストロー内EG希釈した胚を直接移植して受胎性を検討した。なお、対照区としてGLを用いた2段階希釈法⁴⁾による直接移植を実施したウシの受胎率と比較した。

結果

実験1：凍結保護物質の浸透性の検討

各区胚盤胞の胚容積の変化をFig. 1とTable 1に示した。対照区とEG区では、各時間で有意差はなかった。

Table 1. Changes in the volume of embryos during exposure to glycerol (1.4 mol/l) and ethylene glycol (1.4 mol/l) solution

Cryo-protectants	No. of blastocysts	Relative percentages* in volume at each exposure period (min.)					
		3	5	10	20	30	60
Control	6	100.3 ^a ±1.3	100.2 ^a ±1.4	101.0 ^a ±1.5	101.0 ^a ±1.3	101.6 ^a ±1.0	102.5 ^a ±1.5
Glycerol (1.4 mol/l)	5	84.9 ^b ±7.8	82.5 ^b ±15.5	83.7 ^b ±14.4	85.1 ^b ±13.4	87.2 ^b ±11.7	90.3 ^d ±12.4
Ethylene glycol (1.4 mol/l)	7	98.7 ^a ±0.6	99.4 ^a ±1.9	100.8 ^a ±3.1	100.7 ^a ±3.3	101.5 ^a ±3.3	101.7 ^a ±2.9

The different superscripts are significantly different in the same column : a vs b ; (P<0.01), c vs d ; (P<0.05).

* : Mean ± S. D.

EG区では浸漬の3分後に浸漬前の99±0.6%に収縮したが、その後は浸漬前の大きさに回復していた。一方、GL区では3～30分の間83～87%に収縮し、1%水準で有意差がみられたが、60分後には90%にまで回復した。

実験2：凍結保護物質の希釈方法による胚の生存性

生存性では、GL区では直接希釈の40%に比較して6段階希釈区の88.9%が、また、EG区では6段階希釈区の63.2%に比較して直接希釈区の90.0%が高かった (Table 2)。

実験3：EG中での凍結・融解胚の放置時間が胚の生存性に及ぼす影響

ストロー内希釈、無希釈区ともにストロー内で30分放置した場合に生存性が低下した。有意差はなかったがストロー内希釈区の生存性が高かった (Table 3)。

実験4：EG希釈後直接移植による受胎性の検討

ストロー内EG希釈後移植を行い、受胎性を検討した。ストロー内EG希釈・直接移植した場合の受胎率は、35.7% (10/28) で対照とした、GL2段階希釈・直接移植後の受胎率は58.6% (17/29) であった (Table 4)。

Table 4. Different cryoprotectance and pregnancy rate of frozen-thawed bovine blastocysts matured, fertilized and developed in vitro

Cryoprotectance	No. (%) of recipients	
	Transferred	Pregnant
Glycerol	29	17 (58.6)
Ethylene glycol	28	10 (35.7)

Table 2. Different methods of removing cryoprotectants, glycerol and ethylene glycol, and viability of frozen-thawed bovine blastocysts matured, fertilized and developed in vitro

Cryoprotectants (1.4mol/l)	elimination method	No. of experi- ments	No. (%) of embryos		
			Examined	Survived*	Developed**
Glycerol	Stepwise	3	18	16 (88.9)	6 (37.5)
	Non-step	3	20	8 (40.0)	1 (12.5)
Ethylene glycol	Stepwise	3	19	12 (63.2)	3 (25.0)
	Non-step	3	20	18 (90.0)	6 (33.3)

* : Rate of embryos examined.

** : Rate of embryos survived.

Table 3. Effects of holding time on the viability of frozen-thawed bovine blastocysts matured, fertilized and developed in vitro

Holding condition after thawing	Holding time (min.)	No. of experi- ments	No. (%) of embryos		
			Examined	Survived*	Developed**
Control	0	3	20	18 (90.0) ^a	6 (33.3)
	10	3	17	10 (58.8) ^{ab}	5 (50.0)
	20	3	22	13 (59.1) ^{ab}	6 (46.2)
Non-dilution	30	3	22	9 (40.9) ^b	2 (22.2)
	10	3	23	18 (78.3) ^a	7 (38.9)
	20	3	22	17 (77.3) ^a	9 (52.9)
One-step dilution	30	3	28	10 (35.7) ^b	4 (40.0)

a,b : The different superscripts are significantly different in the same column (P<0.05).

* : Rate of embryos examined.

** : Rate of embryos survived.

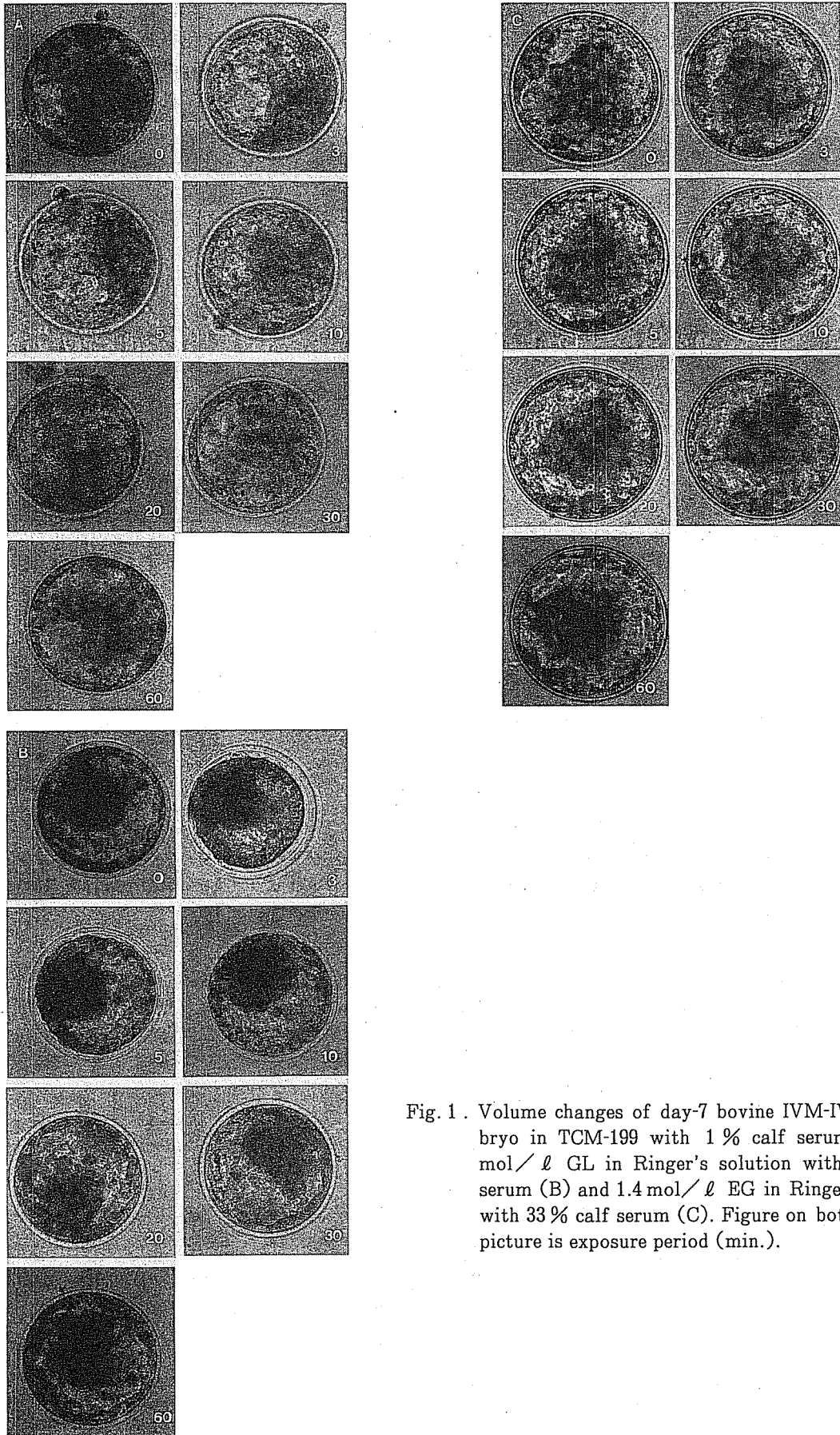


Fig. 1 . Volume changes of day-7 bovine IVM-IVF-IVC embryo in TCM-199 with 1 % calf serum (A), 1.4 mol/l GL in Ringer's solution with 33 % calf serum (B) and 1.4 mol/l EG in Ringer's solution with 33 % calf serum (C). Figure on bottom of the picture is exposure period (min.).

考 察

実験1から、EGは、GLに比較して胚への浸透性の高いことが明らかとなった。EGの場合も、実際には3分以内に収縮して再度拡張していると考えられるが、今回のように3分以上の間隔での計測ではほとんど変化が認められなかった。この結果から、GLに比較してEGの細胞浸透性の高いことが知られた。このことは、凍結保護物質の除去時の速度も同様に速いことが推察された。また、EGを用いた場合には凍結保護物質の平衡のために数分で十分であると考えられた。

浦野ら⁹⁾は、マウス8細胞、桑実胚、初期胚盤胞と胚盤胞において1価から5価までのアルコール及びジメチルスルホキシド(以下DMSOという)を凍結保護物質として用い、保護効果と同時に凍結保護物質の除去方法を検討している。その結果、EG、GLとDMSOは凍結保護物質として有効であり、特にEGは、リン酸緩衝食塩水(以下PBSという)への直接投入でも0.5 mol/l Suに浸漬させてからPBSに投入する2ステップ法の何れの方法でも高い生存率が得られたと報告している。また、凍結保護物質の除去法については、羊胚を用いたTervitとGoold⁸⁾の報告で、DMSOやEGは直接希釈法でも段階希釈法と同様の生存率を得たが、GLでは直接希釈法の結果が低下するとしている。

Coceroら¹⁾は、羊胚を用い、0.25 mol/l Suで凍結保護物質を除去する実験でEGがGLに比較して高い生存率を得たと述べている。VoelkelとHu¹⁰⁾も直接希釈法によって体内受精由来胚の高い受胎率を報告している。このように、EGは、GLに比較して細胞内への透過性が高いため、除去時においても、必ずしもSuなどを必要とせず多くの種で、直接希釈法によっても段階希釈法と比べても、大きく生存性が低下しない。今回、実験2で検討したところ、ウシ体外受精由来胚でも同様の傾向が認められた。すなわち、GLでは段階希釈法が高かったが、EGでは段階希釈法と直接希釈法の間に有意な差は認められなかった。しかし、GLの段階希釈区に比較して低い傾向であった。以上より、EGを凍結保護物質として用いることによって体外受精由来胚盤胞においても直接移植の可能性が示唆された。

各種凍結保護物質を用いてマウス胚を浸漬した場合の生存性及び凍結・融解した場合の生存性を検討したKasaiら⁶⁾の報告ではEGは、GLと同程度に毒性が少なく、同時に胚の凍結保護作用が高いことを報告している。一方、下平ら⁷⁾は、新鮮胚又は凍結・融解胚をEG中で40～60分放置後、EGを直接希釈する試験からEGは、新鮮胚に対しては毒性は示さないが、融解後は

凍結保護物質除去までの経過時間が長くなることによって胚の生存性が損なわれる可能性があるとして述べている。今回の結果からもEGはGLに比較して細胞内への浸透性も高いものの、凍結融解後にEG存在下で10分以上放置すると生存性が80%以下に低下し、さらに30分以上放置した場合にその生存性が極端に低下するので、使用する場合には注意を要することが明らかとなった。以上の結果は、安定した高い生存率を得るには、融解直後にストロー内で予め等張の培養液で希釈したほうが良いと報告している、VoelkelとHu¹⁰⁾と同様であり、今回の結果を支持するものと考えられた。

直接希釈法を用いた移植後の受胎性について、ウシの生体由来の胚を用いた堂地ら²⁾の報告では、1.8 mol/l EGを用いて凍結後直接移植した場合には従来の1.4 mol/l GLを0.25 mol/l Suで挟んだ場合と差は見られず69%の高い受胎率であったと報告している。

今回用いたウシ胚盤胞は体外受精・体外培養由来であるため体内発生胚に比較して凍結抵抗性が異なること³⁾が考えられるが、35.7%と低い受胎率であった。今後、低温抵抗性が低いと考えられる体外受精由来胚盤胞においても、融解後の等張液への浸漬時の浸透圧ショックを和らげる条件を検討するなどして、より高い受胎率の得られる簡易な凍結・融解・移植法の検討が必要であると考えられる。

引用文献

- (1) Cocero M. J., R. Procureur, J. De La Fuente and D. Chupin (1988): Glycerol or ethylene glycol for cryoprotection of deep frozen ewe embryos: Theriogenology 29, 238 (Abstr.)
- (2) 堂地 修・今井 敬・高倉宏輔(1991): Ethylene glycolを用いて凍結したウシ胚のDirect transfer法による移植: 第84回日畜学会大会講演要旨 61
- (3) 福島護之・富永敬一郎・秦谷 豊・内海恭三(1992): ウシ体外受精由来胚盤胞の凍結能についての特性: J. Reprod. Devel. 38, j 49-j 54
- (4) 福島護之・富永敬一郎・秦谷 豊・内海恭三(1992): 体外受精・体外培養法で作出されたウシ胚盤胞の凍結融解後の受胎性: 繁殖技術会誌 14, 1-5
- (5) Harter H. L. (1960): Critical values for Duncan's new multiple range test: Biometrics 16, 671-685.
- (6) Kasai M., K. Niwa and A. Iritani (1981): Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos: J. Reprod. Fert. 63, 175-180

- (7) 下平乙夫・後藤裕司・今井 敬・富澤宗高・斎藤政宏・奥地弘明・堂地 修(1993): 1.5M Ethylene Glycol で凍結された牛体外受精胚からの耐凍剤除去方法の検討: 哺乳卵学誌 10, 33-34
- (8) Tervit H. R. and P. G. Goold (1984): Deep-freezing sheep embryos: Theriogenology 21, 268 (Abstr.)
- (9) 浦野浩司・高橋芳幸・金川弘司(1986): 凍結融解後のマウス胚生存性に及ぼす各種凍結保護剤の効果: 家畜繁殖誌 32, 130-133
- (10) Voelkel S. A. and Y. X. Hu (1992): Use of ethyleneglycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryo to recipient females: Theriogenology 37, 687-697