受精卵凍結装置の開発とウシ受精卵への応用

井上忠恕・吉田光敏・金川弘司

坂尾伸夫*・倉岡泰郎*

(北海道大学獣医学部 *ほくさん研究所)

WHITTINGHAM ら¹⁾ および WILMUT²⁾ によってマウス凍結卵の成功例が報告されて以来、ウシ受精卵についても応用され、すでに海外においてはかなりの成功例が報告されているが³⁻¹²⁾、国内での成功報告例は杉江ら¹⁶⁾のほか数例¹⁷⁻¹⁹⁾にすぎない。海外でのウシ受精卵の凍結・融解後の受胎成績も必ずしも一定したものではなく、しかも実験小動物に比べてその受胎性は悪く、ウシ受精卵の凍結保存法が確立されたとはいえない。

今回、著者らは受精卵凍結過程で問題の1つとなっている植氷時の温度上昇をできるだけ避けるように工夫をした受精卵凍結装置を開発した。また、この装置を使用してウシ受精卵4個を凍結保存した後、形態学的な観察を行い、4頭の受卵牛に移植試験を試みたところ1頭が妊娠したので報告する。

材料と方法

1. 凍結装置

凍結装置は図1に示した通りで、恒温槽、温度制御盤および加圧式液体窒素素容器からなっている。恒温槽は図2に示した通り、断熱槽、液体窒素槽、ヘリウムスペースおよびフレオン槽からできている。フレオン槽は気相部および液相部(フレオン11)の2つに分れ、両部の冷却は液体窒素の冷熱によって行われる。液体窒素槽からの冷熱はヘリウムスペースに密封されている熱交換用ヘリウムガスによって、一定速度でフレオン槽内に伝達される。この冷却とフレオン槽内ヒーターの作動は槽内の温度を測定するモニター用温度センサーからの読み取りを通じて、ヒーター電流をPID制御(比例積分微分動

作制御)する温度制御盤のマイクロコンピュータによって制御され、設定した任意の温度と冷却速度が保持される。この温度と速度は数段階に分けてキー入力できるようにプログラミングされている。気相部には凝固点温度(植氷)を予め検知できるように温度測定センサーが付属されており、液相部は温度勾配がほとんどないように攪拌機によって常に攪拌されている。

2. 凍結方法

受精卵を入れない培養液のみの精液凍結用0.25 ml プラスチックストローをフレオン槽内に入れ、温度測定センサーによって予め凝固点温度(植氷)を測定する。次いで、受精卵の入ったストローを4/5は液相部に、残りの1/5は気相部に位置するように立てて保持し、室温から植氷温度まで下降させる(図2, 3)。この過程で、気相部は約-50.0°Cに冷却されているためにストロー先端1/5では既に植氷が起り、凍結凝固している。しかし、液相部にあるストローの4/5は槽内にあるフレオン11液とともに温度制御されているために、気相部の温度影響は受けずに、設定した任意の温度に維持されているフレオン11液とともにストロー下部の4/5が凝固点温度に到達すると、既に凍結している気相部内にあるストロー内(上部1/5)から氷晶の生長により植氷(ice seeding)が成立し、直ちにストロー内全体が凝固状態になる。しかし、この時の潜熱発生はストローを取り囲むフレオン11液の温度制御によって著しく抑制されて、殆んど温度の上昇がみられない。

3. 供試受精卵

受精卵を提供したウシは7才のホルスタイン種で、体重700 kg、過去6回の産歴を有する。前回の発情から11日目に妊馬血清性性腺刺激ホルモン4,000 IU(ビーメックス、三共ゾーキ(株))を筋肉内投与し、その2日後にプロスタグランジン F_{2α} 25 mg(プロナルゴン F、日本アップジョン(株))の筋肉内投与により発情を誘発した。この発情期間中にはほぼ12時間間隔で3回の人工授精を行い、この発情から8日目に既報の方法による非

Development of computer controlled freeze-thaw apparatus and its application for bovine embryo.

INOUE, Tadahiro, Mitsutoshi YOSHIDA, Hiroshi KANAGAWA, Nobuo SAKAO* & Yasuo KURAOKA* (Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo 060 & *Hoxan Research Laboratories, 5-2 Kikusui, Sapporo 003)

Japan. J. Anim. Reprod. 28 (3), 1982.

Table 1. Transferred recipients

No.	Estrus synchronization		Side		Return of estrus (days)	Pregnancy
	PGF _{2α} (mg)	Standing (h)	CL ¹⁾	Transfer		
1 ²⁾	26	45	Right	Right	42	—
2 ³⁾	15	69	Right	Right	—	+
3 ³⁾	15	69	Left	Right	21	—
4 ³⁾	15	69	Right	Right	42	—

¹⁾ Corpus luteum.

²⁾ Donor was used as a recipient.

³⁾ Heifers.

手術的子宮還流による受精卵回収を行った²⁰⁾。

卵回収に先立って直腸検査による触診で卵巣には左右合せて約 10 個の黄体が観察された。子宮還流に使用した液は組織培養液 (イーグル MEM, 日水製薬 (株)) で、左右子宮角を別々に 50 ml の還流液で、それぞれ 3 回ずつ還流し、全還流液をペトリ皿に移して実体顕微鏡下で検査した。その結果、左側から 9 個および右側から 2 個、計 11 個の受精卵が得られた。回収受精卵の発育ステージは初期胚盤胞が 9 個および桑実胚が 2 個であった。このうち初期胚盤胞および桑実胚からそれぞれ 2 個ずつを今回の凍結実験に使用し (図 5)、残り 7 個は他の移植実験に供した²¹⁾。

4 個の受精卵はイーグル MEM からプリンスター液 (BMOC-3, GIBCO) を含む試験管に移して、約 100 km 離れた実験室に運び、卵回収 5 時間後に次の要領で凍結実験を開始した。

4. 受精卵の凍結

受精卵を室温 (+20.0°C) でウシ胎児血清を 20% に加えた加えたリン酸緩衝液 (Dulbecco PBS, GIBCO) で 2 回洗浄後、この液に次の濃度でグリセリンを加えた 4 段階の各液: 0.18, 0.33, 0.57 および 0.88 M にそれぞれ 5 分間ずつ平衡させた。その後、グリセリン濃度が 1.0 M の液で 30 分間平衡させたのちに、受精卵を 1 個ずつ 0.25 ml の精液用プラスチックストローに図 2 に示したように入れ、凍結装置のフロン槽内に移して凍結を開始した。

温度の下降と時間の経過は図 4 に示した通りで、室温から -4.0°C までは 1 分間当たり 1.0°C まで下降させた。-4.0°C で 3 分間保持し、この間に自動的に植氷が行われた。-4.0°C から -35.0°C までは 1 分間当たり 0.3°C で、また -35.1°C から -36.0°C までは 1 分

間当たり 0.1°C で下降させた。-36.0°C から直ちに -100.0°C の別容器に移して 10 分間保持し、その後直接液体窒素内 (-196.0°C) に投入して、55 日間凍結保存した。

5. 受精卵の融解と移植

凍結受精卵入りのストローを液体窒素から直接 +25.0°C の温湯に 10 秒間入れて融解した。その後、室温で 20% ウシ胎児血清加 PBS にグリセリン濃度が 0.88, 0.57, 0.33 および 0.18 M の液にそれぞれ 10 分間ずつ入れて、PBS 液で 2 回洗浄後 BMOC-3 に移植まで 1~3 時間保存した。

凍結・融解卵を移植した 4 頭の受卵牛はいずれもプロナルゴン F 15~25 mg を投与して発情同期化を行ったホルスタイン種で、発情後 7 日目が 3 頭および 8 日目が 1 頭であった (表 1)。移植方法は既報の臍部切開法に従って行った²²⁾。

成 績

1. 受精卵凍結装置の温度制御

本凍結装置の使用により、冷却時の温度制御は図 4 に示した通りで、±0.1°C 以内の誤差範囲であった。凝固点を予知する機能も正確で -4.0°C を読み取り、-4.0°C で 3 分間保持することによって植氷時の温度上昇は 1.0°C 以内に抑えることができた。

2. 凍結・融解卵の形態

凍結・融解後の受精卵の形態は図 6 に示した通りで、4 個とも透明帯および細胞膜に損傷や異常は観察されず、卵細胞の表面および各分割球にも変性などの異常は認められなかった。しかし、透明帯内部での分割球全体がやや縮小を示しており、特に初期胚盤胞の 2 個は胞胚腔がみられず、桑実胚に逆行したような状態を示した

(図 6)。

3. 移植

1 個ずつ移植した 4 頭の受卵牛のうち 1 頭は 1 回目の発情周期に、2 頭は 2 回目の発情周期に発情回帰があり、45 日目の直腸検査でも非妊娠と診断された。残りの 1 頭は発情回帰がなく、45 日および 60 日目の 2 回にわたって複数の獣医師によって直腸検査が行われ、妊娠と診断された (表 1)。

考察とまとめ

生物材料や受精卵の凍結用に冷却曲線を自動的にプログラムできる装置は数種類開発されているが、これらの装置は植氷時の制御が不十分であり、試料を入れてある冷凍室を開放して、外部から冷媒や冷体で刺激を加えたり、氷晶片を投入したりして植氷を行っているために、冷凍室の温度が変動する欠点がある。また、植氷に伴う著しい温度の上昇がみられるのが普通である。これらの温度変動が凍結しようとする受精卵に何らかの悪影響を与えるものと考えられるが、今回著者らは植氷時に工夫を加えて、冷凍室を開放したり、外部から操作することなしに植氷を行い、植氷に引続いて起る温度上昇を 1.0°C 以内に抑えることができた。また、下降時の温度も変動範囲が 0.1°C 以内に制御できた。

上記凍結装置を用いて BILTON²³⁾ の方法に準じて、ウシ受精卵 4 個の凍結融解を行ったが、4 個ともに分割球全体にほんの少しの縮小がみられたほかは、形態学的に損傷および異常は認められなかった。この分割球全体の縮小は受精卵の発育ステージ、特に胞胚腔が形成し始めた初期胚盤胞の胞胚腔内容の変化によるものか、培養液として使用した緩衝液あるいは耐凍剤として添加したグリセリンの要因によるものなのかは今後の研究課題と考える。

4 個の凍結融解卵を 4 頭の受卵牛に移植したところ、1 頭は 1 回目の周期に発情の回帰があったが、残り 3 頭は発情回帰がなく、このうち 1 頭が妊娠と診断された。初回の周期で発情回帰を示さなかった非妊娠の 2 頭は胚の早期死によるものか、他の原因によるものかは不明であるが、今後更に例数を重ねて検討を加えたい。

(1982. 4. 15 受付)

文 献

- 1) WHITTINGHAM, D. G., S. P. LEIBO & P. MAZUR: *Science* (Wash. D. C.), **178**, 411, 1972.
- 2) WILMUT, I.: *Life Sci.*, **11**, 1071, 1972.
- 3) BILTON, R. J. & N. W. MOORE: *J. Reprod. Fert.*, **46**, 537, 1976.
- 4) BILTON, R. J. & N. W. MOORE: *J. Reprod. Fert.*, **50**, 363, 1977.
- 5) GREVE, T. & H. LEHN-JENSEN: *Theriogenology*, **11**, 99, 1979.
- 6) KANAGAWA, H., J. FRIM & J. KRUUV: *Can. J. Anim. Sci.*, **59**, 623, 1979.
- 7) LEHN-JENSEN, H. & T. GREVE: *Theriogenology*, **9**, 313, 1978.
- 8) MASSIP, A., P. VAN DER ZWALMEN, F. FACTORS, R. DECASTER, G. D'ETEREN & C. HANZEN: *Theriogenology*, **12**, 79, 1979.
- 9) SCHNEIDER, U. & J. HAHN: *Theriogenology*, **11**, 63, 1979.
- 10) SHEA, B. F., G. W. OLLES & M. E. JACOBSON: *Can. J. Anim. Sci.*, **57**, 801, 1977.
- 11) TERVIT, H. R. & R. P. ELSDEN: *Theriogenology*, **15**, 395, 1981.
- 12) TROUNSON, A. D., B. F. SHEA, G. W. OLLIS & M. E. JACOBSON: *J. Anim. Sci.*, **47**, 677, 1978.
- 13) WILLADSEN, S. M., C. POLGE & L. E. A. ROWSON: *J. Reprod. Fert.*, **52**, 391, 1978.
- 14) WILLADSEN, S. M., C. POLGE, A. O. TROUNSON & L. E. A. ROWSON: *Freezing of Mammalian Embryos*, p. 190, Elsevier Exerpta Med., Amsterdam, 1977.
- 15) WILMUT, I. & L. E. A. ROWSON: *Vet Rec.*, **92**, 686, 1973.
- 16) 杉江 (信)・角田 (幸)・相馬 (正): 本誌, **25**, 203, 1979.
- 17) 鈴木 (達): 畜産コンサルタント, **205**, 55, 1982.
- 18) 加藤 (雅)・白井 (健)・黒田 (博)・知久 (幹)・森 (啓)・加藤 (三)・入江 (達): 第 23 回哺乳動物卵子談話会 (抄録), **27**, 1982.
- 19) 内海 (恭)・藤井 (好)・湯原 (正)・富永 (敬)・道後 (泰)・猪 (八)・西村 (和)・大西 (悦)・松山 (謙): 第 23 回哺乳動物卵子談話会 (抄録), **29**, 1982.
- 20) 金川 (弘)・日獣会誌, **33**, 363, 1980.
- 21) 井上 (忠)・金川 (弘)・久保 (勝): 北獣会誌 (準備中).
- 22) 小賀野 (義)・井上 (忠)・金川 (弘): 繁殖技術, **119**, 1, 1981.
- 23) BILTON, R. J.: *Proc. 9th Int. Cong. Anim. Reprod. AI.*, Madrid, p. 245, 1980.

PLATE

Explanation of Plate

Fig. 1. A micro-computer controlled freeze-thaw apparatus.

A: Control panel, B: Freeze-thaw bath, C: Tank of liquid nitrogen.

Fig. 2. Illustration of freeze-thaw bath.

A: Insulation space, B: Liquid nitrogen space, C: Helium space, D: Electrical heater, E: Temperature control sensor, F: Gaseous phase, G: Liquid phase, H: Embryo inside of straw, I: Air inside of straw, J: Stirrer.

Fig. 3. Straw carrier.

A: Temperature sensor for freezing point, B: Straw.

Fig. 4. Temperature curve and ice seeding (arrow).

Fig. 5. Bovine embryos before freezing ($\times 70$).

Fig. 6. Same embryos after thawing ($\times 70$).

Summary

A micro-computer controlled freeze-thaw apparatus for embryo was developed. The apparatus can be freely programmed to choose the freezing temperature and the ice seeding can be smoothly performed with temperature increase held to within 1.0 C. Eleven bovine embryos were recovered non-surgically 8 days after estrus from one superovulated donor. Four blastocysts were frozen by using the apparatus and then they were stored in liquid nitrogen for 55 days. They were thawed in a 25.0 C waterbath for 10 seconds. After thawing, the embryos were examined under microscope and their morphological appearance was assessed being as good as before freezing. Four embryos were transferred to 4 recipients by the surgical method. One was diagnosed as a pregnancy by rectal palpation 60 days after transfer.