急速凍結融解法による牛受精卵子の生存性と移植試験

鈴木達行^{*1)} 高橋芳幸^{*1)} 下平乙夫^{*1)} 桶谷良至^{*1)} 斉藤則夫^{*2)}

(昭和 57 年 9 月 17 日受理)

Studies on Transfer of Cow's Embryos Rapidly Frozen and Thawed
TATSUYUKI SUZUKI (Hidaka National Livestock Breeding Station) et al.

SUMMARY

Seven, 54, and 10 embryos were transferred to solution N₂ at -20, -30, and -36°C, respectively, and then thawed rapidly at -360°C/min. The storage medium used were DB+20~50% BS or FCS in case of -20 and -30°C, and Ringer's solution +30%BS in case of -36°C. They contained 1.0M and 1.25M glycerol, respectively.

Of the 7 embryos in case of -20°C, only one survived and the others were regarded as degenerative ones at 48 hours of culture.

Of the 54 and the 10 embryos in case of -30 and -36°C, 25 and 5 survived, suffering from limited damage at 2 and 24 hours of culture, respectively.

Cows became pregnant when 3 of the 20 and 2 of the 5 embryos in case of -30 and -36°C, respectively, were transplanted to them.

要 約

-20, -30, -36°C の各温度域から液体窒素 (LN₂) へ浸漬した牛受精卵子の 7, 54, 10 卵について、急速融解後生存性を調べたところ、概略次の結果を得た。

1. 25M グリセリン加 PBS を凍結液とし、-20°C から LN₂ へ浸漬した 7 卵では、48 時間培養後 1 卵のみが生存し 6 卵が変性した。つぎに、1M グリセリン加 PBS を凍結液とし、-30°C から LN₂ へ浸漬した 54 卵では、25 卵が生存し、移植した 20 頭中 3 頭が受胎した。また、凍結液として 1M グリセリン加リンゲル氏液を用い、-36°C から LN₂ へ浸漬した 10 卵では 5 卵が生存し、移植した 5 頭中 2 頭が受胎した。

国内における牛凍結受精卵子の受胎成功例は、1974年に杉江ら^{8,9)}により 2 例報告されたのが最初であるが、当法は DMSO,あるいはエチレングリコールを耐凍剤として用いた緩慢凍結融解法であった。著者らは前報¹⁰⁾で BILTON ら³⁾の方法に準じて、グリセリンを耐凍剤として用いた急速凍結融解により 6 頭の受胎成功例を報告したが、その後、液体窒素 (LN₂) への投入温度を検討した試験で、-30°C, -36°C 別に、それぞれ 20 頭中 3 頭、5 頭中 2 頭、計 5 頭の受胎成功例を得たので、これまでの試験の概要を報告する。

1. 材料および方法

1) 受精卵の採取

供卵牛は、日高種畜牧場繋養のホルスタイン種 (12~14 カ月齢) 18 頭と新冠種畜牧場繋養のホルスタイン種 (4 才 6 カ月齢) 1 頭で、前者では妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG), 後者では卵胞刺激ホルモン (FSH) でそれぞれ過剰排卵処理したのち、発情開始後 7~8 日目に卵を回収した。灌流はイーグル MEM で非手術的に行い、回収した受精卵を BMOC-3 液、または、20% 牛血清加修正リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に浮遊し、凍結までの 7 時間以内を室温に保持した。

2) 凍結方法

LN₂ への浸漬温度が受精卵の生存性に及ぼす影響を調べるために、-20, -30, -36°C の各温度域から、受

*1) 農林水産省日高種畜牧場 (北海道浦河郡浦河町西舎535)

*2) 農林水産省新冠種畜牧場 (北海道静内郡静内町御園111)

写真1 -30°C から LN₂ へ浸漬し、75 日間
保存後融解した正常な形態を示す牛受精
卵 (Blastocyst)

写真2 -36°C から LN₂ へ浸漬し、151 日間
保存後融解した牛受精卵。細胞内に水胞
様物質がみられる (Morula)

精卵のそれぞれ 7, 58, 10 卵を LN₂ へ浸漬した。冷却は -45°C までを毎分 1°C, -45°C からそれぞれ -20, -29, -35°C までを毎分 0.3°C で冷却した。-20°C の場合は同温度で 15 分間保ち、-29, -35°C からはそれぞれ -30, -36°C に達するまで 0.1°C の速度で冷却したのち、-75°C または -100°C に 10 分間置き LN₂ へ浸漬した。

-20°C から LN₂ へ浸漬した 7 卵では、20% 牛血清加 PBS を凍結液とし、2.5 M-グリセロールを添加して用いた (最終グリセロール濃度は 1.25M)。また、-30°C から LN₂ へ浸漬した 58 卵では、PBS に牛血清 (BS) または牛胎児血清 (FCS) を 20~50% の割合に加え、-36°C から LN₂ へ浸漬した例では 10 卵につき、リンゲル氏液に 30% の割合で BS を加えたものであり、それぞれ 2M-グリセロールを添加して用いた (最終グリセロール濃度は 1 M)。グリセロールの濃度は 2 M の場合、0.18, 0.33, 0.57, 0.88, 1.0 および 2.5 M の場合、0.22, 0.41, 0.71, 1.1, 1.25M の 5 段階で、室温において各間を 5 分間隔で添加し 30 分間保持した。ついで卵の 1~7 個を約 0.2 ml, あるいは 0.3 ml の保存液を含む 0.25 あるいは 0.5 ml 容量の精液用プラスチック製ストローに入れ、-4.5°C に達したところで LN₂ に浸した鉗子で植氷させた。冷却はプログラミングフリーザー (大阪酸素製) を用いて制御した。

3) 生存性の判定

受精卵の生存性を確認するために、-196°C に 10~151 日間保存した受精卵を LN₂ から取り出し、25°C の温水中に直接振とうして融解させ、室温で添加過程と逆の方法でグリセロールを除去した。この場合、各段階の間隔を 10 分間とした。ついで、20% 牛血清加 PBS で 2 回洗浄したのち、同液で既報¹¹⁾に従って培養した。

-20°C から LN₂ へ浸漬した例では、20% 牛血清加 PBS で 72 時間培養し、胞胚腔のある元の形態に復したものを正常卵とした。-30°C から LN₂ へ浸漬した例では、20% 牛血清加 PBS で 37°C 2 時間培養したのち、

生存していると思われる受精卵を 1 個ずつ 20 頭の受卵牛に移植し、40, 60 日の 2 回にわたる直腸検査で受胎を確認した。移植に供さなかった受精卵は既報¹⁵⁾に従い BMOC-3 液で 37°C, 18~24 時間培養したのち、拡張した胚盤胞、あるいは透明帯から脱出中の胚盤胞まで発育したものを生存卵とした。また、-36°C から LN₂ へ浸漬した試験では、30% 牛血清加リンゲル氏液で 37°C, 2 時間培養し、生存していると思われる受精卵を 1 個ずつ 5 頭の受卵牛へ移植した。移植に供さなかった受精卵の生存性と妊娠鑑定は前述の要領で行った。

移植は、自然発情後 7 日目に未経産雌牛 25 頭につき、既報¹²⁾の外筒をつけたフランス製人工授精器 (Cassou gun) で非手術的に実施した。

2. 成 績

-20°C から LN₂ へ浸漬した透明帯から脱出中、または脱出した胚盤胞の 7 卵では、1 卵が融解後胞胚腔のある胚盤胞の形態をとどめ、48 時間培養時には形態的に正常と思われた。残り 6 卵は、いずれも細胞が黒ずんで萎縮し、立体感がなく、培養により正常な形態に復さなかった。

-30°C から LN₂ へ浸漬した 58 卵のうち、部分的変性の 2 卵と植氷の不手際でストローが破損した 2 卵、計 4 卵を除くと、54 卵が凍結前に正常と判定されたが、融解後には正常卵が 12 卵となり、11 卵が胞胚腔のある胚盤胞、1 卵が後期桑実胚であった。また、凍結により 10% 前後の部分的傷害を受けたと思われる受精卵は 13

表 1 凍結融解の方法別にみた牛受精卵の生存性

液体窒素 投入温 度	急 速 凍 結 融 解 法					
	凍結 卵数	融解 卵数	正常卵	部分的 傷害卵	変性卵	生存卵 割合
-20°C	7	7	1		6	14.2%
-30°C	54	54	12	13	29	46.3%
-36°C	10	10	3	2	5	50.0%

急速凍結融解法による牛受精卵の生存性と移植試験

表2 保存液別にみた牛受精卵の生存性

保存液	液体窒素元の投入温度	卵子の日齢	凍結卵のステージ	保存日数 (-196℃)	融 解 時 の 形 態				移植試験	
					融解卵数	正常卵	部分的障害卵	変性卵	移植例数	受胎例
20% FCS 加 PBS	-30℃	7		57~75日	25	9	1	15	8	1
20% BS 加 PBS	-30℃	8	Blastocyst	51~74日	6	0	4	2	5	1
			Expanding blastocyst		1	0	1	0	—	—
30% BS 加 PBS	-30℃	8	Blastocyst	56~75日	4	—	2	2	2	—
			Expanding blastocyst		2	—	1	1	—	—
			Hatched blastocyst		3	—	2	1	2	—
50% BS 加 PBS	-30℃	7	Morula	51~97日	3	1	1	1	—	—
			Blastocyst		2	2	—	—	2	1
			Expanding blastocyst		1	—	—	1	—	—
		8	Morula	96日	2	—	—	2	—	—
			Blastocyst		7	—	1	6	—	—
30% BS 加 Ringer's solution	-36℃	7	Expanding blastocyst	151日	2	—	—	2	—	—
			Morula		10	3	2	5	5	2

表3 凍結受精卵の供卵牛別受胎成績

供卵牛 番 号	供卵牛 の年齢	移植卵のステージ	保存日数 (-196℃)	移植卵数	受卵牛との 発情日差	受胎 / 移植 頭数 / 頭数
1.	14カ月	Blastocyst	51	2	-1	*1/2
		Expanding blastocyst		1		0/1
2.	14カ月	Blastocyst	74	2	-1	0/2
3.	13カ月	Hatched blastocyst	74	2	-1	0/2
4.	14カ月	Blastocyst	75	3	0	0/3
5.	13カ月	Blastocyst	75	5	0	1/5
6.	14カ月	Blastocyst	52	2	-1	0/2
7.	12カ月	Morula	97	1	-1	0/1
8.	13カ月	Blastocyst	51	2	-1	1/2
9.	4才6カ月	Morula	151	5	+2	1/4
					+1	1/1

注) *: 部分的傷害卵

卵で、このうち 10 卵が収縮した胞胚腔のある胚盤胞、2 卵が透明帯から脱出した胚盤胞であった。変性卵は融解後 29 卵となり、多くは細胞が黒ずんで立体感がなく細胞の輪郭が失われていた。これらの受精卵のうち部分的傷害卵を含む 20 卵を 20 頭の受卵牛に移植したところ、3 頭が妊娠した。妊娠した受精卵は、20% FCS 加 PBS, 20% BS 加 PBS, 50% BS 加 PBS で保存した各 1 例の胚盤胞であり、それぞれ 46, 47, 104 日間 LN₂ へ保存したものである。

-36℃ から LN₂ へ浸漬した 10 卵は、いずれも後期桑実胚であり、凍結前には 5 卵が正常な形態をとどめ、5 卵が部分的傷害卵であったが、融解後 3 卵が正常な形態をとどめ、2 卵が部分的傷害卵であった。また、残り 5 卵は細胞が黒ずみ立体感がなく、細胞内に 5~6 個の囊胞状物が散在してみられた。移植した 5 例では 2 頭が

受胎したが、このうち 1 卵は正常卵、他の 1 卵は部分的変性卵であり、供卵牛と受卵牛との発情日差は、それぞれ +2, +1 日であった。また、凍結保存日数は、いずれも 151 日間であった。

3. 考 察

急速凍結融解法では、たとえ細胞内に氷晶が生じても急速融解することにより胚の生存することが示唆されている¹⁸⁾。角田ら¹⁹⁾は家兎卵を凍結融解後、体外培養により生存性を確認したところ、-30~-50℃ の比較的高い温度域から LN₂ に浸漬し、急速に融解すると 85~91% が胚盤胞に発育したが、-20℃ の温度域から LN₂ に浸漬した例では、43 卵中 1 卵が胚盤胞に発育したにすぎなかったと述べている。本試験でも、-20, -30, -36℃ から LN₂ へ浸漬した受精卵の生存率は、それぞれ、14,

46, 50% となり, -20°C では極めて低い成績であった. これは比較的高い温度域から LN_2 へ浸漬する場合, -20°C では細胞が傷害を受けやすいことを示唆している.

-36°C から LN_2 へ浸漬した試験では, 凍結前に A ランクであった 5 卵は融解後も良好な形態をとどめており, 移植した 5 頭中 2 頭が受胎した. また, 移植に供した受精卵の 5 頭中 4 頭では, 供卵牛との発情日差が +2 日となり, 2 日間のズレがあったにもかかわらず受胎例が得られたことからすると, 本試験での移植の条件を有利にしていたならば, もっと多くの受胎例の得られたことが示唆される.

受精卵の発育ステージと凍結融解後の生存性とは密接な関係がある. 牛受精卵の発育ステージの若いものでは, 0°C の冷却で生存しなかったが, 後期桑実胚, 胚盤胞では生存性の失われないこと, 16~32 細胞卵を凍結した場合, 融解後すべての受精卵が変性したが, 桑実胚および胚盤胞を凍結した場合は, 融解後 70% 前後の受精卵が正常な形態を保有していたことが報告^{7,14)}されている. 著者ら¹⁰⁾が, これまで牛の凍結受精卵により得た 6 頭の妊娠例は, すべて胚盤胞であり, 発育ステージの若い細胞や透明帯から脱出した胚盤胞では受胎例が得られなかった. 本試験でも受胎例が得られたのは, 初期胚盤胞の 3 卵と桑実胚の 2 卵, 計 5 卵であり, その他のステージの卵からは受胎例が得られなかった. これらの成績から, 凍結保存に用いる受精卵は, 後期桑実胚や初期胚盤胞の得られる発情後 7 日目に回収するのが適切と思われる.

これまで, グリセロールを耐凍剤として -30°C や -36°C から LN_2 へ浸漬した急速凍結融解法は, 海外で数多く試みられている^{1,2,4~6,16,17)}が, これらの成績に比べると本試験での成績は劣るものであった. これは冷却と植氷時における冷却温度の安定性の差と考えられる. とくに, 本試験のように植氷を手動で行う場合, 冷却温度が変動しやすく, 各冷却ごとに試験成績の変わる難点があった. したがって, 今後安定した冷却曲線の得られる工夫が必要と考える.

一般に受精卵の凍結は, 保存液としてマウス受精卵の凍結保存で開発された Dulbecco's PBS¹⁹⁾ が用いられているが, 本試験では, リンゲル氏液に牛血清を 30% に添加して凍結した場合, 5 個の受精卵から 2 頭の受胎例を得た.

このことは, 受精卵の凍結液として PBS のほかリンゲル氏液でも有効であることを示唆している.

いっぽう, 受精卵の凍結では, 25~50% の血清を添加することにより好結果が報告されている^{1,2)}. 本試験でも牛血清を 20~50% に添加して受精卵の保護効果を検討したところ, -30°C から LN_2 へ浸漬した例では, 20% FCS, 20% BS と 50% BS 加 PBS を凍結液とした場合に, 各 1 例ずつ受胎例が得られ, -36°C から LN_2 へ浸漬した例では 30% BS 加リンゲル液で 2 頭の受胎例が得られた. このように本試験では, 血清の 20, 30, 50% 添加のいずれの場合にも受胎例が得られたが, 各実験での受胎例が少なかったため, 添加血清の適量が推測できなかった. 今後は血清の無添加例についても比較検討したい.

参考文献

- 1) BLITON, R. J., et al.: *J. Reprod. Fert.*, 46, 537~538 (1976).
- 2) BILTON, R. J., et al.: *J. Reprod. Fert.*, 50, 363~364 (1977).
- 3) BILTON, R. J.: *Proc. 9th Int. Congr. Anim. Reprod. & A. I., Madrid*, 245~253 (1980).
- 4) 金川弘司: 哺乳動物卵子談話会要旨集, 第 19 回, p. 13, 東京 (1978).
- 5) LEHN-JENSEN, H., et al.: *Theriogenology*, 9, 313 (1978).
- 6) LEHN-JENSEN, H., et al.: *Nord. Vet. Med.*, 32, 523~532 (1980).
- 7) POLGE, C., et al.: [MAURER, R. R.: *Theriogenology*, 9, 45~68 (1978) より引用] (1974).
- 8) 杉江 佑, ほか: 家畜繁殖誌, 25, 203~305 (1979).
- 9) 杉江 佑, ほか: 畜産試験場年報, 19, 41~42 (1979).
- 10) 鈴木達行, ほか: 日獣会誌投稿中.
- 11) 鈴木達行, ほか: 家畜繁殖誌投稿中.
- 12) 鈴木達行, ほか: 日獣会誌投稿中.
- 13) 角田幸生, ほか: 畜産試験場年報, 20, 44~48 (1980).
- 14) 角田幸生, ほか: 家畜繁殖誌, 24, 22~29 (1978).
- 15) 高橋芳幸: 家畜繁殖誌, 27, 40~45 (1981).
- 16) TROUNSON, A. O., et al.: *J. Anim. Sci.*, 47, 677 (1978).
- 17) WILLADSEN, S. M., et al.: *J. Reprod. Fert.*, 52, 391~392 (1978).
- 18) WHITTINGHAM, D. G., et al.: *J. Reprod. Fert.*, 56, 11~12 (1979).
- 19) WHITTINGHAM, D. G.: *Nature (Lond)* 233, 125~126 (1971).