

凍結処理したカイコ卵の胚発育について

誌名	日本蠶絲學雜誌
ISSN	00372455
著者	今西, 重雄 新保, 博 木口, 憲爾
巻/号	65巻4号
掲載ページ	p. 235-240
発行年月	1996年8月

凍結処理したカイコ卵の胚発育について

今西重雄・新保 博・木口憲爾*

農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所

(1995年10月2日 受領)

SHIGEO IMANISHI, HIROSHI SINBO and KENJI KIGUCHI: Cryopreservation of silkworm eggs.

To establish a method of long-term storage of silkworm eggs, the efficacy of cryopreservation was assessed by hanging culture of embryos after freezing treatment. Embryos of both diapause and non-diapause eggs failed to survive, when whole eggs were preserved at -30°C in a cryoprotection solution containing glycerol. Also no survivors were observed when dechorionated embryos were cryopreserved at -30°C ; however, co-culture of these cryopreserved embryos with the extra-embryonic region of non-cryopreserved eggs resulted in partial development of embryos. Our finding suggests that the extra-embryonic region is much more sensitive for freezing than the embryo. 1) National Institute of Sericultural and Entomological Science, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

Key words: *Bombyx mori*, cryopreservation of eggs, embryo culture, extra-embryonic region

カイコでは多数の系統および品種が貴重な遺伝資源として、毎年継代飼育によって維持されている。今後、保存が必要な系統数は増加していくものと予想され、維持管理の省力化技術の開発が期待されている。従来から、カイコ卵の冷蔵によりその有効保存期間の延長が図られてきた。特に隔年継代飼育の方法として、初秋蚕期に採種した卵を翌々年の春蚕期に掃立てる場合を想定して630日を目標とした蚕種の保護条件、さらには2年に1回の飼育を可能にする卵期間670日の長期貯蔵方法が検討され、わずかに2蚕品種のみが50%の孵化歩合を示している

(松野・清水, 1978; 柳川・竹田, 1995)。

近年、蚕卵の長期保存を目標に $0\sim 1^{\circ}\text{C}$ 付近の温度による保存が追求されている(古沢・四方, 1982; YAMASHITA *et al.*, 1988; FURUSAWA *et al.*, 1982, 1992)。しかし、遺伝資源の保存には継代飼育が不可欠であり、抜本的な技術として蚕卵あるいは生殖組織の凍結保存技術の開発が強く望まれている。これらの要望に応えるため、本研究では凍結によるカイコ胚(受精卵)の長期間保存技術の開発に資することを目的としてカイコ胚の耐凍性を調査した。

本文に入るに先立ち、本文の御校閲をいただいた本研究所遺伝育種部長井上 元博士および生産技術部長柳川弘明博士に厚くお礼を申し上げる。

〒305 つくば市大わし1-2
*現在信州大学繊維学部

材料と方法

蚕品種には主として交雑種「大造 × 日124号」または「日106号 × カンボウジュ」の発生時期が異なる休眠卵または非休眠卵を供試した。卵の凍結は全て Grace 培地に浸した状態で、凍結保護剤のグリセロールを加えずに行うか、または0.5, 1.0, 1.5 M グリセロールを加えた Grace 培地にそれぞれ10, 10, 60分間室温で浸漬した後に直ちに行った(凍結前処理)。凍結処理方法の一つとしてプログラムフリーザー(Laytant BFS-100またはHoxan Cryoembryo-SP)を用いた。その際、試料が入った凍結保護容器を100%エチルアルコール冷却溶媒中に入れ、常温から毎分1°Cの速度で-7°Cまで冷却し10分間保持した後、再度-10, -15, -20, -25, -30, -35°Cの何れかの温度まで低下させた。液体窒素により凍結を行う場合は、直ちに、または-20°Cまで温度を徐々に下げた後に液体窒素容器内に投入した。解凍は、凍結保護容器を液体窒素から取出し、直ちに37°C微温湯に浸漬して急速に行い、Grace 培地が全て解凍する前に室温に移した。その後、Grace 培地にグリセロールが添加されている場合は凍結前処理とは逆に1.5, 1.0, 0.5 M の順にグリセロール濃度を下げつつ室温で続けた(凍結後処理)。この際、処理時間は1.0 M グリセロールでは30分、0.5 M グリセロールでは60分とした。凍結・解凍時の温度変化は銅-コンスタンタンの熱電対を冷却溶媒中に入れ、電子式高感度記録計(EB22005, 茅野株式会社製)を用いて測定した。処理済み卵は脱グリセリン処理のため Grace 培地に浸漬後、水道水で十分に洗浄し、25°Cで催青しつつ、(1) 0.4%トリバンプルー(w/v) 10分間染色による胚の生体反応、(2) 孵化率の計測、(3) 附属肢および剛毛発生状況の顕微鏡による観察の何れかの方法で胚発生状況を調査した。グリセリンを卵内に浸透させる目的で卵殻をメスで除去し(高見ら, 1966)、漿液膜に包まれた卵を小型シャーレの内蓋に懸滴培養する一方、胚自体の耐凍性を調べる目的で凍結・解凍した卵から胚を無菌的に取出して無処理卵の胚外組織と共存培養し、上記の方法で胚発生状況を調べた。

結 果

液体窒素へ直接浸漬した卵の孵化と胚の生存

受精卵を直接液体窒素へ投入し、卵の孵化に及ぼす影響を調査した。この試験においては産卵後25°Cで1, 12, 60日間保護した休眠卵および産卵後20時間に即時浸漬して1日経過した非休眠卵を用い、1晩5°Cに保護しつつ、グリセロールなしに Grace 培地中で液体窒素に投入する区と、凍結前処理を行った後に1.5 M グリセロールを含む Grace 培地に浸漬しつつ液体窒素に投入する区とを設け、いずれも液体窒素に約5分間接触させた後、37°Cの微温湯に浸漬して急速解凍し凍結後処理を行った。処理10日後に生存胚数を調査するため卵から胚を抽出し、トリバンプルーにて生体反応を調べた(第1表)。その結果、卵のグリセロールを含む培地への浸漬の有無にかかわらず、また結の前・後処理にかかわらず、全て染色液に濃染され、胚は致死していることが確認された。

プログラムフリーザーを用いた卵の凍結と孵化

産卵後25°Cに2日間、20°Cに7日間および10°Cに11日間保護した後さらに5°Cに冷蔵しつつ、産卵から20, 27, 45, 115日後にプログラムフリーザーを用いた冷却実験をそれぞれ行った。なお、20~45日の胚は休眠が進行している時期であり、115日の胚は胚休眠がすでに覚醒している時期である。卵は凍結前処理を行った後、1.5 M グリセロール液中で

第1表 液体窒素に5分間浸漬した卵の胚発育。

卵齢(日)	生体反応	
	無	有
1	100	0
12	100	0
60	100	0
1(非休眠*)	100	0

供試卵: 日106号 × カンボウジュ (12, 60日齢は休眠中。*即浸後1日)。処理卵を25°Cに保護し10日後にトリバンプルーで生体反応を検定することにより発育の有無を調査した。調査個体は各区70~80粒。結果は百分率で表示した。

-10, -15, -20, -25, -30, -35°Cの何れかの温度まで冷却し, その温度に30分保持した。この処理後, 卵を37°Cの微温湯で急速解凍し凍結後処理を行った後, 25°Cで14日間催青して孵化率を調査した(第2表)。卵齢20日の休眠卵では-30°Cまで冷却してもなお約58%が孵化したが, -35°Cでは孵化がみられなかった。これ以外の実験区では休眠胚および休眠覚醒胚とも全て-25°Cが生存限界温度であった。

除殻卵培養法を用いた胚の生存確認

卵齢47日の休眠卵と卵齢120日の休眠覚醒卵をプログラムフリーザーを用いて前項で記述したのと同様の条件で冷却処理した。処理卵を除殻し, 漿液膜に包まれた状態で懸滴培養(高見ら, 1966)して胚が发育するか否かを調査した(第3表)。その結果,

-10°Cで冷却した卵の一部の胚は頭部着色期にまで发育し, -20°Cおよび-25°Cの冷却処理では付属肢発生期まで发育した。しかし, -30°C以下の処理では胚は全て不发育であった。120日齢の休眠覚醒卵を凍結前処理して1.5 M グリセロールを含むGrace培地中で中間温度処理なしに液体窒素中に浸漬し, または-20°Cまで温度を徐々に下げた後から液体窒素中に浸漬し, 5分間保持した後, 急速解凍で凍結後処理を行った場合には, いずれの試験区でも胚の发育はみられなかった(第3表)。これらの実験からカイコ卵の生存限界温度は-25°C付近にあり, それ以下の温度では胚は致死するものと考えられた。

カイコ卵は硬い殻に覆われているためグリセロールは卵内に侵入せず凍結保護剤として役立たないものと考えられる。そこで, 予め卵殻を除去した後に

第2表 卵の冷却処理が孵化に及ぼす影響。

卵齢 (日)	処 理 温 度 (°C)						
	対照	-10	-15	-20	-25	-30	-35
20	96.7	97.8	97.5	97.1	95.7	57.8	0.0
27	96.9	93.9	97.5	95.6	83.8	0.0	0.0
45	94.8	93.1	94.9	94.0	92.1	0.0	0.0
115	85.2	85.5	85.7	83.3	64.1	0.0	0.0

供試卵: 大造 × 日124号 (20, 27, 45日齢は休眠中115日齢は休眠覚醒後)。処理卵を25°Cに保護し孵化率を調査した。試験は1区70~80粒の2連制で実施し, 結果は百分率で表示した。

第3表 卵の冷却処理後の除殻培養における胚发育。

冷却 処理	生体反応		付属肢	剛毛	頭部
	無	有	発生胚	発生胚	着色胚
対照		0	0	0	100
-10°C		0	0	50	20
-20°C		0	100	0	0
-25°C		0	100	0	0
-30°C	100		0	0	0
-35°C	100		0	0	0
液体窒素	100		0	0	0
-20°C→液体窒素	100		0	0	0

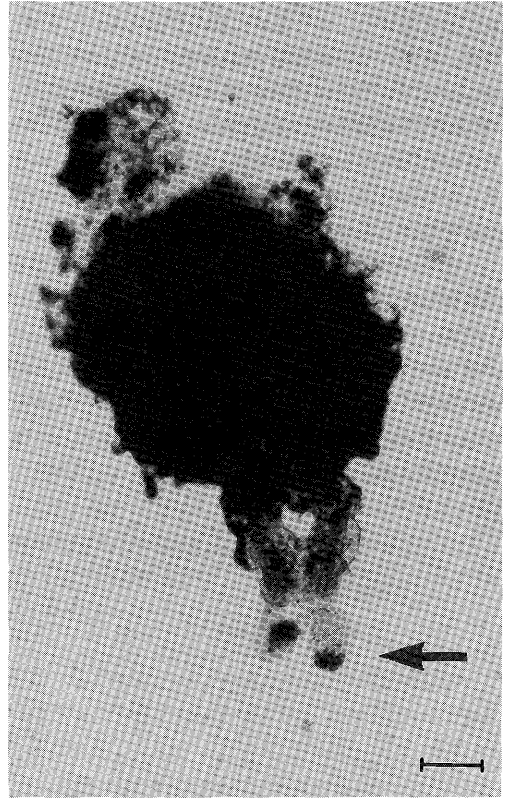
供試卵: 日106号 × カンボージュ (45日齢休眠卵または120日齢休眠覚醒卵)。処理卵を25°Cで除殻培養し14日後にトリパンブルーで生体反応を検定して发育の有無を調査した。調査個体は各区12粒。結果は百分率で表示した。*生体反応があるのみで器官形成等はみられなかったもの。休眠卵と休眠覚醒卵では同様の結果が得られた。なお, 液体窒素処理は休眠覚醒卵についてのみ行った。

凍結保護剤に浸漬することにより、グリセロールが卵内へ侵入可能となり胚は -30°C 以下の温度でも耐凍性が付加されるのではないかと予想し、日125号の休眠覚醒卵を除殻→凍結保護剤に浸漬→降温処理→液体窒素浸漬→解凍→凍結保護剤除去の手順で処理した後に懸滴培養した。14日後に胚の發育状態を調査したところ、25個の胚のうち發育のみられたものは皆無であった。

凍結胚子と正常胚外組織との共存培養

次に、 -30°C 以下で凍結処理した胚の致死する要因が胚自体にあるのか、または卵黄、漿膜等の胚外組織にあるのかを明らかにするため、即浸卵を凍結前処理した後、1.5 M グリセロール存在下で -25°C または -35°C まで冷却し30分間保持（プログラムフリーザー）または液体窒素で5分間処理後、急速解凍し、凍結後処理を行った。この卵を Grace 培地に浸漬した状態で切開して胚を摘出し、胚1個につき無凍結卵4個分の胚外組織と共存培養した。その結果、無処理（対照）では9個体全部、および -25°C で凍結した場合は5個体中4個体が剛毛発生期まで發育した。さらに -35°C で凍結した場合、5個体中3個体までが部分胚ながら付属肢発生期まで發育していることが確認された（第1図、第4表）。液体窒素により凍結した卵でも全く同様であった（第4表）。

以上の結果から、凍結処理卵が致死する要因の一つに凍結による漿膜、卵黄等の胚外組織の損傷が考えられた。また、胚自体には -196°C の極低温に耐えうる耐凍性があることも示唆された。



第1図 凍結胚子と正常胚外組織との共存培養によって得られた部分成長胚子。供試卵：大造 × 日124号。即浸卵を産下後 25°C で47日間保護した後、 -35°C にて冷却処理した。処理胚を無処理卵由来の胚外組織共存下で培養して14日後に観察した。矢印、付属肢。スケールバー、 $150\mu\text{m}$ 。

第4表 凍結・解凍卵由来の培養胚子發育に及ぼす無処理胚外組織の影響。

冷却 処理	調査 個体	生体反応		付属肢 発生胚	剛毛 発生胚	頭部 着色胚
		無	有			
対照	9	0	0	0	9	0
-25°C	5	0	1	1	4	0
-35°C	5	0	0	3 (部分胚)	0	0
液体窒素	5	0	0	3 (部分胚)	0	0

供試卵：大造 × 日124号（即浸卵）。処理卵から胚を取り出し無処理卵由来の胚外組織共存下で培養して14日後における胚子の發育状況を調査した。結果は個体数で表示。

*生体反応があるのみで器官形成等はみられなかったもの。

考 察

現在わが国で保存されているカイコの品種数は477種であり(柳川・竹田, 1995), 育種素材および貴重な遺伝資源として利活用されている。これらは毎年膨大な労力を伴って維持されているが, 遺伝的变化および飼育管理上の事故等によって本来の形質が喪失する危惧がある。この問題の解決のための一手法として, 卵巣を凍結保存したり(KUSUDA *et al.*, 1985), 凍結卵巣を解凍後カイコ幼虫に移植し, 形成された卵巣卵を単為発生処理して孵化させるなど(新保ら, 1991), カイコ遺伝資源の長期保存と回収が考案されている。しかし, この方法は複雑な処理を必要とする。このような観点から, 受精卵について凍結保存の可能性が検討されたが(AOKI, 1982; 清水ら, 1986; 清水・青木, 1988; BRASLA *et al.*, 1995), 成功例は報告されていなかった。本研究においても, 受精卵を直接液体窒素に投入する方法では発育する個体は全く認められなかった。プログラムフリーザーにより一定の速度で冷却する方法を用いたところ $-20^{\circ}\text{C}\sim-30^{\circ}\text{C}$ 付近に生存限界温度が存在することが明らかになった。鈴木ら(1981)は越冬昆虫の凍結を防ぐ過冷却点をさらに降下させる物質として, 生体内に多量に存在する多価アルコールに着目している。また, SUZUKI *et al.* (1983)は蚕品種「大造」の休眠卵の過冷却点は産卵10日後で $-30.70\pm 1.47^{\circ}\text{C}$, 産卵後100日目 $-31.59\pm 1.57^{\circ}\text{C}$ と報告している。過冷却点は蚕品種によって多少異なるものと推定されるが, -30°C 前後の温度は本実験で得られた受精卵の生存限界温度とほぼ一致している。これら生存限界温度の存在は卵内容物がいったん凍結すれば胚はもとの正常状態に回復することが困難であることを示唆している。過冷却点をさらに降下させるにはグリセロール等の凍結保護剤を卵内に浸透させるとよい。しかし, 本実験では, 除殻卵に凍結保護剤を浸透させ液体窒素に浸漬した後に解凍し, その後の胚の発育を調査した場合でも, 胚の発育は認められなかった。一方, 種々の条件で凍結し解凍した卵から胚を取出して無処理の胚外組織と共存培養した結果, 胚は部分的ながら発育することが明らかとなった。この結果から, 胚自体は -196°C の超低温に耐えうること,

および胚外組織の損傷が胚の発達に大きく影響することが示唆された。 -35°C 以下の低温で凍結後, 解凍した卵を解剖すると, 卵黄顆粒は細かい顆粒に分散し, 卵内容物はやや白濁しているのが観察され, 無凍結卵の卵黄顆粒が団粒構造であるのと比べて明かな差異がある。この卵黄顆粒の変化は除殻卵をグリセロール中で凍結保護した場合でも同様に認められた。これらの観察から, 凍結胚が致死する要因は胚の耐凍性が低いことによることよりも, 胚外組織, 特に卵黄顆粒において凍結による傷害が生じるためであると推察される。今後カイコ受精卵の凍結保存法を検討する際には卵黄顆粒の保護に留意する必要がある。

摘 要

受精卵のカイコ胚の長期保存技術の開発に資することを目的としてカイコ胚の耐凍性を調査し, 凍結保存の可能性について検討した。その結果, 産卵後 25°C に保護し, 1, 12, 60日経過した休眠卵および即時浸酸後に1日経過した休眠覚醒卵を液体窒素に直接投入すると, 胚は全て致死することを確認した。次に, 卵齢20, 27, 45日の各休眠卵および卵齢115日の休眠覚醒卵をそれぞれ $-10, -15, -20, -25, -30, -35^{\circ}\text{C}$ の何れかの条件で保持した。その結果, 卵齢20日の休眠卵は -30°C まで冷却してもなお約58%の生存個体率が得られたが, それ以外の休眠卵および休眠覚醒卵では -25°C が限界温度であった。さらに, 卵齢47日の休眠卵および卵齢120日の休眠覚醒卵を凍結処理した後に除殻し, 懸滴培養によって胚の発育を検定した結果でも -30°C 以下の温度では生存または発育する胚は認められなかった。この要因としては卵を凍結保護剤と共に凍結しても凍結保護剤が卵殻を通して卵内に侵入しないためと推察された。しかし, 除殻卵を凍結処理後に懸滴培養してみた場合, 生存または発育胚は皆無であった。一方, 凍結した除殻卵から胚のみを取出し, 無処理の漿液膜, 卵黄等の胚外組織と共存培養したところ, -35°C までの凍結処理または液体窒素に浸漬した場合は付属肢発生期まで発育する個体が認められた。以上の結果から, 胚には -196°C の超低温に耐える耐凍性があり, 凍結胚が致死する要因の一つは凍結による胚外組織の損傷にあることが示唆された。

文 献

- AOKI, A. (1982): Protective action of the polyols against freezing injury in the silkworm eggs. *Sci. Rep. Tohoku Univ.*, VI (Biol.), 28, 29-36.
- BRASLA, A., COCOS, L. and MATEI, A. (1995): Researches concerning the possibility of preserving silkworm eggs in liquid nitrogen. *Proc. XVIth Int. Sericult. Cong.*, Bandung, Indonesia.
- 古沢寿治・四方正義 (1982): 家蚕卵の休眠過程におけるポリオール, グリコーゲン量の変動に及ぼす低温の影響. *日蚕雑*, 51, 77-83.
- FURUSAWA, T., SHIKATA, M. and YAMASHITA, O. (1982): Temperature dependent sorbitol utilization in diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Comp. Physiol.*, 147, 21-26.
- FURUSAWA, T., YAGINUMA, T. and YAMASHITA, O. (1992): Temperature-induced metabolic shifts in diapause and non-diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *Zool. J. Physiol.*, 96, 169-180.
- KUSUDA, J., NOGUCHI, T., ONIMARU, K. and YAMASHITA, O. (1985): Maturation and hatching of eggs from silkworm ovaries preserved in liquid nitrogen. *J. Insect Physiol.*, 31, 963-967.
- 松野道雄・清水久仁光 (1978): 冷蔵による原蚕種の長期貯蔵に関する研究 (第4報), 卵期間630日を目標とした蚕種の保護条件と品種適応. *蚕糸研究*, 109, 140-151.
- 清水久仁光・青木秀夫 (1988): 蚕種の冷蔵による保存蚕品種の省力的保存方法について (第8報), 交雑蚕種の2年間貯蔵. *蚕糸研究*, 142, 45-51.
- 清水久仁光・坂田助光・青木秀夫 (1986): 超低温保存のための蚕種の低温度接触時期と孵化した幼虫の計量形質. *日蚕中部講要*, (42), 42.
- 新保 博・北澤敏男・今西重雄・木口憲爾・村上昭雄 (1991): カイコ遺伝子資源の長期保存法—卵巣凍結・融解条件および単為発生処理の効率化について. *蚕昆研報*, 2, 47-63.
- 鈴木幸一・藤田正雄・宮 慶一郎 (1981): カイコ卵の過冷却点変動について. *東北蚕糸研報*, 6, 5.
- SUZUKI, K., FUJITA, M. and MIYA, K. (1983): Changes in supercooling point of silkworm eggs. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 52, 185-190.
- 高見丈夫・杉山八郎・北澤敏男・神田俊男 (1966): 培養した蚕卵に対する核多角体病ウイルスの感染. *応動昆*, 10, 197-204.
- YAMASHITA, O., YAGINUMA, T., KOBAYASHI, M. and FURUSAWA, O. (1988): In "Endocrinological Frontiers in Physiological Insect Ecology" (SEHNAL, F., ZABZA, A. and DENLINGER, D.L., eds.), pp. 265-275, Wroclaw Technical University Press, Wroclaw.
- 柳川弘明・竹田 敏 (1995): 蚕遺伝資源の長期保存に関する研究会. *蚕糸昆虫研資料*, 19, 1-25.