

緩慢冷却法における細胞内耐凍剤(1.8M Ethylene Glycol)
へのTrehalose添加が牛体外成熟卵子の凍結融解後の生存
性及びその後の発育能に及ぼす影響

誌名	愛媛県畜産試験場研究報告
ISSN	03892859
著者	木下, 政健 沖本, 宏 佐伯, 拓三
巻/号	17号
掲載ページ	p. 7-13
発行年月	1999年11月

緩慢冷却法における細胞内耐凍剤(1.8M Ethylene Glycol)への Trehalose 添加が牛体外成熟卵子の凍結融解後の生存性及びその後の発育能に及ぼす影響

木下政健、沖本宏、佐伯拓三

要約

本実験では、各濃度(0, 0.1, 0.2M)の Trehalose を含む 1.8M Ethylene Glycol を耐凍剤として用い、緩慢冷却法により牛体外成熟卵子を凍結保存し、融解後の生存性及びその後の発育能に及ぼす影響について検討を加えた。

凍結融解後、形態的に正常と判定した成熟卵子の割合は、0.2M Trehalose を含む 1.8M Ethylene Glycol 区が他の試験区と比較し有意に高い値を示した ($P < 0.01$)。受精検査では、全試験区において、受精はしているものの雄性前核が形成されていない異常受精像が散見された。また、新鮮体外成熟卵子を用いた対照区と比較し、0.2M Trehalose を含む 1.8M Ethylene Glycol 区では、未受精卵率の有意な上昇が認められた ($P < 0.05$)。体外培養系を用いた発育能検査においては、0.2M Trehalose を含む 1.8M Ethylene Glycol 区が他の試験区と比較し、分割率、胚盤胞発生率ともに、有意に高い値を示した ($P < 0.01$)。しかし、それらの値(各々39.6%、4.3%)は、対照区と比較すると有意に低いものであった ($P < 0.01$; 対照区の分割率75.6%、胚盤胞発生率36.3%)。

また、0.2M Trehalose を含む 1.8M Ethylene Glycol 区から作出した胚盤胞期胚を、0.1M Trehalose を含む 1.5M Ethylene Glycol を耐凍剤として用い再凍結保存後、3頭の受胎牛に移植した結果、全頭で受胎が確認された。

以上の結果から、緩慢冷却法により、牛体外成熟卵子を凍結保存する際に、細胞内耐凍剤として 1.8M Ethylene Glycol を使用した場合は、細胞外保護物質である Trehalose を 0.2M 添加することによって、凍結融解後の生存性及びその後の体外発育能が改善されることが明らかとなった。さらに、0.2M Trehalose を含む 1.8M Ethylene Glycol を耐凍剤として用いた凍結融解成熟卵子から作出した胚盤胞期胚は、再凍結融解後も受胎能を高率に保持している可能性が示唆された。

キーワード: 牛体外成熟卵子、耐凍剤、発育能、Ethylene Glycol、Trehalose

緒言

一般的に、牛体外成熟卵子の緩慢冷却法による凍結保存に使用されている細胞内耐凍剤には、Dimethyl sulfoxide、Glycerol、Propylene Glycol、Ethylene Glycol があり、全ての耐凍剤において、凍結融解後に移植可能な体外受精胚(桑実期以上の発育ステージ胚)が得られたと報告されている¹⁻⁵⁾。

しかしながら、緩慢冷却法による凍結融解成熟卵子からの移植可能胚発生率は、極めて低率である。その原因としては、マウス等の実験結果から、細胞が1つであり直径が大きく、難脱水性で耐凍能が低い、さらに耐凍剤の毒性及び凍結融解処理による物理的損傷等が影響していると考えられている⁶⁻⁹⁾。

このため、胚の凍結保存と比較して、研究報告は少なく、未だに最適な凍結保存技術は確立されていない。

近年、緩慢冷却法による牛胚の凍結保存の研究において、細胞内耐凍剤である Ethylene Glycol は、分子量

(62.07)が他の耐凍剤(Glycerol;92.1、Dimethyl sulfoxide;78.13、Propylene Glycol;76.1)よりも小さいため、細胞への透過性が高いことや、1.8M 濃度までは、胚細胞への毒性がほとんどないことが報告されている¹⁰⁾¹¹⁾。さらに、細胞内耐凍剤のみで凍結するよりも、細胞外保護物質である Trehalose を併用したほうが胚の生存性が改善されるとの報告もされている¹²⁾¹³⁾。

そこで、本実験では、細胞内耐凍剤である 1.8M Ethylene Glycol への Trehalose 添加が牛体外成熟卵子の凍結融解後の生存性及びその後の発育能に及ぼす影響について検討を加えた。

材料および方法

1. 供試卵

食肉処理場より採取した牛卵巣表面上の直径 2~5 mm の小卵胞から、卵胞吸引法を用いて卵子卵丘細胞複合体を採取し、実体顕微鏡下で形態的に正常と思われる卵子

(緊密かつ濃密な卵丘細胞層が2層以上付着して卵
子細胞質が変性または萎縮していないもの)を選抜した。
その後、選抜した卵子を、体外成熟用培地 [10% (v/v)
非働化牛胎児血清 (以下 FCS)、0.01AU/ml FSH、1 μ g/ml
Estradiol-17 β 及び抗生物質 (Penicillin
100IU/ml, Streptomycin 100 μ g/ml) を含む 25mM β ス緩
衝 TCM-199] を用い、18 時間成熟培養し、卵丘細胞層を
剝離することなく供試卵として用いた。なお、培養条件
は、39 $^{\circ}$ C、5% CO₂ in air、湿度飽和気相下とした。

2. 試験方法

1) 試験区分

20% (v/v) FCS と抗生物質を含むダルベッコのリン酸緩
衝液 (以下 D-PBS) を凍結基礎媒液とする凍結用媒液の
組成は、以下の3区とした。

EG区 ; 凍結基礎媒液 + 1.8M Ethylene Glycol

EG+0.1M Tre区 ; 凍結基礎媒液 + 1.8M Ethylene
Glycol + 0.1M Trehalose

EG+0.2M Tre区 ; 凍結基礎媒液 + 1.8M Ethylene
Glycol + 0.2M Trehalose

2) 実験1 : 凍結用媒液への暴露試験

供試卵を、凍結基礎媒液で洗浄後、35 $^{\circ}$ C下の各凍結用
媒液に直接浸漬し、15 分間暴露した。暴露終了後は、
再び6 時間成熟培養を行い、体外成熟培養時間が合計で
24 時間となるようにした。その後、当場の常法に基づ
き体外受精 (14) を行い、終了後は10 日間体外発生培養
を行った。培養条件は、体外受精・体外発生培養ともに、
体外成熟培養条件と同一とした。

なお、体外発生培養は、雪印乳業株式会社受精卵移植
研究所の化学合成培養液¹⁵⁾ (以下 m-SOFM) と 25mM β ス
緩衝 TCM-199 (以下 TCM-199) を組み合わせた以下の培
養系を用いた。

媒精終了後 48 時間は、3 mg/ml BSA (A-6003, Sigma)
を添加した M-SOFM (Glucose 及び PVA 欠) で培養し、48
時間後に 10%FCM/m-SOFM (Glucose 添加、PVA 欠) に培
地交換し 5 日目まで培養、さらに 5 日目に、50 μ M β -
ME (M-7522, Sigma) を添加した 10%FCS/TCM-199 に培地
交換し、その後は培地交換することなく培養を継続した。

検査は、以下の項目について実施した。

媒精終了後 12 時間目に受精標本¹⁶⁾を作成し受精検
査、さらに、48 時間目に分割率検査、7~10 日目に胚盤
胞発生率及び脱出胚盤胞発生率検査を実施した。

3) 実験2 : 凍結融解試験

供試卵を、凍結基礎媒液で洗浄後、35 $^{\circ}$ C下の各凍結用
媒液に直接浸漬し、15~20 分間平衡した。その後、0.25
ml ストロー内に約 30 卵づつ封入し、直ちにプログラム

フリーザー (ET-1, 富士平工業 KK) を用いて、凍結を
行った。凍結プログラムは、当場の生体由来胚を凍結す
る方法と同一のプログラムを用いた。即ち、0 $^{\circ}$ C~-7 $^{\circ}$ C
までは、毎分 1 $^{\circ}$ Cの速度で冷却し、-7 $^{\circ}$ Cで人為的に植氷
操作を行った。植氷後 15 分間同温度を保持し、その後、
毎分 0.3 $^{\circ}$ Cの速度で-30 $^{\circ}$ Cまで冷却し、10 分間保持した
後に液体窒素中 (-196 $^{\circ}$ C) に浸漬した。なお、凍結後の
保存期間は、2日~4ヶ月間とした。卵子の融解は、30 $^{\circ}$ C
の微温水で行い、融解後は、凍結基礎媒液 (20%FCS/D-
PBS) に直接浸漬した。その後は、実験 1 と同様に、再
度 6 時間体外成熟培養を行い、体外受精及び体外発生培
養に供した。ただし、体外発生培養系は、実験 1 と同一
の培養系と、それとは異なる培養系の 2 種類の系を用い
た。

実験 1 と異なる発生培養系とは、媒精終了後 48 時間
は、1% FCS/TCM-199 で培養し、48 時間後に
10%FCS/TCM-199 に培地交換し 5 日目まで培養、さらに 5
日目に、50 μ M β -ME を含む 10%FCS/TCM-199 に培地交
換し、その後は培地交換することなく培養を継続した。

検査は、以下の項目について実施した。

凍結融解後の生存性検査を、体外受精終了直後に実体
顕微鏡下の形態学的観察 (細胞質が暗黒色を呈する卵子
を生存と判定) にて実施した。また、受精検査を、体外
受精 12 時間後に形態的に正常と判定した胚を用いて実
施した。その他の検査は、実験 1 と同様の方法により、
分割率及び胚盤胞期発生率を検査した。

また、対照区として、22~23 時間体外成熟培養した
卵子を、凍結用媒液への暴露及び凍結保存することなく、
同一の方法で体外受精及び体外発生培養に供した。

なお、凍結融解体外成熟卵子から発生した胚盤胞期胚
の一部を 0.1M Trehalose を含む 1.5M Ethylene Glycol
を耐凍剤として用い、緩慢冷却法により再凍結保存し、
その後移植に供した。凍結プログラムは、成熟卵子の凍
結に用いたものと同一のプログラムを使用した。

3. 統計処理

各実験区間の統計学的処理は χ^2 検定により行った。

結果

1. 実験1 : 凍結用媒液への暴露試験

暴露後の受精検査においては、対照区と比較し、
EG+0.1M Tre 区で正常受精率の有意な低下 ($p < 0.01$) 及
び未受精率の有意な上昇 ($p < 0.01$) が認められたが、EG
及び EG+0.2M Tre 区では、有意差は認められなかった
(Table 1)。

また、48 時間後の分割率においても、対照区と比較

Table 1 The Fertilization of Exposed Bovine Oocytes

Treatment groups	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes			
		Fertilized			Unfertilized
		Total	Monospermic	Polyspermic	
1.8M EG	11	10(90.9)	10(90.9) a	0(0)	1(9.1)
1.8M EG+0.1M Tre	6	3(50.0) A	2(33.3) Ab	1(16.7)	3(50.0) A
1.8M EG+0.2M Tre	8	7(87.5)	6(75.0)	1(12.5)	1(12.5)
Control	20	20(100) B	18(90.0) B	2(10.0)	0(0) B

A-B; $p < 0.01$ a-b; $p < 0.05$

Table 2 Development Capacity of Exposed Bovine Oocytes in Vitro (m-SOFM)

Treatment groups	No. of oocytes examined	No. (%) of embryos		
		Cleaved	Blastocyst	Hatched blastocyst
1.8M EG	88	62(70.5) A	19(21.6) a	14(15.9) A
1.8M EG+0.1M Tre	81	40(49.4) B	8(9.9) Ab	6(7.4) Aa
1.8M EG+0.2M Tre	83	59(71.1) A	20(24.1) c	15(18.1) b
Control	135	102(75.6) A	49(36.3) Bd	44(32.6) Bc

A-B; $p < 0.01$ a-b, a-d, b-c; $p < 0.05$

Table 3 Comparison of Morphological survival rates after Freezing-Thawing

Treatment groups	No. of oocytes examined	No. (%) oocytes
		with normal morphology
1.8M EG	554	162(29.2) a
1.8M EG+0.1M Tre	354	164(46.3) b
1.8M EG+0.2M Tre	891	558(62.6) c

a-c; Values in a column with different letters are significantly different ($p < 0.01$)

し、EG+0.1M Tre 区で有意な低下が認められた ($p < 0.01$) もの、EG 及び EG+0.2M Tre 区では、有意な低下は認められなかった。しかし、EG 区は、胚盤胞発生率において、対照区と比較し有意な低下が認められた ($p < 0.05$)。EG+0.2M Tre 区は、胚盤胞までの発育能は、対照区と比較しても、有意な差は認められなかったものの、その後の脱出胚盤胞発生率において、対照区と比較し有意な低下が認められた ($p < 0.05$; Table 2)。

2. 実験2：凍結融解試験

凍結融解後の生存率は、EG+0.2M Tre 区が最も高く62.6%、次いで、EG+0.1M Tre 区の46.3%、EG 区の29.2%の順であり、各試験区間に有意な差が認められた ($p < 0.01$; Table 3)。

凍結融解後の正常受精率は、各試験区間に有意な差は認められなかったものの、EG+0.2M Tre 区が最も高い値(56.0%)を示した。しかし、その値は、対照区(90.0%)と比較すると有意に低い値であった ($p < 0.05$)。また、

EG+0.2M Tre 区の未受精卵率(24.0%)が、対照区(0%)と比較し有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。さらに、全試験区共通して、雄性前核形成不全の受精像が散見され、特に、EG 区においては、対照区と比較し有意に高い値を示した ($p < 0.01$; EG 区:38.5%、対照区:0%、Table 4)。

凍結融解後の体外発生培養成績は、TCM-199 のみを用いた培養系で、分割率において、EG+0.2M Tre 区(26.8%)が他の試験区と比較し有意に高い値を示した。さらに、有意な差は認められなかったものの、同培養系で胚盤胞が得られたのも、EG+0.2M Tre 区のみ(8胚、胚盤胞発生率1.8%)であった。また、m-SOFM と TCM-199 を組み合わせた培養系においては、EG 区で1胚の胚盤胞発生(0.3%)が認められたものの、EG+0.2M Tre 区が、分割率、胚盤胞発生率ともに、他の試験区と比較し有意に高い値を示した。しかし、最も成績が良好であったEG+0.2M Tre 区由来の凍結体外成熟卵子を m-SOFM と TCM-199 を組み合わせた培養系で体外培養した成績(分割率39.6%、

Table 4 The Fertilization of Cryopreserved Bovine Oocytes

Treatment groups	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes				
		Total	Fertilized			Unfertilized
			Monospermic	Polyspermic	other*	
1.8M EG	13	12(92.3)	5(38.5)A	2(15.4)	5(38.5)A	1(7.7)
1.8M EG+0.1M Tre	11	10(90.9)	5(45.5)A	4(36.4)a	1(9.1)	1(9.1)
1.8M EG+0.2M Tre	25	19(76.0)A	14(56.0)a	2(8.0)b	3(12.0)	6(24.0)a
Control	20	20(100)B	18(90.0)Bb	2(10.0)	0(0)B	0(0)b

* : Male pronucleus hypoplasia

A-B; p < 0.01

a-b; p < 0.05

Table 5 Development Capacity of Cryopreserved Bovine Oocytes in Vitro

IVC medium	Treatment groups	No. of oocytes examined	No. (%) of normal oocytes	No. (%) of embryos	
				Cleaved	Blastocyst
TCM-199	1.8M EG	132	39(29.5)a	5(3.8)a	0(0)a
	1.8M EG+0.1M Tre	157	41(26.1)a	6(3.8)a	0(0)a
	1.8M EG+0.2M Tre	436	278(63.8)b	117(26.8)b	8(1.8)a
	Control	70	70(100)c	48(68.6)c	20(28.6)b
m-SOFM	1.8M EG	286	60(21.0)a	11(3.8)a	1(0.3)a
	+TCM-199				
	1.8M EG+0.1M Tre	182	90(49.5)b	19(10.4)b	0(0)a
	1.8M EG+0.2M Tre	212	164(77.4)c	84(39.6)c	9(4.3)b
	Control	135	135(100)d	105(75.6)d	49(36.3)c

a-d; Values in a column with different letters are significantly different (p < 0.01)

Table 6 Pregnancy rates after transfer of Frozen-Thawed Bovine Embryos
Derived From Frozen Mature Oocytes

IVC medium	No. of Embryos	No. of Recipients	No. of Pregnancies (%)
TCM-199	3	3	3(100)

胚盤胞発生率 4.3%) も、対照区と比較すると、有意に低い値であった (p < 0.01; 対照区の分割率 75.6%、同区胚盤胞発生率 36.3%、Table 5)。

また、EG+0.2M Tre 区から作出した胚盤胞期胚 3 胚 (TCM-199 の培養系由来胚) を、0.1M Trehalose を含む 1.5M Ethylene Glycol を耐凍剤として用い再凍結保存後、3 頭の受胎牛に移植した結果、全頭で受胎が確認された (Table 6)。

考 察

今回の実験により、緩慢冷却法を用いて、牛体外成熟卵子を凍結保存する際に、細胞内耐凍剤として 1.8M Ethylene Glycol を使用した場合は、Trehalose を 0.2M 添加することにより、凍結融解後の生存性が有意に上昇し、その後の体外発育能も改善されることが明らかとなった。

その理由は、天然二糖である Trehalose の持つ、凍結脱水時における膜透過性機構保持作用及び融解時におけ

る細胞内へ復水緩和作用¹²⁾により、凍結融解の過程で起こる卵細胞質の不可逆的な損傷が若干緩和されたことによるものと考えられる。

しかし、EG+0.2M Tre 区の胚盤胞期胚発生率 (4.3%) は、対照区 (新鮮体外成熟卵子の胚盤胞期胚発生率; 36.3%) と比較すると有意に低い値であり、Trehalose 添加のみの改良では、卵細胞質の不可逆的損傷を完全に防ぎ、未処理対照区の体外発育能と同じレベルにするのは困難である可能性も示唆された。

その損傷部位について、趙ら²⁰⁾は、1.6M Propylene Glycol で凍結保存した牛体外成熟卵子の融解後の微細構造を、透過型電子顕微鏡を用い観察した結果、microvilli, mitochondria 等が致命的損傷を受けていると報告している。さらに、太田ら²¹⁾は、ヒト卵子を EFT40 を用いてガラス化凍結し、融解後の細胞内骨格の状態を免疫組織化学的に調査した結果、f-actin(microfilament)を中心に重大な損傷を受けていたことを報告している。今回の実験では、微細構造の観察

を行っていないが、今後は、微細構造を観察した上で、適切な卵細胞質内保護作用を持つ薬物等の処理を行う必要があると思われる。

また、本実験の凍結融解後の体外発育能低下の原因としては、卵細胞質の不可逆的損傷とは別に、凍結融解後の正常受精率の低下も大きく影響しているものと考えられる。

成熟卵子は、減数分裂 M2 期で停止した非常に不安定な状態であるため、僅かな刺激により、卵子の活性化が起こることが知られている。さらに、活性化が起こることで、表層反応が誘起され、透明帯が硬化し、受精率が低下する可能性が示唆されている¹⁷⁾。Carrollら¹⁸⁾は、1.5M Dimethyl sulfoxide を添加した凍結用媒液を用い凍結したマウス排卵卵子は、凍結融解の過程で表層反応が誘起され、透明帯が硬化を起し受精率が低下したと報告している。今回の実験結果も、同様の傾向が認められた。即ち、EG 区及び EG+0.2M Tre 区の暴露後の正常受精率は、対照区と比較し有意な差が認められなかったが、凍結融解後には、正常受精率の低下、さらには、未受精卵率及び異常受精率（雄性前核形成不全）の増加が観察された。よって、1.8M 程度の低濃度の Ethylene Glycol への暴露は、卵子活性化刺激とはならず、それよりも、凍結融解の過程が活性化刺激となり、表層反応が起こり透明帯が硬化し、正常受精率の低下が起こるものと推察された。

また、Ullahら¹⁹⁾は、10%(1.8M) Ethylene Glycol を添加した凍結用媒液に牛体外成熟卵子を暴露した後の脱出胚盤胞期胚までの体外発育能は、新鮮体外成熟卵と比較しても有意な差は認められなかったと報告している。しかし、今回の実験結果からは、1.8M Ethylene Glycol への暴露は、成熟卵子の活性化刺激とはならないものの、その後の体外発育能を低下させる可能性があることが示唆された。

なお、EG+0.1M Tre 暴露試験区のみが、正常受精率、分割率、胚盤胞発生率、脱出胚盤胞発生率全てにおいて、対照区さらには他の試験区と比較しても有意な低下を示したことについては、暴露後、変性卵子が多数観察されたことから、凍結用媒液への暴露の過程で、卵細胞質が不可逆的な損傷を受けたものと考えられるが、これが、0.1M Trehalose の影響なのかは今後さらに検討が必要と思われる。

以上のことから、今後は、0.2M Trehalose を含む 1.8M Ethylene Glycol を耐凍剤として用いた上で、凍結融解時における卵子活性化刺激の抑制及び卵細胞質内の保護を中心に更なる検討を加えていく必要があると考えられ

る。

なお、0.2M Trehalose を含む 1.8M Ethylene Glycol を耐凍剤として用い凍結融解した成熟卵子から作出した胚盤胞期胚を、0.1M Trehalose を含む 1.5M Ethylene Glycol を耐凍剤として用い再凍結保存後、3頭の受胎牛に移植した結果、全頭で受胎が確認されたことから、同凍結成熟卵子由来の胚盤胞期胚は、再凍結融解後も受胎能を高率に保持できる可能性が示唆された。

謝辞

今回の試験を実施するに当たり、卵巣の採材にご協力頂いた大洲保健所、(株)アイパックス、県農えひめの方々に深謝致します。

参考文献

- 1) Lim, J.M., Fukui, Y. and Ono, H.: The post-thaw developmental capacity of frozen bovine oocytes following in vitro maturation and fertilization, *Theriogenology*. 35. 1225-1235. 1991.
- 2) Otoi, T., Tachikawa, S., Kondo, S. and Suzuki, T.: Developmental capacity of bovine oocytes cryopreserved after maturation in vitro and of frozen-thawed bovine embryos derived from frozen mature oocytes, *Theriogenology*. 38. 711-719. 1992.
- 3) Fuku, E., Kojima, T., Sioya, Y., Marcus, G.J. and Downey, B.R.: In vitro fertilization and development of frozen-thawed bovine oocytes. *Cryobiology*. 29. 485-492. 1992.
- 4) Otoi, T., Tachikawa, S., Kondo, S. and Suzuki, T.: Development capacity of bovine oocytes frozen in different cryoprotectants. *Theriogenology*. 40. 801-807. 1993.
- 5) 音井威重、山本憲、小山信幸、北村聡：牛の体外受精（第11報）、徳島県肉畜試験場研究報告、31-4、1995
- 6) Bouquet, M., Selva, J., Auroux, M.: Cryopreservation of mouse oocytes. *Bio. Reprod.* 49. 764-769. 1993.
- 7) Sathananthan, A.H., Kirby, C., Trounson, A. and Philipatos, D.: The effect of cooling mouse oocytes, *J. Asiss. Rprod. Genet.* 9. 139-148. 1992.
- 8) Sathananthan, A.H., Ng, S.C., Trounson, A.O., Bongso, A., Ratnam, S.S., Ho, J., Mok, H. and Lee, M.N.: The effects of ultrarapid freezing on meiotic and mitotic spindles of mouse oocytes and embryos. *Gamete. Res.* 21. 85-401. 1988.

- 9) Sathananthan, A. H., Trounson, A. and Freeman, L. : Morphology and fertilizability of frozen human oocytes, *Gamete. Res.* 16. 343-354. 1987
- 10) Voelkel, S. A. and Hu, Y. X. : Use of ethylene glycol as a cryoprotant for bovine embryos to recipient females, *Theriogenology.* 37. 687-697. 1992
- 11) 大江正人、山本政生、高木光博、鈴木達行 : エチレングリコールを用いた牛の体内、体外受精凍結胚の直接移植、*J. Reprod. Dev.*、39、j11-j15、1993
- 12) 吉村格、大久範幸、高田直和、石川勇志、本好茂一 : ウシ体外受精胚の凍結融解後の生存性に及ぼす影響 I、2-プロパングリコールへのトレハロースの添加および冷却速度の影響、*日畜会報*、64、179-182、1993
- 13) 大久津昌治、谷本保幸、後藤和文、中西喜彦、柳田宏一、猪八重悟 : エチレングリコールとトレハロースを用いて凍結したウシ体外受精胚のノステップ法移植、*日本胚移植学雑誌*、17、177-182、1995
- 14) 高橋敏方、沖本宏、木下政健 : 牛の体外受精技術確立試験、*愛媛県畜産試験場研究報告*、11、50-60、1992
- 15) 雪印乳業株式会社受精卵移植研究所 : 化学合成培養液による体外成熟・体外受精胚の培養法、*日本胚移植学雑誌*、17、198-202、1995
- 16) 京都大学家畜繁殖学研究室 : ウシの体外受精、*繁殖技術会誌*、13、115-121、1991
- 17) 久慈直昭 : ヒト胚の凍結 (Slow Cooling 法)、第 40 回日本哺乳動物卵子学会講演要旨集、S12、1999
- 18) Carroll, J., Depypere, H. and Matthews, and C. D. : Freeze-thaw-induced change of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. *J. Reprod. Fert.* 90. 547-553. 1990
- 19) Ullah, N., Shimizu, M., Izaik, Y. and Anwar, M. : Survival of bovine oocytes after exposure to ethylene glycol. *Theriogenology.* 47. 357. 1997
- 20) Zhao, J., Hattori, M. and Fujihara, N. : Ultrastructural comparison between immature and in vitro matured bovine oocytes cryopreserved in propanediol, *J. Mamm. Ova. Res.* 14. 84-94. 1997
- 21) 太田信彦、高橋俊文、斉藤英和、広井正彦 : ヒト胚の凍結 (Vitrification 法)、第 40 回日本哺乳動物卵子学会講演要旨集、S13、1999

Effect of Trehalose Addition to Cryoprotectant (1.8M Ethylene Glycol) in the Slow Cooling Method on Viability and Developmental Capacity after Freezing Thawing of In Vitro Mature Bovine Oocytes

Masatake KINOSHITA, Hiroshi OKIMOTO, Kohzo SAIKI

Summary

In this study, we investigate effect of the concentration of the Trehalose addition to cryoprotectant (1.8M Ethylene Glycol) on viability and developmental capacity of frozen and thawed in vitro mature oocytes. The concentrations of the Trehalose were 0, 0.1, or 0.2M. The rate of the mature oocytes morphologically judged normal after thawing the mature oocytes frozen by 0.2M Trehalose-1.8M Ethylene Glycol as a cryoprotectant was significantly higher than those rates after thawing the mature oocytes frozen by other cryoprotectant ($P < 0.01$). In the fertilization test, the fertilization was done in all test section but abnormal fertilization image of which the male pronucleus had not been formed was observed sporadically. And, the unfertilised rate of the mature oocytes frozen by 0.2M Trehalose-1.8M Ethylene Glycol significantly risen in comparison with the control using the fresh in vitro mature oocytes. In the developmental capacity test using the in vitro culture system, both cleaved rate and developmental rate to the blastocyst stage of embryos produced from mature oocytes frozen by 0.2M Trehalose-1.8M Ethylene Glycol were significantly higher than those rates of embryos produced from mature oocytes frozen by other cryoprotectant ($P < 0.01$). However, the cleaved rate (39.6%) and the developmental rate to the blastocyst stage (4.3%) were significantly lower than the cleaved rate (75.6%) and the developmental rate to the blastocyst stage (36.3%) in the control using fresh oocytes.

Again, after blastocyst embryos frozen by 0.2M Trehalose-1.8M Ethylene Glycol were thawed, these were re-frozen by 0.1M Trehalose-1.5M Ethylene Glycol. And then were transferred nonsurgically to 3 recipients. The pregnancy rate was 100%. These results suggested that viability and development capacity of in vitro mature oocytes after freezing and thawing were improved by using 0.2M Trehalose-1.8M Ethylene Glycol as a cryoprotectant. In addition, it was indicated that the blastocyst embryo produced from oocytes frozen by 0.2M Trehalose-1.8M Ethylene Glycol as a cryoprotectant retained avibility of the establishment of pregnancy after re-freezing and thawing.

Key Words: In Vitro Mature Bovine Oocytes, Cryoprotectant, Developmental capacity, Ethylene Glycol and Trehalose