

# 未受精卵子の超低温保存技術の確立

誌名	岡山県総合畜産センター研究報告 = Bulletin of the Okayama Prefectural Center for Animal Husbandry & Research
ISSN	09154728
著者名	有安, 則夫
発行元	岡山県総合畜産センター
巻/号	13号
掲載ページ	p. 39-42
発行年月	2002年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## <資 料>

# 未受精卵子の超低温保存技術の確立

有安則夫

## Establishment of the Cryopreservation Technology of Oocyte

Norio ARIYASU

### 要 約

効率的な未受精卵子の確保を図るため、未受精卵子の成熟培養時間およびガラス化保存融解後の培養がその後の体外受精及び発生培養に及ぼす影響について検討した。

- 1 新鮮卵では裸化後すぐに体外受精に供した19時間+0時間区とさらに3時間培養を継続した19時間+3時間区の2区を設定したところ、両者に差はみられなかった。
- 2 ガラス化保存卵では、裸化後ガラス化保存・融解し体外受精に供した19時間+0時間+MD区と、さらに3時間を継続後、ガラス化保存・融解し体外受精に供した19時間+3時間+MD区、裸化後すぐにガラス化保存し融解後3時間培養後、体外受精を行った19時間+0時間+MD+3時間区を設定し比較したところ、19時間+0時間+MD区において成績の低下が認められ、19時間+0時間+MD+3時間区では成績に改善がみられた。

以上の結果から、未受精卵子のガラス化保存について、ガラス化保存前の成熟培養時間が融解後の発生に影響していること、また融解後の追加培養により発生能に改善がみられることが示唆された。

キーワード： 牛、未受精卵子、超低温保存、ガラス化、マイクロドロプレット

### 緒 言

1998年に初めて牛体細胞由来のクローン牛が誕生して以来、急速にクローン技術は進歩しており、すでに220頭の体細胞クローン産子が得られている(2001.3月末現在)<sup>1)</sup>。このクローン技術の研究開発を行っていく上で、クローン胚の作出に必要なレシピエント卵子の安定確保が望まれる。そのためには凍結保存が不可欠であるが、従来の方法では卵子の生存率が極めて低く、これは未受精卵子や初期胚では一つの細胞が大きい耐凍剤の浸透がスムーズに行われず、また表面積が広い氷傷による細胞膜への障害を受けやすい<sup>2)</sup>、低温感受性が非常に高く短時間の低温感作でも発生能に影響を受けやすいことなどに起因していると考えられる。

しかし近年、新しい凍結手法として開発<sup>3)</sup>されたガラス化保存技術により、今まで困難とされてきた性判別卵や体外受精由来の初期胚などの長期保存が可能となった<sup>4),5)</sup>。このガラス化保存技術は様々な方法があるが<sup>6),7),8),9),10),11),12)</sup>、なかでもガラス化溶液を液体窒素中にそのまま滴下するマイクロ・ドロプレット法<sup>13)</sup>(以下MD法)が未受精卵子の凍結に有効とされており<sup>14),15)</sup>、クローン胚作成においてレシピエント卵子確保へ応用されている<sup>16)</sup>。しかし、その成績は新鮮な未受精卵子を用いたものに比較するとまだ低いのが現状であり、安定した技術にするために改良が必要である。

MD法で保存した未受精卵子の発生率の向上を目的に、成熟培養時間および融解後の培養の影響を検討した。

### 材料及び方法

#### 1 サンプル

試験に用いた未受精卵子は2通りの方法により採取を行った。1つはと体卵巣より卵巣表面にある直径2~5mmの小卵胞より卵子を吸引採取し、ランクA、およびBの卵子を選別後、成熟培養に供した。

また、もう1つについては超音波誘導経膈採卵により生体から採取し、同様に卵子の選別を行い成熟培養に供した。

#### 2 成熟培養

成熟培地は25mM HEPES緩衝TCM199培地(以下TCM199培地:GIBCO)を基礎溶液とし、5%牛胎児血清(以

下FCS)およびKanamycin Monosulfate(SIGMA)、 $\beta$ -Estradiol(SIGMA) in Ethanol(和光純薬)、FSH(デ  
ンカ)、sodium Pyruvate(和光純薬)を表1に示したように添加して調整した。培養条件は38.5℃、  
5%CO<sub>2</sub>、95%空気の炭酸ガス培養器内で湿度飽和状態であった。また、成熟培養後、0.025%Hyal  
uronidase(SIGMA)溶液中にて卵丘細胞を除去し、極体放出の見られたものを試験に供した。

### 3 凍結方法

MD法では未受精卵子をTCM199培地を基礎培地として3%Ethylene Glycol(以下EG:和光純薬)と20  
%FCSを添加した前平衡液で10分間平衡した後、TCM199培地に40%EGと1.0M Sucrose(以下Suc:和光  
純薬)を添加したガラス化溶液(Vitrification Solutuion 14:以下VS14)中で30秒中に3回洗浄し、  
30秒経過した時点で先を細くのばしたパスツールピペットを用いて液体窒素上にVS14溶液とともに  
未受精卵子を滴下することで、ガラス化を行った。

融解はTCM199培地を基礎培地として0.3 MSucと20%FCSを添加した溶液にガラス化された未受精  
卵子を投入し3分間静置し、その後、成熟培地に5分間静置し、静置後数回洗浄した。なお、すべての  
溶液は37℃に加温して試験に供するとともに、全ての操作は37℃に加温した加温盤上で行った。

### 4 体外受精

体外受精は未受精卵子をKobayashiら<sup>17)</sup>の方法に準じて行った。1頭の凍結融解精液を受精培地(I  
VF100:機能性ペプチド研)で2回遠心洗浄(2000回転、5分間)後、精子濃度 $1 \times 10^8$  sperm/mlに調整し  
た。この精子浮遊液を用いて100ulの受精培地ドロップを作成し、成熟卵子を10個ずつ導入するこ  
とにより媒精を行った。媒精6時間後に卵子周囲の精子を取り除き、無血清培地(IVD101:機能性ペ  
プチド研)に移して38.5℃にて、5%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>、90%空気の炭酸ガス培養器内で湿度飽和状態で  
培養を行い、卵子の発生を観察した。

### 5 試験区分

試験1では新鮮卵を用いて体外受精における成熟培養時間の供試適期を調べるため、裸化後すぐ  
に体外受精に供した19時間+0時間区と、さらに3時間培養を継続した19時間+3時間区の2区を設定  
した。

試験2ではMD法における成熟培養時間および融解後の培養時間の影響を調べた。すなわち、裸  
化後ガラス化保存・融解し体外受精に供した19時間+0時間+MD区と、成熟培養時間を継続した19時  
間+3時間+MD区、並びに融解後3時間培養を行い体外受精した19時間+0時間+MD+3時間区であっ  
た。

表1. 成熟培地の組成

組成	
25mM Hepes緩衝TCM199	9.5ml
FCS(5%)	0.5ml
カナマイシン(80mg/ml stock)	10 $\mu$ l
エストラジオール(1mg/ml EtHanol stock)	10 $\mu$ l
FSH(20AU/ml stock)	10 $\mu$ l
ビルビン酸Na(0.2M/ml stock)	10 $\mu$ l

## 結果及び考察

試験1では分割率および胚盤胞発生率、脱出胚盤胞率は、19時間+0時間区において50.0%、41.7%、  
25.0%であったのに対し、19時間+3時間区では52.4%、35.9%、22.3%と差異はなく、培養時間による発  
生率の違いは認められなかった(図1)。試験2では、試験1と同様の時間設定でガラス化保存を行  
ったにも関わらず、19時間+0時間+MD区において分割率および胚盤胞発生率、脱出胚盤胞率が18.2%  
9.1%、4.5%であったのに対し、19時間+3時間+MD区では26.2%、16.7%、6.3%であり、成熟培養時間の  
短い区において全てが低い結果となった。一方、19時間+0時間+MD+3時間区において分割率では31.  
3%、胚盤胞発生率が15.0%、脱出胚盤胞率が5.0%と、いずれの成績にも改善が認められた(図2)。

融解後の培養については、すでに緩慢凍結においてAsadaら<sup>18),19)</sup>が同様の試験を行っているが、その  
後の体外受精成績においてはあまり改善が認められていない。これは体外成熟時間と融解後の培養時  
間の総計が24時間あるいは30時間と通常より長い点と、卵丘細胞を除去しないで凍結に供試している  
ため、凍結時の温度感作にムラが生じたことにより改善されなかった可能性が考えられる。そこで本  
試験では媒精への供試時間を通常の体外受精と同様<sup>20)</sup>に成熟培養22時間を基準として、極体の放出が確  
認できる19時間区とさらに3時間の培養を継続した区の2区を設定し、また卵丘細胞をすべて裸化する  
ことにより温度感作のムラを防いでいる。

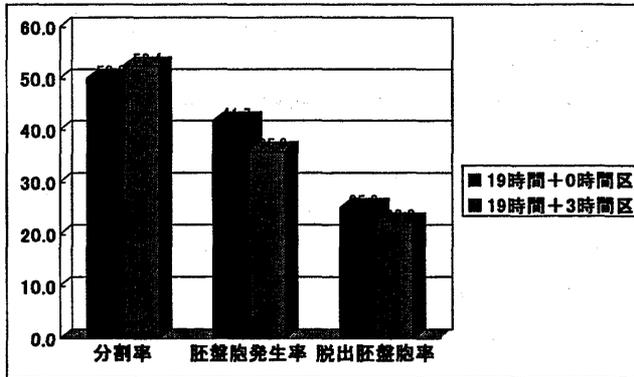


図1. 新鮮卵における成熟培養時間と体外発生成績

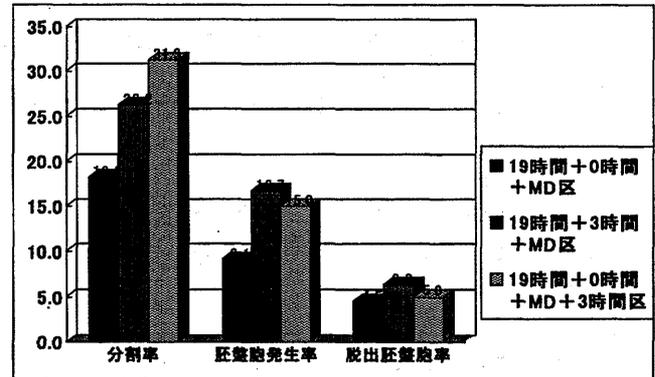


図2. ガラス化保存卵における成熟培養時間と体外発生成績

体外受精において高い受精率を得るためには卵子の成熟が必要であり、これはたぶんに成熟培養時間に影響を受けるものと考えられる。これについては試験1の結果から、新鮮卵であれば成熟培養が19時間あるいは22時間のいずれにおいても成績に差がみられず、体外受精への供試については通常の成熟培養時間より短い19時間でも可能であることが認められた。しかし、試験2において同様の時間設定でガラス化保存を行ったところ成熟培養時間が19時間の区では成績に著しい低下がみられ、3時間の追加培養によりその後の分割率、胚盤胞発生率、脱出胚盤胞率の全てにおいて成績が改善された。このことにより、MD法に未受精卵子を凍結する場合にはある程度の成熟培養時間を確保することが必要であると考えられる。また、融解後の追加培養も有効であることから、今後、クローン胚における胚操作のダメージと培養条件についてさらに検討する必要がある。

今回の試験では未受精卵子のガラス化保存について、ガラス化保存前の成熟培養時間が融解後の発生に影響を及ぼしていること、また融解後の追加培養により発生能に改善がみられることが示唆された。しかしながら、その発生成績は新鮮卵と比較していぜん低く、今後さらに改善を行っていく必要がある。

## 引用文献

- 1) 高橋清也(2001):クローン研究の最近の進展:クローン動物の正常性と異常性. 畜産技術, 557, 11-14.
- 2) Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H(1998): Open Pulled Straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT, 51, 53-58.
- 3) 葛西孫三郎(1997):受精卵の凍結保存—緩慢法とガラス化法. 家畜人工授精, 205, 15-21.
- 4) 富永敬一郎・濱田由佳子(2001):ウシ体外受精由来初期胚の緩慢凍結およびガラス化保存. 日本胚移植学雑誌, 23, 19-26.
- 5) ISHIMORI H, SAEKI K, INAI M, NAGAO Y, ITASAKA J, MIKI Y, SEIKE N, KAINUMA H(1993): VITRIFICATION OF BOVINE EMBRYOS IN A MIXTURE OF ETHYLENE-GLYCOL AND DIMETHYL-SULFOXIDE, THERIOGENOLOGY. 40 (2), 427-433.
- 6) Papis K(2001): "Open" vitrification methods and their application in mammalian oocyte and embryo cryopreservation, MEDYCYNA WETERYNARYJNA, 57 (8): 547-551.
- 7) Lane M, Gardner DK(2001): Vitrification of mouse oocytes using a nylon loop. MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT, 58 (3), 342-347.
- 8) Martino A, Songsasen N, Leibo SP(1996): Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. BIOLOGY OF REPRODUCTION, 54 (5), 1059-1069.
- 9) L. Lazar, J. Spak, V. David(2000): The Vitrification of in Vitro Fertilized Cow Blastocysts by the Open Pulled Straw Method. Theriogenology, 54, 571-578.
- 10) 濱田由佳子・富永敬一郎(2001):ゲル・ローディング・チップを用いたウシ胚のガラス化保存. 家畜人工授精, 205, 8-14.
- 11) 笠井裕明・福見善之・後藤充宏(2001):ストローカット法による牛体外受精由来胚のガラス化凍結. 家畜人工授精, 205, 15-21.
- 12) 浜野晴三・濱脇淳(2001):牛胚の保存と利用について. 日本胚移植学雑誌, 23, 27-31.
- 13) RIHA J, LANDA V, KNEISSL J, MATUS J, JINDRA M, KLOUCEK Z(1991): VITRIFICATION OF CATTLE EMBRYOS BY DIRECT DROPPING INTO LIQUID-NITROGEN AND EMBRYO SURVIVAL AFTER NONSURGICAL TRANSFER. ZIVOCISNA VYROBA, 36 (2): 113-119.

- 14) 志水学(2001):牛未受精卵子のガラス化保存と利用. 日本胚移植学雑誌, 23, 18.
- 15) K. Papis, M. Shimizu, Y. Izaike(2000): Factors Affecting the Survivability of Bovine Oocytes Vitri-fied in Droplets. Theriogenology, 54, 651-658.
- 16) 今井昭(2001):マイクロドロップレット法によるウシ核移植レシピエント卵子及び体外受精由来桑実胚のガラス化保存. 家畜人工授精, 205, 2-7.
- 17) Kobayashi K, Takagi Y, Satoh T, Hoshi H and Oikawa T (1992): Development of early bovine embryos to the blastocyst stage in serum-free conditioned medium from bovine granulosa cells. In Vitro Cellular and Developmental Biology, 28A, 255-259.
- 18) M. Asada, Y. Fukui(2000): Effect on Fertilization and Development by Re-Culture After Freezing and Thawing of Bovine Oocytes Matured in vitro. Theriogenology, 54, 889-898.
- 19) Im KS, Kang JK, Kim HS(1997): Effects of cumulus cells, different cryoprotectants, various maturation stages and preincubation before insemination on developmental capacity of frozen-thawed bovine oocytes. THERIOGENOLOGY, 47(4), 881-891.
- 20) 中原仁・有安則夫・小田頼政・坂部吉彦・長田敏一(2000):高能力牛を活用したクローン牛の生産技術の開発—無血清培地で成熟培養した牛卵胞卵子が発生に及ぼす影響—. 岡山県総合畜産センター研究報告, 11, 87-89.