

ブタ胚凍結保存における最近の進歩

Recent Progress in Cryopreservation of Porcine Embryos

～ブタ胚の凍結保存～

吉岡裕輝^{1,3}、江崎律子¹、黒目麻由子¹、牛島仁²、長嶋比呂志¹
H. Yoshioka^{1,3}, R. Esaki¹, M. Kurome¹, H. Ushijima², and H. Nagashima¹

明治大学農学部発生工学研究室¹、 千葉県畜産総合研究センター²、

国立遺伝学研究所³

神奈川県川崎市多摩区東三田 1-1-1¹、千葉県八街市八街へ 16-1²、
静岡県三島市谷田 1111³

Department of Animal Production, Meiji University¹, Chiba Prefectural Animal
Experimental Station², National Institute of Genetics³
Kawasaki, 214-8571, Japan¹, Chiba, 289-1113, Japan², Mishima, 411-8540, Japan³

The present study aimed at developing an efficient vitrification protocol for cryopreserving porcine embryos. Permeability of ethylene glycole (EG), DMSO (DM) and propylene glycole (PG) to the *in vitro* matured oocytes was same, whereas glycerol was not permeable. Toxicity of the cryoprotectants was lowest when EG and DM were used in combination, compared to the other combinations such as EG + PG and PG + DM. Vitrification of the delipated morulae derived from IVM oocytes revealed that EG + DM was more effective than EG + PG. *In vivo* derived morulae were shown to survive (44.4%) vitrification by the minimum volume cooling (MVC) method using 15% EG + 15% DM as cryoprotectants. Removal of cytoplasmic lipid droplets by centrifugation prior to vitrification significantly increased the post thaw survival (100%) of the morulae. These results demonstrated that the protocol using MVC and delipation could be an efficient method for cryopreservation of porcine embryos.

Key words: pig · vitrification · cryopreservation · lipid · delipation

緒言

現在、ブタ胚の凍結保存は生体由来胚のみでしか成功例がなく、今後改善すべき課題は、ブタ胚そのものの性質に関する問題や凍結法の問題など、多くあると思われる。まず、ブタ胚は他の動物に比べ、低温感受性が高いことが知られている¹⁾。細胞質内に高濃度で存在する脂肪顆粒がブタ胚の高い低温感受性の原因のひとつだろうと考えられている。このことは、ブタ胚から脂肪顆粒を除去 (Delipitation) すると耐凍性が向上する事から明らかである^{2,3)}。以上の事から、ブタ胚の脂肪顆粒除去は凍結保存において耐凍性を付与する手段となり得る。

次に、胚の低温保存には、Conventional freezing と呼ばれる緩慢凍結法と Rapid cooling、そして Vitrification 法の3つの方法がある。Conventional freezing は古典的な方法として知られ、低温耐性の高いステージ、すなわち拡張胚盤胞や脱出胚盤胞といった限定されたステージのみでしか、凍結・融解後に産仔を得たという報告は無い^{4,5)}。一方、Vitrification 法は1985年にマウス胚を材料とした凍結法として報告⁶⁾され、その後様々な種で用いられている。液体窒素を用いて凍結液を過冷却することにより、氷晶形成をすることなしで液の流動性をなくし (ガラス化)、保存するという方法である。Vitrification 法を用いることにより、ブタ胚の凍結保存後の生存性が従来法に比べて向上することが報告されている⁷⁾。しかし、ガラス化状態の安定のためには、凍結液にエチレングリコールやジメチルスルホキシドなどといった細胞毒性のある耐凍剤を高濃度で添加

しなければならない。そのため、できるだけ低い濃度で耐凍剤を使用し、毒性を緩和することが望まれる。低濃度で安定なガラス化状態をもたらすためには、超急速な温度下降が必要とされる。そのため、より少容量のガラス化液を用いる方法が開発されている (MVC 法)⁸⁾。

以上の事から我々は、脂肪顆粒除去と MVC 法を組み合わせる使用することにより、ブタ胚の凍結保存をより一層実用化に近づけることができると考え、以下の研究を行った。

材料と方法

ブタ胚作出 (体外成熟由来単為発生) 屠場で採取した卵巣から吸引法により卵丘卵子複合体 (COC) を採取し、NCSU23 を基礎培地とした成熟培地で44時間成熟培養⁹⁾した (後半22時間はホルモンフリー)。卵の裸化後、第1極体を放出した MII 期卵に、電気刺激 (150V/m, 100 μ s) を与え、単為発生を誘起した。発生培養は培養用 NCSU23⁹⁾、38.5°C / 5%CO₂ / 95%湿度飽和の気相条件下で行った。活性化の日を Day0 として、Day1 の前核期卵、Day2 の2~8細胞期胚、Day4 の桑実胚、Day5~7 の胚盤胞を以下の凍結実験に供した。

ブタ生体由来胚採取

PMSG (帝国臓器)、hCG (帝国臓器) の投与により過排卵を誘起し、hCG 投与の次の日に発情を確認したものに人工受精をした。発情日を Day0 として Day5 に屠殺し、子宮を灌流して胚を採取した。

ブタ胚細胞質内脂肪顆粒除去
胚を $7.5 \mu\text{g/ml}$ のサイトカラシン B (SIGMA) を添加した HEPES-TL-PVP⁹⁾ (HEPES:SIGMA,PVP:SIGMA) に浸漬し 1~2 分程保持した。上記の液(約 1ml) と共に胚を 1.5ml チューブに装填し、 $12500 \times g$ 、23 分間で遠心処置した。脂肪顆粒が細胞質と完全に分離したものについてマイクロマニピュレーションを用いてその脂肪顆粒を除去した。また、Delipation した胚は、1 時間以上インキュベートした後、実験に供した。その時の培養液は NCSU23、気相条件は $38.5^\circ\text{C} / 5\% \text{CO}_2 / 95\%$ 湿度飽和で行った。

MVC 法による卵の凍結・融解

・凍結

卵を 20% 血清、15% の耐凍剤 (後述) を添加した mTCM199 (日水、25mM HEPES 添加) 〈平衡液〉に浸漬し、平衡した。平衡は卵が収縮し、再拡張した時を完了とした。平衡が完了した胚は 20% 血清、0.5M シュークローズ (ナカライ)、30% 耐凍剤 (後述) を添加した mTCM199 〈ガラス化液〉に曝し、ピペッティングで卵周囲の液を完全にガラス化液に置換した。卵を極少量のガラス化液と共にクライオトップ (北里サプライ) 先端にのせ、液体窒素 (LN_2) に投入し凍結した。

・融解

LN_2 からクライオトップを取り出し、 37°C に加温した 20% 血清、1.0M シュークローズ添加の mTCM199 〈融解液〉に先端を浸漬し卵を回収した。卵は融解液中で 1 分間保持した後、20% 血清、0.5M シュークローズ添加の mTCM199 〈希釈液〉に浸漬し 3 分間保持した。希釈が完

了した卵は 20% 血清添加の mTCM199 〈洗浄液〉で 5 分間ずつ 2 回洗浄し回収した。

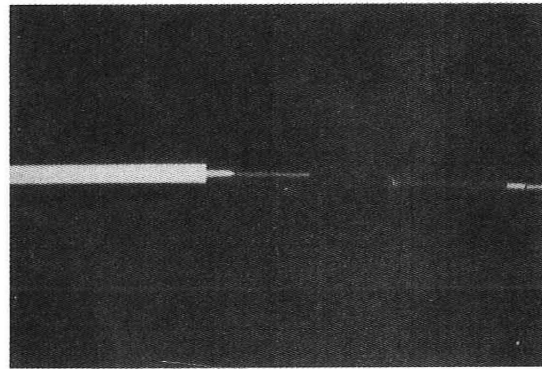


写真 1. クライオトップ実物

実験 1・浸透性試験

ブタ胚凍結保存の際に、耐凍剤を等濃度で混合して使用する事により各耐凍剤の濃度を低下させ、胚に対する化学毒性を緩和する事を目的として、各耐凍剤のブタ胚に対する浸透性を調べた。実験にはブタ MII 期卵を供試した。20% 血清、15% の耐凍剤 (エチレングリコール; ナカライ:EG, ジメチルスルホキシド; Wako:DM, プロピレングリコール; ナカライ:PG, グリセロール; ナカライ:G) を添加した mTCM199 に卵を浸漬し、浸漬した時から卵が収縮し再拡張するまでの時間を計測し、それを浸透性の指標とした。

実験 2・毒性試験

耐凍剤には EG、DM、PG の 3 種の内、2 種を混合して使用する事とした。その全ての組み合わせについて、ブタ胚に対する化学毒性を調べ、ブタ胚の凍結保存に最も適した耐凍剤の組み合わせを検討した。実験にはブタ MII 期卵を供試した。卵を、MVC 法の凍結・融解過程に従って処理し、平衡過程の終了後、液体

窒素への投入を行わずに、希釈・洗浄過程に移った。回収した胚は電気刺激によって単為発生を誘起した後、48時間の培養を行い、その時の正常分割率によって毒性を判定した。培養には NCSU23 を使用し、気相条件は 38.5°C/5%CO₂/95%湿度飽和で行った。

実験 3・体外生産胚凍結試験

MVC 法を用いたブタ胚凍結の有効性を検討した。さらに、耐凍剤について EG+DM、EG+PG の 2 通りを比較した。また、実験には体外成熟・単為発生由来桑実胚を Delipation したものを供試した。凍結・融解した胚の培養には 10%FCS 添加 NCSU23 を使用し、気相条件は 38.5°C/5%CO₂/95%湿度飽和で行った。胚は 48 時間の培養の後、生存判定を行った。

実験 4・生体由来胚凍結試験

生体由来胚に対する、MVC 法の有効性の確認を行った。また、Delipation に代わる脂肪顆粒除去法の開発においても検討を行った。実験にはブタ生体由来桑実胚及び初期胚盤胞を供試した。胚を無処置（対照区）、Delipation (Deli 区)、遠心処置のみの 3 区に分け、それぞれ凍結・融解を行った。融解後、遠心処置のみで凍結したものに関しては、さらに 3 区に分け、そのまま培養（遠心区）、Pronase で透明帯を除去した後培養（Pronase 区）、マイクロマニピュレーション（マイクロブレード使用:Bisection）によって脂肪部分を除去した後培養（Bisection 区）を行い、その後の発生を見た。胚の培養には 10%FCS 添加 NCSU23 を使用し、気相条件は 38.5°C/

5%CO₂/95%湿度飽和で行った。胚は 48 時間の培養の後、生存判定を行い、細胞数の計測も行った。

結果

実験 1・浸透性試験

20%血清、15%の耐凍剤を添加した mTCM199 に浸漬された卵が、収縮し再拡張するまでの時間を計測した。各耐凍剤について 4~5 個の卵を用い、収縮・再拡張時間の平均を出した。その結果、EG は 4 分 10 秒、DM は 4 分 40 秒、PG は 3 分 49 秒であった。しかし、グリセロールにおいては再拡張せずブタ M II 期卵には浸透しないという結果となった。以上の結果より、EG、DM、PG については浸透性が等しいので 2 種を等濃度で混合使用できることが明らかとなった。

実験 2・毒性試験

耐凍剤を 2 種混合して使用した場合の毒性を単為発生卵の正常分割率を指標として比較した。その結果、EG+DM 区では 24/46 (52.2%)、EG+PG 区では 20/47 (42.6%)、PG+DM 区では 18/47 (38.3%) と、PG+DM の組み合わせは若干毒性が強いという結果を得た。それに対し、無処置区の正常分割率は 16/34 (47.1%) であった。

実験 3・体外生産胚凍結試験

EG+DM、EG+PG の混合した耐凍剤が Delipation した桑実胚に有効かどうかを検討した。凍結・融解後 48 時間での胚盤胞形成率は、EG+DM 区では 13/41 (31.7%)、EG+PG 区では 4/41 (9.8%) と有意な差が認められた (p<0.05)。さ

らに、その時の無処置区は10/20(50.0%)、**Delipation**・凍結なし区は13/36(36.1%)とEG+DMの凍結区と有意な差は認められなかった。

表1. 体外生産胚の融解後の生存率

	供試胚数	胚盤胞数 (%)
無処置	20	10 (50.0%)
Delipation	36	13 (36.1%)
EG+DM	41	13 (31.7%)
EG+PG	41	4 (9.8%) *

*は他の区と有意差あり (p<0.05)

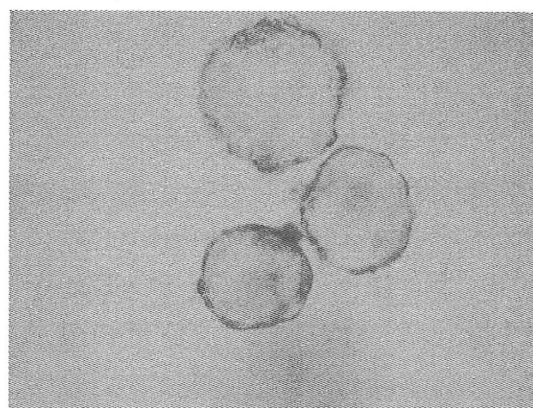
実験4・生体由来胚凍結試験

生体由来胚に対する、MVC法の有効性の確認を行った。また、**Delipation**に代わる脂肪顆粒除去法の検討も行った。その結果、対照区と遠心区はそれぞれ、4/9(44.4%)、15/20(75.0%)という結果であった。それに対し、**Deli**区、**Pronase**区、**Bisection**区はそれぞれ、12/12(100%)、11/11(100%)、19/20(95.0%)と圧倒的に良い生存率を示し、さらに**Pronase**で処置した区では、他の区に対し細胞数において有意に高い数値を示した。

表2. 生体由来胚の融解後の生存率

	供試胚数	生存数 (%)	細胞数平均
対照区	9	4 (44.4%)	35.7±7.4
遠心区	20	15 (75.0%)	54.1±5.7
Deli 区	12	12 (100%)	78.2±4.9
Pronase 区	11	11 (100%)	114.5±6.0*
Bisection 区	20	19 (95.0%)	76.9±6.6

*は他の区と有意差あり (p<0.01)

写真2. **Pronase**区、融解後48時間

考察

本研究では、EG+DMを耐凍剤としてMVC法を生体由来胚に用いることにより、5割近い生存率を得ることができた。これは耐凍剤を等濃度で混合することによって個々の濃度を低下させたこと、さらに凍結液を極小にすることで温度下降速度を上昇させ、ガラス化状態を作り出すのに必要な耐凍剤濃度を低下させたことにより、胚に対する耐凍剤の化学毒性が緩和されたことが大きな要因だと考えられる。また、MVC法で**ブタ**胚を凍結する際に、脂肪を遠心処置により偏在させるだけでも生存率は向上する。しかし、**Delipation**した胚ほどの生存率は得られない。だがこれを融解後、**Pronase**区や**Bisection**区のように偏在させた脂肪を除去することで**Delipation**した胚と同等、**Pronase**区に関しては胚のクオリティでも勝る結果が得られた。これにより、マイクロマニピュレーターを用いずに胚に耐凍性を付与することができるということ、また、凍結・融解後の脂肪がその後の発生に悪影響を及ぼすという事が示唆される。また、

体外成熟由来胚からも生体由来胚よりも低率ではあるが生存例が得られている。この差は体外成熟・体外培養の環境要因が大きな原因だろうと考えられる。そのため、胚に耐凍性を付与することができる体外成熟・培養系の作出が必須になってくる。以上の事から、EG+DMを耐凍剤とした MVC 法はブタ胚に効果

的な凍結方法であり、生体由来胚については遠心処置後に凍結し、融解後に Pronase 処置で脂肪を除去することによって実用化レベルの生存を得ることができると考えられる。さらに体外成熟由来胚についても、まだ改善の余地はあるが、効果的な方法であることが示された。

文献

1. Wilmut I.: The low temperature preservation of mammalian embryos. *J.Reprod.Fertil.* 31, 513-514, 1972
2. Nagashima H. ,Kashiwazaki N. ,Ashman R.J. ,Grupen C.G. ,Seamark R.F. ,and Nottle M.B.: Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. *Biol.Reprod.*51,618-622,1994
3. Nagashima H. ,Kashiwazaki N. ,Ashman R.J. ,Grupen C.G. , and Nottle M.B. : Cryopreservation of porcine embryos. *NATURE* 374,416,1995
4. Hayashi S. ,Kobayasi K. ,Mizuno J. ,Saitoh K. ,Hirano S. : Birth of piglets from frozen embryos. *Vet.Rec.*125,43-44,1989
5. Kashiwazaki N. ,Ohtani S. ,Miyamoto K. ,Ogawa S. : Production of normal piglets from hatched blastocysts frozen at -196°C . *Vet.Rec.*128,256-257,1991
6. W.F.Rall, G.M.Fahy: Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *NATURE* 313,573-575 1985
7. Vajta G. : Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Amim.Reprod.Sci.*60-61,357-364,2000
8. Kuwayama M. , Kato O.: All-round vitrification method for human oocytes and embryos. *J.Reprod.Genet.*17,477,2000
9. Kurihara T. ,Kurome M. ,Wako N. ,Ochiai T. ,Mizuno K. ,Fujimura T. ,Takahagi Y. , Murakami H.,Kano K. ,Miyagawa S. ,Shirakura R. , and Nagashima H. :Developmental competence of in vitro matured porcine oocytes after electrical activation. *J.Reprod.Dev.*48,271-279,2002