

# 密度勾配を利用した耐凍剤平衡方法がウシ体外受精胚の生存率と受胎率に及ぼす影響

梶原 豊<sup>1</sup>・平 篤郎<sup>2</sup>・新田 良平<sup>2</sup>・中西 喜彦<sup>1</sup>

<sup>1</sup>鹿児島大学農学部生物生産学科 鹿児島市 〒890-0065

<sup>2</sup>丸紅飼料(株)・技術センター 小野市 〒675-1355

**要旨:**密度勾配を利用した耐凍剤平衡法(密度勾配平衡区)を考案し、従来の方法である1段階平衡法(1段階平衡区)および3段階平衡法(3段階平衡区)と生存率および受胎率を指標として比較検討した。実験1(体外培養試験)では、体外受精日をDay 0として発生培養の7~9日目に胚盤胞期に発生した胚を1段階平衡区(10%グリセロール)、3段階平衡区(3.3%、6.7%および10%グリセロール)、および密度勾配平衡区(試験管に下層より10%、6.7%、3.3%、0%グリセロール溶液を重層)の3区に均等に分配した。実験2(移植試験)では、7~8日目に胚盤胞期に発生した胚を1段階平衡区および密度勾配平衡区の2区に分配した。それぞれの区でグリセロール平衡を行った胚は、0.2 M シュークローズを含む10%グリセロール溶液に移した後、ストローに封入し、プログラムフリーザーを用いて凍結した。融解はストローを液体窒素中から取り出し、10秒間空中に保持した後、38℃の微温湯にて解凍した。凍結融解後の胚を48時間培養した結果、密度勾配平衡区の生存率は3段階区に比べて有意に高い値を示した。1段階平衡区とは有意差はなかったものの密度勾配平衡区の生存率は高い傾向にあった( $P=0.15$ )。胚の発生日(体外受精日を0として胚盤胞期に達した日)別に検討した結果、9日目胚が7日目胚に対して有意( $P<0.01$ )に低い生存率であった。受胎率は、1段階平衡区と密度勾配平衡区で同様であった。以上のことから「密度勾配を利用した耐凍剤平衡方法」は、凍結解凍後の生存率を高める可能性のある方法と思われる。  
キーワード: ウシ, 胚, 密度勾配, 凍結保存, 直接移植

ウシ凍結胚の直接移植法として、Massipら<sup>1)</sup>によるグリセロールとシュークローズの混合液を用いた方法、Suzukiら<sup>2)</sup>によりプロピレングリコールを用いた方法、さらにDochiら<sup>3)</sup>、Voekelら<sup>4)</sup>によりエチレングリコールを用いた方法が報告された。これらの報告以後、ウシ胚では直接移植が可能で凍結方法の利用が多くなってきている<sup>5)</sup>。直接移植法をウシ生体胚や体外受精・体外培養由来のウシ胚(以下、ウシ体外受精胚)に応用し、受胎率を高位安定させるために

は、種々の検討課題が残されている。

胚をグリセロール平衡する際、2~6段階のグリセロール溶液を作製し、順に移し換える方法か、または最終濃度溶液に1回で投入する方法が採られている。これらの方法は操作が煩雑であることと胚に対する浸透圧ショックが考慮されていないと考えられた。著者らは、耐凍剤平衡処理操作の簡便化および凍結融解後におけるウシ胚の生存率の向上を目的として、密度勾配を利用した耐凍剤平衡法の開発を試み、従来の方法と生存率について比較検討を行った。本稿では便宜的に「密度勾配を利用した耐凍剤平衡方法」(以下、密度勾配平衡法)と呼ぶ。さらに受胎率についてもこの密度勾配平衡法が影響するかどうかについても比較検討を行った。

## 材料と方法

**体外成熟:**花田<sup>6)</sup>(1985)の方法を参考に既報<sup>7)</sup>(1991)を改良した方法で行った。と畜場由来の黒毛和種ウシ卵巣を32~35℃に加温したPBS(-)内に採取し、実験室へ搬送した。これらの卵巣表面に存在する直径1~7 mmの小卵胞から20 Gの注射針を付けた5 ml シリンジにて卵胞卵子を吸引採取した。35℃に加温した10 ml 試験管中に10分前後静置した後、上澄みを取り去る。これに子ウシ血清2.5%を含むPBS(+)を加えて未成熟卵子と細胞片が沈むのを待って、上澄みを取り去った。管底の部分を時計皿に移し、実体顕微鏡下で顆粒層細胞と細胞質が正常と判断された卵母細胞を実験に供した。子ウシ血清5%、ストレプトマイシン100 mg/l、アンピシリン100 mg/l、ピルビン酸ナトリウム0.036 g/lを添加した25 mM HEPES 緩衝 TCM-199 (Sigma, M-2520)を成熟培養液として用いた。38.8℃、4%CO<sub>2</sub>の気相条件下で20~22時間の成熟培養を行った。

**体外受精:**人工授精用の黒毛和種凍結精液ストローを温水(32~35℃)中で解凍し、テオフィリン(Sigma, A-1633) 5 mM、ウシ血清アルブミン(Sigma, A-4378) 2.5 mg/ml、ヘパリン(Sigma, H-9133) 10 μg/ml (Parrishら<sup>8)</sup>, 1986; Niwa and Ohgoda<sup>9)</sup>, 1988)を添加したm-B.O.液(原法 Brackett and Oliphant<sup>10)</sup>, 1975)を加え、700 g、5分間の遠心操作を2回繰り返して洗浄した。精子濃度は10×10<sup>6</sup>/mlに調整し、直径35 mmのシャーレに100 μlの小滴とし、

(受付 2000年10月31日/受理 2001年2月21日)

別刷請求先: 〒890-0065 鹿児島市郡元1丁目21-24

鹿児島大学農学部生物生産学科家畜生産学教室

上面は流動パラフィンで覆って約3時間の前培養を行った。体外成熟の終わった卵子を、上記の前培養の終了した精子小滴内に移して、体外受精を行った。

**体外発生培養：**体外発生培養液として子ウシ血清2.5%とストレプトマイシン100 mg/l、アンピシリン100 mg/l、ピルビン酸ナトリウム0.036 g/lを添加した25 mM HEPES 緩衝 TCM-199を用いた。体外受精開始の約6時間後に上記培養液で卵母細胞を2回洗浄し、4 ウェルマルチディッシュ (Nunc, Nalge Nunc 社製) の1 ウェル当たり同液の0.5 ml を含む中に、40～50 個移し、38.8°C、4%CO<sub>2</sub>、10%O<sub>2</sub>の気相条件下で9日間の発生培養を行った。培養は卵丘細胞との共培養条件下で行った。

**凍結方法：**Massip<sup>1)</sup>の方法を基本に以下の改良した方法で行った。

**耐凍剤：**10%グリセロール溶液は10 mlのグリセロールと10 mlの子ウシ血清をPBS(+)に加え、最終的に100 mlとしたものとした。

10%グリセロール+0.2 Mシュークロース溶液は10 mlのグリセロール、6.846 gのシュークロース、10 mlの子ウシ血清をPBS(+)に加え、最終的に100 mlとしたものとした。

**供試胚：**受精日をDay 0として発生培養の7～9日目に胚盤胞期に発生した胚を本研究に用いた。Kuzan<sup>11)</sup>の分類に基づき7～8日目胚においてはBランク以上の胚を、9日目胚においてはAランク胚のみを実験に供した。発生日の異なるウシ体外受精胚の凍結解凍後の生存率は有意に異なること<sup>12)</sup>より各区へはなるべく均等に分配した。

#### 実験1：グリセロールの平衡方法について

以下の3区に胚盤胞期への発生日別に均等に分配した。

**1段階平衡区 (One Step)：**10%グリセロール溶液に直接投入し、20分間の平衡を行った。

**3段階平衡区 (Three Step)：**3.3%、6.7%、10%グリセロール溶液間を6～7分間毎に移動し、計20分間のグリセロール平衡を行った。

**密度勾配平衡区 (Gradient)：**5 mlの試験管 (Greiner 社製、製品番号115162) に下層より10%、6.7%、3.3%、0%グリセロール溶液をそれぞれ1.5 ml、1.0 ml、1.0 ml、0.5 ml 順に積み上げるように静かに上面に重層した。上部に胚を静かに置き、最下部に沈んだ胚を約20分後に回収した。

それぞれの区でグリセロール平衡を行った胚は、0.2 Mシュークロースを含む10%グリセロール溶液に移した後、0.25 ml容量のストローに封入した。これらの操作 (グリセロールに感作させている時) は室温 (24～27°C) 下で行った。0.2 Mシュークロースを含む10%グリセロール溶液に移した後、プログラムフリーザー (ET-1、富士工業製) にセットするまでの時間は10分とした。直接-5.5°Cに保ったプログラムフリーザーに入れ、植氷後、同温度で10分間保持したのち、-5.5°Cから-28.0°Cまで0.5°C/min.の冷却速度で冷却後、液体窒素中に保存した。融解はストローを液

体窒素中から取り出し10秒間、空中に保持した後、38°Cの微温湯にて解凍した。ストローはこの状態 (38°Cの微温湯中) で5分間静置した後、胚は20%子ウシ血清を含むPBS (+)にて3回洗浄し、培養を行った。

また、本実験で用いた試験管内に作製した密度勾配平衡が時間の経過とともに、どの程度変化していくかを確認するために最上部と最下部の浸透圧を測定した。作製直後から30分経過まで10分毎にそれぞれ5回測定した。

**生存性の判定：**回収した胚は顆粒膜細胞の単層を形成させたNunc 4 ウェルマルチディッシュを用い、5%子ウシ血清と抗生物質を含む25 mM HEPES 緩衝 TCM199 500 μl を流動パラフィンで覆い、1 ウェル当たり2～5個の胚を投入して48時間の培養を行った。胞胚腔の回復とICMが明瞭に確認できた胚を生存胚と判定した。

#### 実験2：凍結体外受精胚の移植実験

発生培養の7～8日目に胚盤胞期に発生した胚のみを用いた。実験1で得られた結果より、最も成績の悪かった3段階平衡区を排して、1段階平衡区と密度勾配平衡区の2区に限定して、グリセロール平衡方法を行った。それぞれの方法でグリセロール平衡を行った胚をストロー1本当たり2個、封入した。その他の凍結方法と凍結曲線は実験1と同様である。液体窒素中から取り出したストローを10秒間、室温下で空中に保持した後、38°C前後の微温湯にて解凍した。ストローのパウダー端の空気層をストローカッターで切断後、ストロー内の液層を操作することなく直ちに移植器にセットし、融解後、概ね5分以内に発情後6～8.5日目の受胎牛の黄体側子宮角に胚を直接移植 (2個の胚/1ストロー/頭) した。

受胎牛はホルスタイン種の搾乳牛 (3～5歳齢) を用いた。農家の申告に基づいて発情を確認し、直腸検査により排卵を確認したものは発情1日後とした。移植は4名の技術者によって行った。受胎の判定は、移植後40～60日目に直腸検査と超音波診断によって流産の発生、分娩数、双子率を調査した。

**統計処理：**実験1では各試験区の生存率 (F=生存胚数/供試胚数) を胚の発生日毎にArcsin√F変換後、試験区間および胚の発生日別にそれぞれt検定により比較した。実験2では試験区間の差をχ<sup>2</sup>検定により検討を行った。

## 結果

#### 実験1：グリセロールの平衡方法について

グリセロールの平衡方法が凍結解凍後、体外培養時の生存率におよぼす影響をTable 1に示した。1段階平衡区の生存率は52.8% (19/36)、3段階平衡区の生存率は36.1% (13/36)、および密度勾配平衡区の生存率は75.0% (27/36) と、密度勾配平衡区が3段階平衡区に比較して有意 (P < 0.05) に高い生存率であった。また、胚の発生日別に検討した結果、9日目胚が7日目胚に対して有意 (P < 0.05) に低い生存率であった。

**Table 1.** Influence of glycerol equilibration method on *in vitro* survival rate of bovine blastocysts after freezing and thawing (Exp. 1)

Method of equilibration	Survivors % (No. survival /No. of embryos)			
	Day 7	Day 8	Day 9	Total
One Step	63.4 (9/14)	50.0 (6/12)	40.0 (4/10)	52.8 <sup>ab</sup> (19/36)
Three Step	42.9 (6/14)	33.3 (4/12)	30.0 (3/10)	36.1 <sup>b</sup> (13/36)
Gradient	85.7 (12/14)	75.0 (9/12)	60.0 (6/10)	75.0 <sup>a</sup> (27/36)
Survivors % of each Day	64.3 <sup>c</sup> (27/42)	52.8 <sup>cd</sup> (19/36)	43.3 <sup>d</sup> (13/30)	

<sup>a, b</sup>) Means with different superscripts in the same column were significantly different ( $P < 0.05$ , t-test). <sup>c, d</sup>) Means with different superscripts were significantly different ( $P < 0.05$ , t-test). Experiments were replicated four times. One Step: Directly plunged into 10% glycerol solution. Three Step: Equilibrated with 3.3%, 6.7% and 10% glycerol solution. Gradient: Four different concentrations of glycerol solution were loaded in a small test tube; 10%, 6.7%, 3.3% and 0% from the bottom to the top.

**Table 2.** Influence of glycerol equilibration method on pregnancy, abortion and twinning rate of bovine blastocysts after freezing and thawing (Exp. 2)

Method of equilibration	No. of recipients	No. pregnant (%)	No. of abortions (%) <sup>a</sup>	No. of normal calving (%) <sup>b</sup>	No. of twinning (%) <sup>c</sup>
One Step	58	20 (34.5)	2 (10.0)	18 (90.0)	2 (11.1)
Gradient	61	25 (41.0)	3 (12.0)	22 (88.0)	4 (18.2)

Means were not significantly different with chi-square test ( $P > 0.05$ ). <sup>a</sup> Abortion rate (number of abortions/number of pregnancies). <sup>b</sup> Normal calving rate (number of normal births/number of pregnancies). <sup>c</sup> Twinning rate (number of twin births/number of calving).

密度勾配平衡を作製するために用いた0%グリセロール溶液(10%CS加PBS(+))の浸透圧は $315.2 \pm 0.92$  mOsm., および10%グリセロール溶液の浸透圧は $2359.4 \pm 10.07$  mOsm.であった。試験管最上部の浸透圧は、0%グリセロール溶液315.2 mOsm.と同様 作製直後316.0 mOsm.であったが、10, 20, 30分経過後は、それぞれ321.0, 328.4, 330.2 mOsm.と時間の経過とともに僅かに濃くなった。最下部の浸透圧は、2265.2 mOsm.と10%グリセロール溶液2359.4 mOsm.の4%程薄くなったが、10, 20, 30分経過後は、それぞれ2254.2, 2251.4, 2251.0 mOsm.と時間が経過してもほとんど変化は無かった。本実験で使用した条件下では試験管に作製した密度勾配平衡の最上部から最下部までは約5.5cmの高さがあり、胚は最も早いもので約10分後に、最も遅いもので約17分後に最下部に達した。

#### 実験2：凍結体外受精胚の移植実験

グリセロールの平衡方法が受胎率に及ぼす影響はTable 2に示した。1段階平衡区を受胎率は34.5% (20/58)、密度勾配平衡区を受胎率は41.0% (25/61)で、有意差 ( $P > 0.05$ ,  $\chi^2$ -test)は無かった。1段階平衡区と密度勾配平衡区の流産率は各10.0%と12.0%、双子分娩率は各11.1%と18.2%で有意差 ( $P > 0.05$ ,  $\chi^2$ -test)は無かった。

#### 考 察

ウシ体外受精胚をグリセロール平衡する際、平衡方法の違いは解凍後の生存率に影響し、密度勾配平衡区が3段階平衡区に比較して有意に良好であった (Table 1)。1段階平衡区と密度勾配平衡区の間には有意差が認められず、3段階平衡区の生存率が低かった原因として、本研究では全ての区でグリセロールの平衡時間は20分としたが、鈴木<sup>13)</sup>によるとウシ生体胚を10%グリセロール溶液に平衡する場合、30分間程度必要とされている。そのため1段階平衡区と密度勾配平衡区は充分であったのに対して本実験の3段階平衡区では10%グリセロール溶液に浸漬する時間が短く、生存率は低かった可能性がある。またNiemann<sup>14)</sup>はウシ生体胚で1段階平衡区と5段階平衡区の生存率、受胎率および退行胚率を比較し、有意差はないがすべての点で1段階平衡区の方が良好であったことを報告している。また発生日別に検討した結果、発生日は生存率に有意な影響を与え、9日目胚の生存率は低かった。しかし、本実験において9日目胚の生存率は全体の傾向と同様であったので、凍結等の予備試験等に使用することは可能と考えられた。

また密度勾配平衡作製に用いた10%グリセロール溶液の浸透圧は2359.4 mOsm.であったので、この値と比較すると

最下の部分は作製した時点で4%程薄くなり、その後はほぼ維持されることがわかった。30分経過後も大きく変化することはなかったため、実験中は密度勾配が崩れることは無かったと考えられた。

実験2の結果 (Table 2) より、2区間に有意差は認められないが、体外培養時の生存率である実験1の結果から密度勾配平衡区が受胎率を改善する可能性が示唆された。下平<sup>5)</sup>は日本国内の直接移植法による受胎率は37.0%と報告しており、本実験の受胎率は密度勾配平衡区で41.0%と、ウシ生体胚を用いたこれらの報告と比較して同等であった。直接移植法は移植現場での労力が少ないことから、今後ますます利用されていくと思われる。流産率に両区の差は無く、両区を合計すると11.1% (5/45) で、ウシ体外受精胚を用いた Hasler ら<sup>15)</sup>は11%と、またウシ生体胚を用いた Dochi ら<sup>16)</sup>の報告と比較してもほぼ同様の値であった。

ウシ体外受精胚はウシ生体胚に比較して耐凍性が低く<sup>18)</sup>、凍結解凍後のウシ体外受精胚はウシ生体胚に比較して受胎率が低いことが報告されている<sup>15)</sup>。耐凍性の違いは、体外培養系が完全ではないことを示していると考えられ、ウシ体外受精胚の直接移植法による受胎率をさらに向上させるためには、培養環境を整えることで胚質を向上させることと効果的な凍結法を開発することが重要と考えられる。今後、エチレングリコール等グリセロール以外の耐凍剤で密度勾配平衡法を検討していきたい。

### 謝 辞

本研究の遂行に際して、協力いただいた菱山和洋氏、米谷尚子史、小林里美史、斎藤 聡氏、下中裕次氏、山口泰雅氏、遠藤雅尚氏に深く感謝します。移植試験に協力いただいた愛知県みどり牛乳ET部会の関係者に深く感謝します。本研究の一部は、家畜受精卵移植技術研究組合の助成により行われた。

### 文 献

- 1) Massip, A., Van Der Zwalm, P. and Ectors, F. (1987): Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. *Theriogenology*, 27, 69-79.
- 2) Suzuki, T., Yamamoto, M., Ooe, M., Sakata, A., Matsuoka, K., Nishikata, Y. and Okamoto, K. (1990): Effect of sucrose concentration used for one-step dilution upon *in vitro* and *in vivo* survival of bovine embryos refrigerated in glycerol and 1,2-propanediol. *Theriogenology*, 34, 1051-1057.
- 3) Dochi, O., Imai, K. and Takakura, H. (1995): Birth of calves after direct transfer of thawed bovine embryos stored frozen in ethylene glycol. *Anim Repr Sci.*, 38:179-185.
- 4) Voekel, S.A. and Hu, Y.X. (1992): Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 37, 23-37.
- 5) 下平乙夫 (1997): 国内外における家畜胚の流通の現状. *日本胚移植学雑誌*. 19: 34-37.
- 6) 花田 章 (1985): ウシにおける体外受精. *家畜繁殖学雑誌*, 31 (5): 56-61.
- 7) 梶原 豊・米谷尚子・小林里美・下中裕二・後藤和文 (1991): 卵丘細胞・子宮内膜上皮細胞との共培養により得られた体外受精由来胚盤胞期胚の移植成績. *家畜繁殖学雑誌*, 37 (3): 177-184.
- 8) Parrish, J.J., Parrish, J.L., Leibfried-Rutledge, M.L., Crister, E.S., Eyestone, W.H. and First, N.L. (1986): Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 25, 591-600.
- 9) Niwa, K. and Ohgoda, O. (1988): Synergistic effect of caffeine and heparin on *in-vitro* fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology* 30, 733-741.
- 10) Brackett, B.G. and Oliphant, G. (1975): Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. of Reprod.*, 12, 260-274.
- 11) Kuzan, F. B. (1986): Techniques for freezing mammalian embryos. 33-34, *The Animal Reproduction laboratory, Colorado State University*.
- 12) 梶原 豊・米谷尚子・菱山和洋 (1990): ウシの体外受精の実際, 家畜の繁殖と育種 (鈴木達行編集), pp. 171-183, 農業図書株式会社, 東京.
- 13) 鈴木達行 (1990): 受精卵の凍結保存・融解, 家畜の繁殖と育種 (鈴木達行編集), pp. 85-94, 農業図書株式会社, 東京.
- 14) Niemann, H. (1985): Freezing of bovine embryos: Effects of a one-step addition of 1.4 M glycerol. *Theriogenology*, 23, 369-379.
- 15) Hasler, J.F., Henderson, W.B., Hurtgen, P.J., Jin, Z.Q., McCauley, A.D., Mower, S.A., Neely, B., Shuey, L. S., Stokes, J.E. and Trimmer, S.A. (1995): Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, 43, 141-152.
- 16) Dochi, O., Yamamoto, Y., Saga, H., Yoshida, N., Kano, N., Maeda, J., Miyata, K., Yamauchi, A., Tominaga, K., Oda, Y., Nakashima, T. and Inohae, S. (1998): Direct transfer of bovine embryos frozen-thawed in the presence of propylene glycol or ethylene glycol under on-farm conditions in an integrated embryo transfer program. *Theriogenology*, 49, 1051-1058.
- 17) 堂地 修・今井 敬 (1999): ウシ凍結胚の直接移植法, *日本胚移植学雑誌*. 21: 28-34.
- 18) Pollard, J.W. and Leibo, S.P. (1993): Comparative cryobiology of *in vitro* and *in vivo* derived bovine embryos. *Theriogenology*, 39, 287.
- 19) Leibo, S.P. and Loskutoff, N.M. (1993): Cryobiology of *in vitro*-derived bovine embryos. *Theriogenology*, 39, 81-94.

## **Effect of Cryoprotectant Gradient Equilibration Method on In Vitro Survival Rate and Pregnancy Rate of Bovine IVF Blastocysts**

Yutaka Kajihara<sup>1</sup>, Atsurou Hira<sup>2</sup>, Ryouhei Nitta<sup>2</sup> and Yoshihiko Nakanishi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Agriculture, Kagoshima University, Kagoshima 890-0065 and <sup>2</sup>Technical Research Center, Marubeni Shiryō Co., Ltd., Ono, Hyogo 675-1355, Japan

The objective of this study was to examine the cryoprotectant gradient equilibration method for the survival rate and pregnancy rate. Day 7 to 9 embryos (fertilization=0) were randomly allocated and equilibrated in (A) a one step equilibration group directly plunged into 10% glycerol solution, (B) a three step equilibration group with 3.3%, 6.7% and 10% glycerol solution or (C) a gradient equilibration group as four different concentrations of glycerol solution were loaded in a small test tube: 10%, 6.7%, 3.3% and 0% from the bottom to the top. In Exp. 2, day 7 and 8 embryos were randomly allocated to (A) and (C) groups. After 20 min, the embryos from each group were transferred into 10% glycerol with 0.2 M sucrose solution, and then loaded into 0.25 ml plastic straws. The straws were frozen in an

alcohol bath type freezer. The straws were thawed in a 38°C water bath after 10 second air thawing. In Exp. 1, embryos were incubated with TCM199 and 5% calf serum for 48 h in a 38.8°C incubator. In Exp. 2, straws containing embryos were non-surgically and directly transferred into cow uterus. The *in vitro* survival rate of the gradient equilibration group was higher ( $P<0.05$ ) than that of the three step equilibration group. The survival rate of day 9 embryos was lower ( $P<0.01$ ) than day of 7 embryos. The pregnancy rates of the gradient equilibration group tended to be higher than those of the one step equilibration group.

**Key words:** Bovine, Embryo, Gradient, Cryopreservation, Direct transfer.