



Title	ウシの体外受精由来胚盤胞のガラス化保存に関する研究
Author(s)	桑山, 正成
Citation	北海道大学. 博士(獣医学) 乙第5167号
Issue Date	1997-03-25
DOI	10.11501/3122443
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/51438
Type	theses (doctoral)
File Information	000000307633.pdf



[Instructions for use](#)

ウシの体外受精由来胚盤胞の
ガラス化保存に関する研究

桑山 正成

ウシの体外受精由来胚盤胞の ガラス化保存に関する研究

桑山 正成

ウシの体外受精由来胚盤胞のガラス化保存に関する研究

目次

序文	2
第1章 グリセロールとプロピレングリコールを用いたウシの体外受精由来胚盤胞のガラス化保存	5
1. 溶液のガラス化および脱ガラス化の確認	
2. ガラス化溶液への曝露が胚の生存性におよぼす影響	
3. ガラス化保存後の胚の生存性の検討	
4. ガラス化処理した胚細胞のフリーズレプリカ法による観察	
5. ガラス化保存胚の正常な胎子および産子への発生能の検討	
第2章 エチレングリコールとショ糖を用いたウシの体外受精由来胚盤胞のガラス化保存	29
1. ガラス化液組成の検討	
2. 希釈液への卵黄添加がガラス化保存胚の生存性におよぼす影響	
3. ガラス化保存胚のストロー内希釈用カラムの検討	
4. ガラス化保存およびストロー内希釈を行った胚の正常な胎子および産子への発生能の検討	
総括	43
謝辞	45
引用文献	46
英文要旨	54

序 文

哺乳動物胚の凍結保存は、特定の系統や品種の遺伝資源の保存を可能とし、家畜の育種改良、増殖に欠かせない技術であるばかりでなく、絶滅の危機に瀕している動物園動物や野生動物種の維持にも必要とされている。また、ヒトの医療面においても不妊治療プログラムの基幹技術として、その重要性が指摘されている。

哺乳動物胚の凍結保存の研究は、Smith (1952, 1953)が、精子に対して凍害保護効果があるとされたグリセロール (Polge et al., 1949) を用いてウサギ胚を移植試験のために保存しようとした実験が始まるが、その後20年間、大きな研究の進展は見られなかった。しかし、Whittingham et al. (1972)とWilmot (1972)はそれぞれ独立して、グリセロールと分子構造が類似したジメチルスルフォキシドを凍害保護物質として用いて、緩慢凍結法によって凍結保存したマウス胚が融解後も高い生存性を示すことを報告した。この成功を契機に、哺乳動物胚の凍結保存に関する研究は急速に活発化し、以後、実験小動物の卵子や胚の凍結保存に応用された(ラット: 尾川, 1978; 尾川ら, 1973; 内海と湯原, 1974a, b; Whittingham, 1975; ウサギ: Bank & Maurer, 1974; Whittingham & Adams, 1976; Tsunoda & Sugie, 1977)。

家畜では、ヒツジ(Willadsen et al., 1974; Schwier et al., 1990)およびヤギ(Bilton & Moor, 1976a)の他、特にウシにおいては、Wilmot & Rowson (1973)による最初の成功例の報告以後、世界的な商業化を背景とした胚移植関連技術開発の進展と共に、優秀な遺伝形質を有するウシ由来の胚の保存や輸送のため、胚の凍結保存技術は胚移植の基幹技術の一つとして研究開発が活発に行われた(Bilton & Moor, 1976b; Willadsen et al., 1976; Leibo & Mazur, 1978; Trounson et al., 1978; Willadsen, 1980; Niemann et al., 1982; Renard et al., 1982; Leibo, 1983, 1984, 1986a, b, 1988; Renard & Heyman, 1983; Chupin et al., 1984; Massip & Van Der Zwalmen, 1984; Suzuki et al., 1990; Niemann, 1991)。その結果、現在では、胚の凍結保存技術は、研究面のみならず産業面においても広く用いられる重要な技術となった。このため、ウシ胚の凍結保存は実用技術として、さらに、高くかつ安定した凍結保存後の胚生存性が要求されるばかりでなく、処理コストあるいは利便性 (処理の時間や簡易さ) についても改良が求

められるようになった。しかし、緩慢凍結には高価な冷却装置が必要であること、処理に長時間を要すること、氷点以上の低温域に一定時間胚を曝すので低温感受性の高い胚や未成熟あるいは成熟卵子では利用できないこと、手法の改善には最適脱水条件の設定などに膨大な数の試行錯誤を繰り返す必要があり、多大な労力を要することなどの短所が問題となっている。

これに対し、Luyet (1937)により提唱されたガラス化保存法は、細胞内外の溶液を急速な冷却によりガラス化させて液体窒素温度で保存する方法で、高価な冷却装置を用いず、急速に胚を冷却するため、理想的な実用技術になると考えられたが、その成功例は長く得られなかった(Luyet, 1966; Rapatz et al., 1966; Fahy et al., 1984; Fahy, 1988)。しかし、高濃度の凍結保護物質を用いることにより、植物細胞 (Grout & Henshaw, 1978)や昆虫細胞 (James, 1980)においてのガラス化保存の成功に続き、Rall & Fahy (1985)はマウス8細胞期胚のガラス化保存に成功し、哺乳動物胚のガラス化保存の可能性を示した。この成功を機に、様々な動物の胚においてガラス化保存のアプローチが急速に活発化した。より単純な組成のガラス化液を用いてのマウス胚のガラス化保存の成功例がSheffen et al. (1986)によって報告されたのをはじめとして、実験小動物ではマウス(許ら, 1986; 河野と角田, 1987; 松本ら, 1987; Kasai et al., 1990)、ラット(Kono et al., 1988; Ischenko et al., 1992; Nakamichi et al., 1993)、ウサギ(Kobayashi et al., 1990; Smorag et al.; 1989, Smorag & Gadjia, 1991; Kasai et al., 1992; Papis et al., 1993)、また、家畜ではヒツジ(Schwier et al., 1990)、ブタ(Yoshino et al., 1993; Kobayashi et al., 1994; Dobrinsky & Johnson, 1994)において、ガラス化保存の成功例が報告された。

ウシにおいてはMassip et al. (1986)が、Sheffen et al. (1986)のマウスでの方法を応用して、生体から回収した後期桑実胚においてガラス化保存後の生存例を得た。しかし、一般に胚移植に用いられる胚盤胞では生存例は得られず、胚盤胞のガラス化保存の困難さが指摘された(Massip et al., 1986; 堂地ら, 1990; Van Der Zwalmen et al., 1989)。また近年、体外受精技術の開発にともなって、その利用価値が実験上のみならず産業面においても急増してきた

体外受精由来胚においては、いまだガラス化保存に関する研究報告はなく、その特性は未知である。さらに、ウシの体外受精胚の実用的な利用のためには、移植現場で凍結保存胚の融解、希釈が可能な方法の開発が必要である。緩慢凍結法ではすでに、凍結胚を融解後、無希釈で、あるいはストロー内で希釈後、受胎ウシに移植する直接移植法あるいは直接希釈法が用いられている (Leibo 1983; Renard & Heymann, 1983; Massip & Van Der Zwalm 1984; Voelkel & Hu, 1992a, b)。しかし、ガラス化保存したウシの体外受精由来胚での検討の報告はされていない。ガラス化保存では凍結溶液に高濃度の凍害保護物質を用いるため、融解後、希釈時の胚に対する影響を考えると、より細胞膜透過性の高い凍害保護物質によるガラス化保存が有効であると推測される。そこで本研究では、体外受精由来の胚を用い、胚盤胞のガラス化液への平衡条件およびガラス化保存過程における胚の細胞障害機構について知るため、まず、プロピレングリコールとグリセロールを用いたガラス化保存の検討を行った。次に、細胞膜透過性の優れたエチレングリコールを用いて、より実用的なウシの体外受精由来胚盤胞のガラス化保存法の開発を試みた。

第1章 グリセロールとプロピレングリコールを用いた

ウシの体外受精由来胚盤胞のガラス化保存

【緒言】

Rall & Fahy (1985)はマウス8細胞期胚を用い、哺乳動物胚ではじめてガラス化保存に成功した。その後、Sheffen et al. (1986)は組成の単純なガラス化液、すなわち、25%のグリセロールと25%のプロピレングリコールを添加したガラス化液を用い、ガラス化保存したマウス胚において培養後の高い発育率を報告した。Valdes et al. (1990)はグリセロールとプロピレングリコールでガラス化したマウス胚細胞を凍結電子顕微鏡を用いて観察し、細胞内外溶液中には氷晶が存在せず、完全にガラス化していることを確認した。そしてこの溶液の完全なガラス化が、マウス胚の保存後の高い生存性の理由の一つであると考察した。しかし、同様の組成のガラス化液を用い、同じ処理を行ったウシ胚盤胞では生存例は得られていない(Massip et al., 1986; 堂地ら, 1990)。Van Der Zwalm et al. (1989)はグリセロールとプロピレングリコールを添加したガラス化液を用い、胚のガラス化液への平衡を緩慢に行うことによってガラス化保存した胚盤胞の生存例を示したが、高い生存率は得られなかった。また、ウシの体外受精由来胚盤胞では、ガラス化保存について検討した報告はなく、その特性は未知である。そこで本章では、グリセロールとプロピレングリコールの混合溶液を用いたガラス化保存法をもとに、体外受精胚のガラス化液への平衡条件およびガラス化保存過程における胚の細胞障害機構について知ることを目的として以下の項目について検討を加えた。

1. 溶液のガラス化および脱ガラス化の確認
2. ガラス化溶液への曝露が胚の生存性におよぼす影響
3. ガラス化保存後の胚の生存性の検討
4. ガラス化処理した胚細胞のフリーズレプリカ法による観察
5. ガラス化保存胚の正常な胎子および産子への発生能の検討

【材料および方法】

1. ウシの体外受精由来胚盤胞の作出

胚盤胞の作出は、浜野と桑山(1992)に従って行った。

1) 卵胞卵子の体外成熟

屠殺された黒毛和種雌ウシの卵巣を研究室に輸送し、卵巣皮質中の小卵胞(直径2~5mm)より19G注射針を接続した5ml注射筒により未成熟卵子を吸引採取した。卵子は成熟培地(5%ウシ胎子血清:Fetal Bovine Serum, FBS添加TCM-199)で3回の洗浄後、同培地中で20~21時間、2% CO₂、98% air、38.5°C、湿度飽和の条件下で成熟培養を行った。成熟培地1ml中に100個の未成熟卵子を培養した。

2) 精子処理

37°Cのウォーターバス中で黒毛和種雄ウシの凍結精液を融解後、10 mMカフェイン(カフェインベンゾエイト, Sigma, USA)および10 μg/mlヘパリン(ノボヘパリン, 児玉製薬)を添加したBO(Brackett & Oliphant, 1975)液で希釈し、700 ×g、5分間の遠心分離を2回行うことにより、精子の洗浄および受精能獲得誘起を行って媒精に用いた。

3) 体外受精および体外培養

精子濃度は 1.0×10^7 cells/mlとし、成熟培養を終えた卵子を精子浮遊液中へ導入することによって媒精を行った。5時間の培養後、卵子を再び成熟培養で用いたディッシュの培地(5%FBS添加のTCM-199)へ戻し、卵丘細胞単層上で2%CO₂、98% air、38.5°C、湿度飽和の条件下で発生培養を行った。媒精7日後に、胚の発生段階を顕微鏡下で観察し、胚盤胞期胚へ発生した形態学的に正常な胚(Fig. 1)を実験に供した。

2. ガラス化保存の基本液

胚のガラス化保存およびガラス化保存後の胚から凍結保護物質を希釈、除去する際に用いる溶液を調製する基本液として、20%子ウシ血清(Calf Serum; CS)を添加した修正TCM-199(TCM-199 アール塩 + 5mM 炭酸水素ナトリウム + 20 mM Hepes)を用いた。

3. 胚の生存性の判定

ガラス化液への平衡、またはガラス化保存、融解後の胚は、直ちに1Mショ糖を添加した基本液中に浸漬した。ついで基本液で3回洗浄後、胚を10% CS添加修正TCM-199中の卵丘細胞単層上で2%CO₂、98% air、38.5°C、湿度飽和の条件下で24時間の体外培養を行った。培養後、実体および倒立顕微鏡下での形態学的観察により生存性の判定を行った。培養後、処理前のステージ以上に発育した胚を生存胚とした (Fig. 2)。

4. 推計学的分析方法

各実験における数値の推計処理は、 χ^2 検定 (Steel & Torrie, 1980) を用いて行った。

[実験1] 溶液のガラス化および脱ガラス化の確認

ガラス化液の凍害保護物質にはグリセロール (Sigma, USA)、プロピレングリコール (Sigma, USA) または両凍害保護物質の等量混合液を用いた。基本液に10~60%の各凍害保護物質を添加した溶液を0.25ml容量のプラスチックストロー (Crystal pipett, IMV, France) に詰め、ストローを直接液体窒素中へ投入することにより急速冷却した。5分間液体窒素中に保持後、ストローを15°Cの水中に浸けて振とうすることによって急速加温した。ストロー内溶液のガラス化および脱ガラス化の判定は、Sheffen et al. (1986)の方法に従った。すなわち、冷却時溶液内の氷晶形成により白濁したストローを非ガラス化、氷晶を形成せず透明状態を維持したストローをガラス化、また、冷却時にガラス化したストローのうち、加温時、氷晶形成して白濁したストローを脱ガラス化、透明状態を維持したストローを非脱ガラス化と判定した (Figs. 3, 4)。

[実験2] ガラス化液への曝露が胚の生存性におよぼす影響

1) 異なる組成のガラス化液への曝露が胚の生存性におよぼす影響

実験1の結果より、冷却時にガラス化し、かつ、加温時に脱ガラス化しない臨界濃度のグリセロール、プロピレングリコールまたは両凍害保護物質の等量混合液を基本液に添加した3種類のガラス化液をそれぞれ平衡実験に用いた。各溶液中で胚を10分間室温下で放

置後、凍害保護物質の希釈を行い、体外培養後、胚の生存性の判定を行った。最も高い胚生存性の得られた溶液を本実験でのガラス化液とした。

2) ガラス化液への胚の平衡方法の違いが胚の生存性におよぼす影響

実験2.1)の結果より、平衡後の胚の生存性が最も良好であったガラス化液、すなわち、22.5%グリセロール、22.5%プロピレングリコールを添加した基本液を本実験のガラス化液として用いた。

ガラス化液への胚の平衡は、以下の5種類の方法により、低濃度(1-step)から高濃度(16-step)への段階で行った(Table 1)。

(1) 1段階：直接ガラス化液に胚を投入し18分間浸漬した。(2) 2段階：2分の1濃度のガラス化液に8分間、次いでガラス化液に10分間浸漬した。(3) 4段階：最初の3つの液に各4分間、次いでガラス化液に6分間浸漬した。(4) 8段階：それぞれの液に各2分ずつ曝した後、ガラス化液に4分間浸漬した。(5) 16段階：それぞれの液に各1分間曝した後、ガラス化液に3分間浸漬した。それぞれの方法で平衡終了後、胚を培養して生存性を検査した。また、処理中、各方法で平衡した胚の収縮状態を実体および倒立顕微鏡下で観察した。

[実験3]ガラス化保存後の胚の生存性の検討

1) ガラス化液への胚の平衡方法の違いが胚の生存性におよぼす影響

胚のガラス化液への平衡は実験2.2)の方法に従って1、2、4、8および16段階で行った。各方法で平衡後、胚をそれぞれストロー中へガラス化液と共に吸引し、ポリシーラー(富士インパルス)により熱シール後、ストローを液体窒素中へ直接投入して急速冷却した。3~7日間液体窒素中で保存した胚は、ストローを15℃水中で8秒間振とうすることにより融解し、培養後、生存性を判定した。

2) 16段階法および2段階法の比較

(1) 16段階法：実験2.2)に従って、16段階の溶液に各1分間ずつ胚を曝露した後、ガラス化液に3分間浸漬した(Table 2)。

(2) 2段階法: Massip et al. (1986)の方法に従って、胚をまず平衡溶液(10%グリセロール、20%プロピレングリコール添加の基本液)中へ10分間胚を平衡後、ガラス化液へ胚を投入し30秒間曝露した。

それぞれの方法で平衡を終了後、液体窒素中へ投入して凍結保存し、融解後、胚の生存率を判定した(Table 2)。

[実験4]ガラス化処理した胚細胞のフリーズレプリカ法による観察

Fujikawa(1991)の方法に従って胚のフリーズフラクチャー・レプリカを作製し、それぞれの方法で処理した胚の細胞内外溶液のガラス化および原形質膜の微細構造変化を観察した。すなわち、16段階法または2段階法によりガラス化液への平衡を行った各20個の胚を、10 μ lのガラス化液と共にサンプルホルダー上面中央の直径1mmの浅い窪みに静置した。次いで、胚をのせたサンプルホルダーは液体窒素に直接投入して急速冷却した。凍結したサンプルは、 -107°C 、 1×10^{-6} 気圧に調整されたフリーズレプリカ装置(JFD-7000)に挿入し、切断、2分間のエッチング後、プラチナカーボンを切断面に蒸着させた。その後、市販のブリーチにより試料を溶解してレプリカを作製した。レプリカの観察および写真撮影は透過型電子(JEM-1200EX)顕微鏡を用いて、加速電圧100KVで行った。

[実験5]ガラス化保存胚の正常な胎子および産子への発生能の検討

実験3の結果より、最も生存率の高かった平衡方法を用いて胚をガラス化保存し、融解後、受胎ウシへそれぞれ1個ずつ胚移植を行って胎子および産子への発生能を検討した。すなわち、16段階法により平衡後ガラス化保存した胚を5~9日間液体窒素保存した後、融解し、形態学的観察により生存と判定された胚を、プラスチックストローへ基本液とともに詰め、発情周期を同期化させた受胎ウシ10頭に、非手術的に1個ずつ胚移植を行った。また、対照区として緩慢凍結法(桑山と浜野, 1991)で凍結、融解した体外受精胚を9頭の受胎ウシに移植した。すなわち、10%グリセロール添加の基本液に胚を投入し、室温下で10分間平衡後、同液とともにプラスチックストロー内へ吸引した。ストローは熱シール後、 -6°C に保持したプログラムフリーザー(Freezer, Programable, IWAKI)内アルコールバ

スに投入し、1分間保持する間に植氷を行い、同温度でさらに9分間保持した。その後、 -30°C まで $-0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の速度で緩慢に冷却した後、液体窒素中に投入して凍結保存した。5～9日間液体窒素中で保存した後、胚は融解した。ストローを室温下の空气中で10秒間保持した後、 35°C の水中で10秒間振とうすることにより融解後、胚のカラムとストロー内の希釈液（ 0.25M ショ糖添加の基本液）のカラムとをストロー内で混合させ、凍害保護物質の希釈、除去を行った後、移植に供した。

受胎ウシの妊娠診断は、移植後60日以降に超音波診断装置 (SSD210DX, Aloka) に動物用 5MHz の探触子を接続して超音波診断法により行った。また、産子の観察は分娩時またはその直後に行った。

【結果】

実験1. 溶液のガラス化および脱ガラス化の確認

冷却時にガラス化した各溶液の臨界濃度および加温時に脱ガラス化しなかった臨界濃度をTable 3に示した。すなわち、冷却時にガラス化し、かつ、加温時に脱ガラス化しないグリセロール、プロピレングリコールおよび両凍害保護物質の等量混合液の最低添加濃度は、それぞれ50、40および45%であった。

実験2. ガラス化液への曝露が胚の生存性におよぼす影響

1) 異なる組成のガラス化液への曝露が胚の生存性におよぼす影響

実験1で選定された各ガラス化液、すなわちグリセロール50%、プロピレングリコール40%および両凍害保護物質の等量混合液45%（グリセロール22.5% + プロピレングリコール22.5%）を含む基本液に胚を10分間曝露した後の生存率はそれぞれ41、15および57%であった(Table 4)。この結果より、平衡処理後の生存率が最も高かったグリセロールとプロピレングリコールの等量混合液45%を含むガラス化液、すなわち22.5%グリセロールおよび22.5%プロピレングリコール添加の基本液を以下の実験でのガラス化液と決定した。

2) ガラス化液への胚の平衡方法の違いが胚の生存性におよぼす影響

実験 2.1) で決定されたガラス化液へ各段階でそれぞれ平衡を行った胚の、希釈後の生存性は、Table 5 に示したように4段階以上の区において有意に高い値が得られた($P < 0.01$)。また、平衡時の胚の収縮を光学顕微鏡で観察した結果、1 および 2 段階でガラス化液への平衡を行った胚では、透明帯の著しい変形や胞胚腔の完全な消失が認められた。また、4 および 8 段階では軽度の透明帯の変形と強度の胚の収縮が観察された。一方、16段階で平衡した胚では胞胚腔の縮小は観察されたが、透明帯の変形は認められなかった(Fig. 5)。

実験 3. ガラス化保存後の胚の生存性の検討

1) ガラス化液への胚の平衡方法の違いが胚の生存性におよぼす影響

各段階でそれぞれ胚を平衡後、ガラス化保存した胚の融解後の生存性は、Table 6 に示したように 4 段階以上において有意に高い生存率が得られた($P < 0.05$)。

2) 16段階法および2段階法の比較

16段階法で処理した胚のガラス化保存後の生存率は83% (25/30)であった。一方、2段階法で処理後ガラス化保存した胚では、融解後の生存例は得られず (0/30)、両区間の生存率に有意差が認められた($P < 0.01$)。また、平衡時の胚の収縮を光学顕微鏡で観察した結果、16段階法で処理した胚では透明帯の変形は観察されず、胚の収縮も軽度であった。しかしながら、2段階法で処理した胚では、透明帯の変形や著しい収縮が観察された (Fig. 6)

実験 4. ガラス化処理した胚細胞のフリーズレプリカ法による観察

16段階法により処理した胚細胞の内外には氷晶の発生は認められず、溶液は完全にガラス化していることが確認された (Fig. 8 a)。また、原形質膜の微細構造に大きな変化は認められなかったが、原形質膜全体に軽度ながら膜内粒子(Intramembrane particle: IMP)の凝集を生じた細胞も多くみられた (Fig. 8 d)。一方、2段階法で処理した胚細胞内外も、同様にガラス化していることが確認された (Fig. 9 a)が、胚細胞は激しい脱水・収縮の形跡を示し、原形質膜と細胞内器官の膜が部分的に著しく接近して膜内粒子の凝集、あるいは膜内粒子の著しく減少した部位 (aparticular domain: Fig. 9 e) が観察された。

実験5. ガラス化保存胚の正常な胎子および産子への発生能の検討

ガラス化保存胚10個を10頭の受胎ウシに移植したところ、6頭の受胎（受胎率60%）が確認された。このうち5頭から正常な新生子が誕生した（Fig. 7, 産子率50%）。また、対照区の緩慢凍結法では、10頭中5頭の受胎ウシが受胎（受胎率56%）し、全頭が正常子ウシを分娩した（産子率56%）。実験区と対照区の受胎率および産子率に有意差は認められなかった。

1	45	22.5	11.3	5.7	2.9
2	45	22.5	11.4	5.7	2.9
3	45	22.5	11.3	5.7	2.9
4	45	22.5	11.3	5.7	2.9
5	45	22.5	11.3	5.7	2.9
6	45	22.5	11.3	5.7	2.9
7	45	22.5	11.3	5.7	2.9
8	45	22.5	11.3	5.7	2.9
9	45	22.5	11.3	5.7	2.9
10	45	22.5	11.3	5.7	2.9
11	45	22.5	11.3	5.7	2.9
12	45	22.5	11.3	5.7	2.9
13	45	22.5	11.3	5.7	2.9
14	45	22.5	11.3	5.7	2.9
15	45	22.5	11.3	5.7	2.9
16	45	22.5	11.3	5.7	2.9
17	45	22.5	11.3	5.7	2.9
18	45	22.5	11.3	5.7	2.9
19	45	22.5	11.3	5.7	2.9
20	45	22.5	11.3	5.7	2.9
21	45	22.5	11.3	5.7	2.9
22	45	22.5	11.3	5.7	2.9
23	45	22.5	11.3	5.7	2.9
24	45	22.5	11.3	5.7	2.9
25	45	22.5	11.3	5.7	2.9
26	45	22.5	11.3	5.7	2.9
27	45	22.5	11.3	5.7	2.9
28	45	22.5	11.3	5.7	2.9
29	45	22.5	11.3	5.7	2.9
30	45	22.5	11.3	5.7	2.9
31	45	22.5	11.3	5.7	2.9
32	45	22.5	11.3	5.7	2.9
33	45	22.5	11.3	5.7	2.9
34	45	22.5	11.3	5.7	2.9
35	45	22.5	11.3	5.7	2.9
36	45	22.5	11.3	5.7	2.9
37	45	22.5	11.3	5.7	2.9
38	45	22.5	11.3	5.7	2.9
39	45	22.5	11.3	5.7	2.9
40	45	22.5	11.3	5.7	2.9
41	45	22.5	11.3	5.7	2.9
42	45	22.5	11.3	5.7	2.9
43	45	22.5	11.3	5.7	2.9
44	45	22.5	11.3	5.7	2.9
45	45	22.5	11.3	5.7	2.9
46	45	22.5	11.3	5.7	2.9
47	45	22.5	11.3	5.7	2.9
48	45	22.5	11.3	5.7	2.9
49	45	22.5	11.3	5.7	2.9
50	45	22.5	11.3	5.7	2.9

Table 1. Exposure time and concentrations of cryoprotectants in each method

Time of transfer (min)	Concentration of cryoprotectants (% , V/V)				
	1-step	2-step	4-step	8-step	16-step
0	45	22.5	11.3	5.7	2.9
1	45	22.5	11.3	5.7	5.7
2	45	22.5	11.3	11.3	8.5
3	45	22.5	11.3	11.3	11.3
4	45	22.5	22.5	16.9	14.1
5	45	22.5	22.5	16.9	16.9
6	45	22.5	22.5	22.5	19.7
7	45	22.5	22.5	22.5	22.5
8	45	45	33.8	28.2	25.4
9	45	45	33.8	28.2	28.2
10	45	45	33.8	33.8	31
11	45	45	33.8	33.8	33.8
12	45	45	45	39.4	36.6
13	45	45	45	39.4	39.4
14	45	45	45	45	42.2
15	45	45	45	45	45
16	45	45	45	45	45

Cryoprotectants; glycerol : propylene glycol = 1: 1.

Table 2. Exposure time and concentrations of cryoprotectants in each step

Time (min)	Concentration of cryoprotectants (% V/V)		
	2-step ^a	16-step ^b (% of VS)	
1	10% Glycerol + 20% propylene glycol	2.9	
2		5.7	
3		8.5	
4		11.3	
5		14.1	
6		16.9	
7		19.7	
8		22.5	
9		25.4	
10		28.2	
11		VS ^c 30 s	31
12		33.8	
13		36.6	
14		39.4	
15		42.2	
16		45	
17		45	
18		45	

^aBlastocysts were equilibrated by the method of Massip et al. (1986); the 2-step method.

^bBlastocysts were equilibrated by the 16-step method (Kuwayama et al., 1992a).

^cVS=22.5% glycerol + 22.5% propylene glycol.

Table 3. Visual aspects on vitrification solutions in straws after cooling in liquid nitrogen (LN₂) or during warming in water bath

Conc. (v/v)	Propylene glycol		Glycerol		Propylene glycol + glycerol	
	cooling	warming	cooling	warming	cooling	warming
10%	M	M	M	M	M	M
20%	M	M	M	M	M	M
25%	I	M	M	M	M	M
30%	T	M ^a	I	M	I	M
35%	T	M	T	M	T	M
40%	T	T ^b	T	M	T	M
45%	T	T	T	M	T	T
50%	T	T	T	T	T	T
60%	T	T	T	T	T	T

T=Transparent=Vitrified.

M=Milky=Not Vitrified.

I=Intermediate=Not Vitrified.

^a Dotted line (.....) shows critical concentrations of cryoprotectants which allow for vitrification during cooling.

^b Solid line (____) shows critical concentrations of cryoprotectants which allow for vitrification during warming.

Table 4. *In vitro* survival of bovine blastocysts after exposure to vitrification solutions for 10 min^a

Conc. (%) of cryoprotectants		No. of trials	Total no. of blastocysts examined	No. (%) of blastocysts survived
Glycerol	Propylene glycol			
50	0	3	29	12(41) ^b
0	40	3	27	4(15) ^c
22.5	22.5	3	28	16(57) ^b

^aAfter removal of cryoprotectants, blastocysts were cultured for 24h.

^{b, c}Values with different superscripts are significantly different (P<0.05).

Table 5. *In vitro* survival of bovine blastocysts equilibrated in vitrification solution by different procedures^a

Equilibration procedures	No. of trials	Total no. of blastocysts examined	No. (%) of blastocysts survived
1-step	3	50	28(56) ^b
2-step	3	65	58(89) ^c
4-step	3	50	50(100) ^d
8-step	3	50	50(100) ^d
16-step	3	61	61(100) ^d

^aAfter equilibration and removal of cryoprotectants, blastocysts were cultured for 24h.

^{b, c, d}Values with different superscripts are significantly different (P<0.05).

Table 6. *In vitro* survival of vitrified-warmed bovine blastocysts treated with different procedures^a

Equilibration procedure	No. of trials	Total no. of blastocysts examined	No. (%) of blastocysts survived
1-step	3	40	0(0) ^b
2-step	3	40	5(13) ^c
4-step	3	38	30(79) ^d
8-step	3	38	31(82) ^d
16-step	3	38	33(87) ^d

^aAfter vitrification and removal of cryoprotectants, blastocysts were cultured for 24h.

^{b, c, d}Values with different superscripts are significantly different (P<0.05).

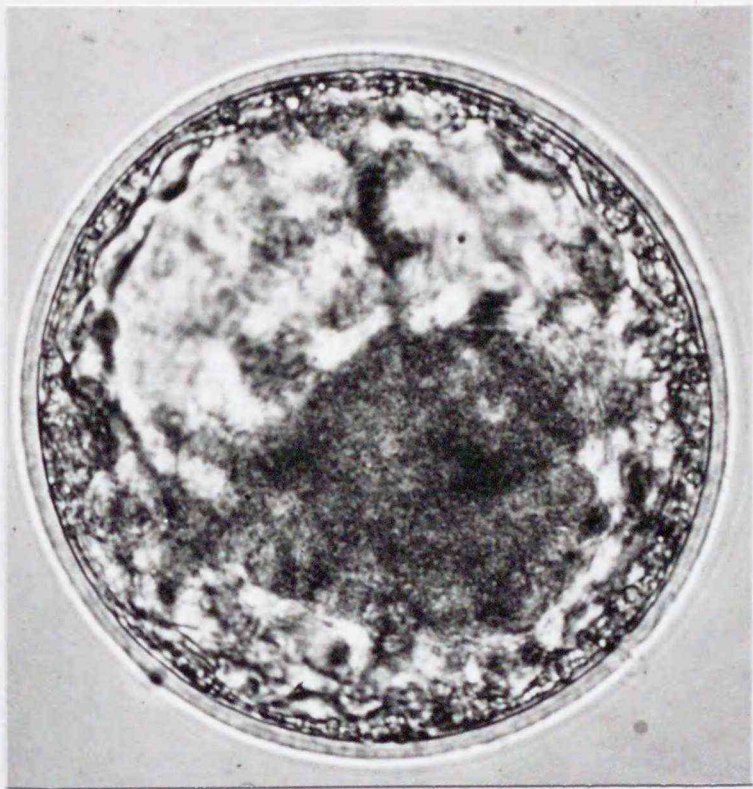


Fig. 1. A blastocyst derived from *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization and *in vitro* culture.

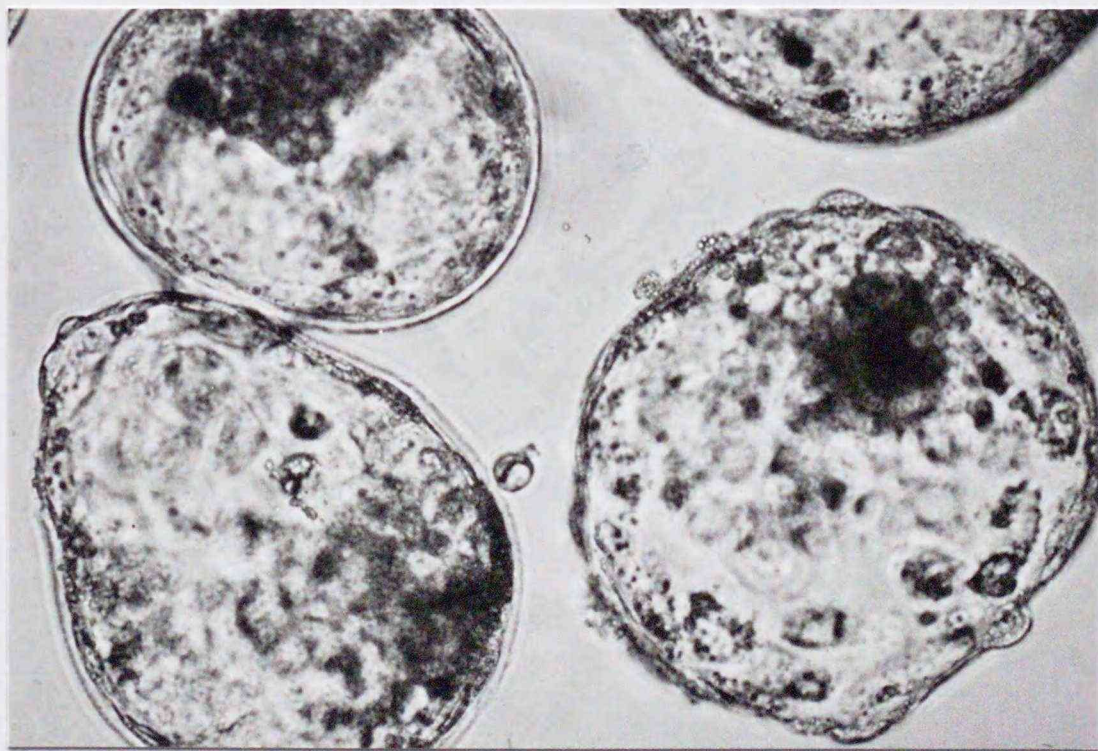


Fig. 2. Surviving blastocysts vitrified-warmed and cultured for 24 h.

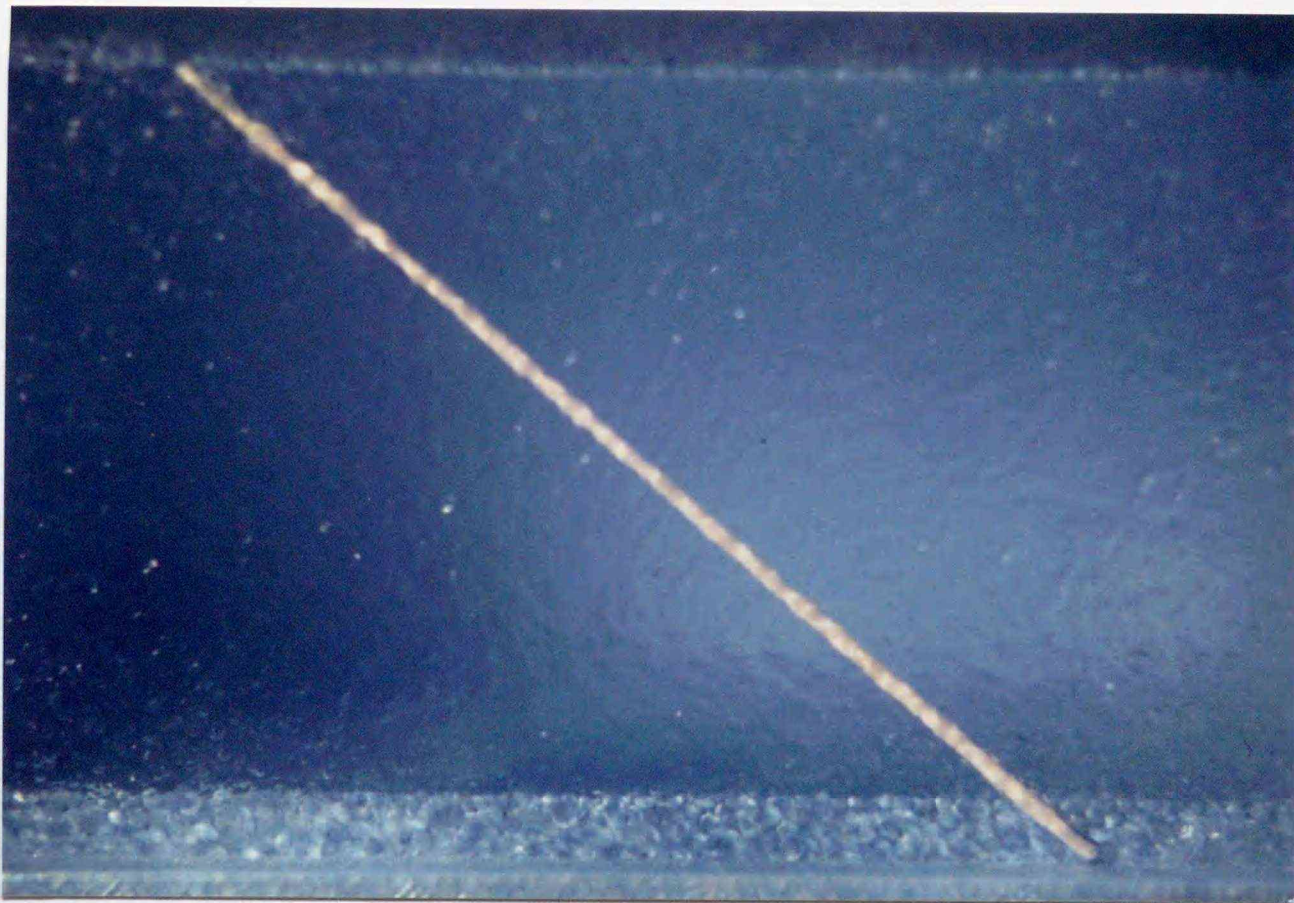
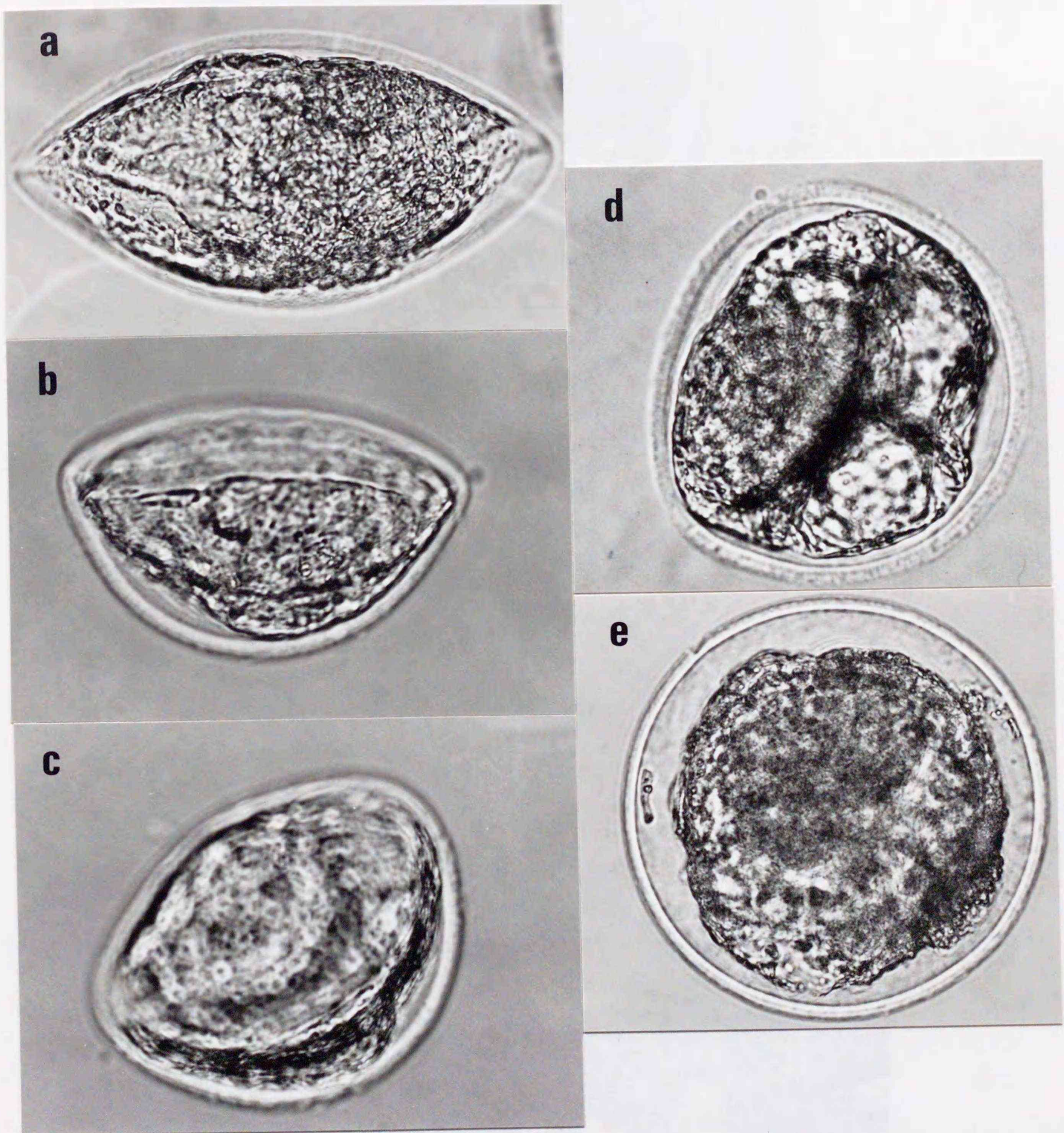


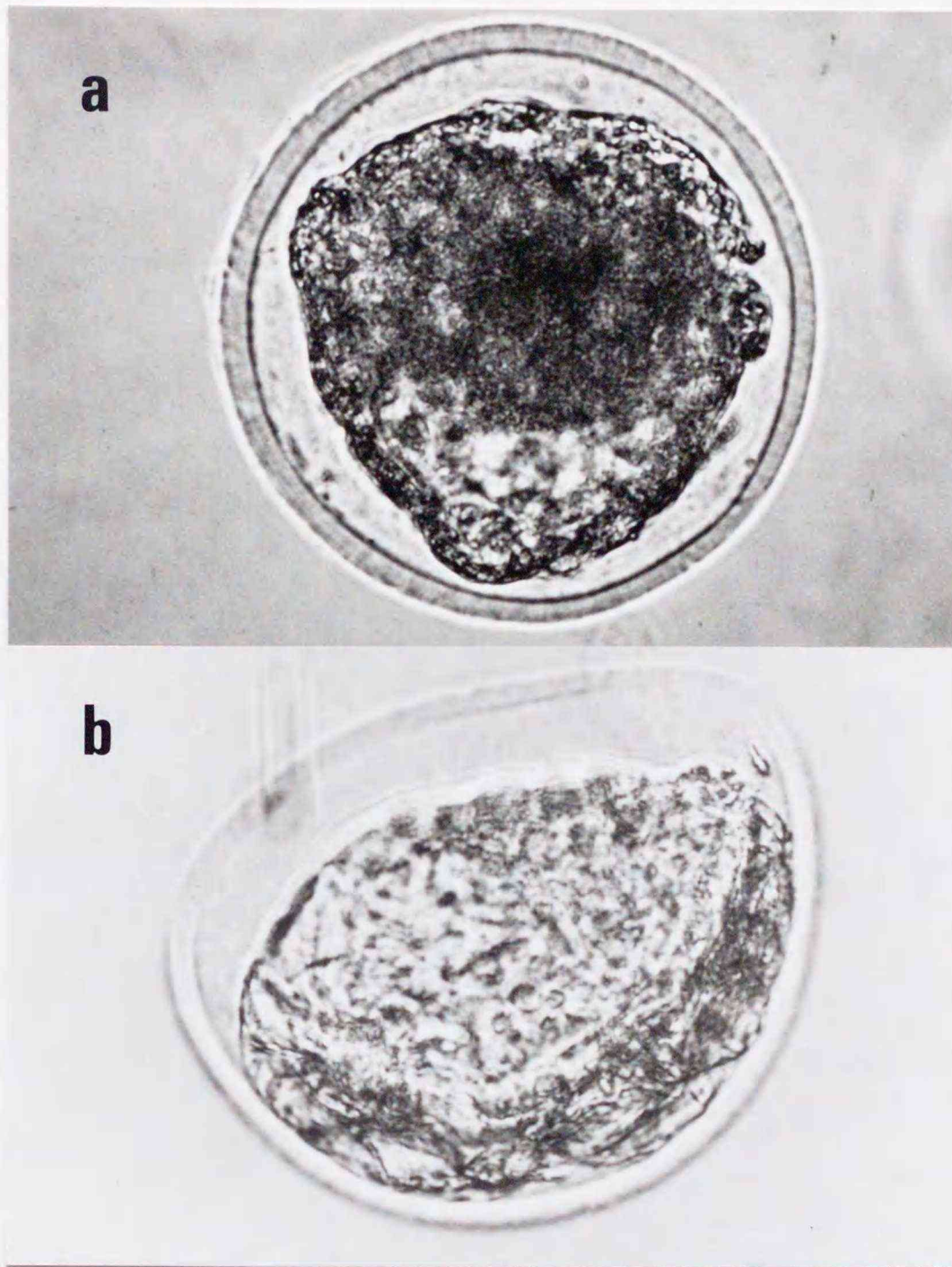
Fig. 3. A straw showing milky aspect (ice formed).



Fig. 4. A straw showing transparent aspect (vitrified).



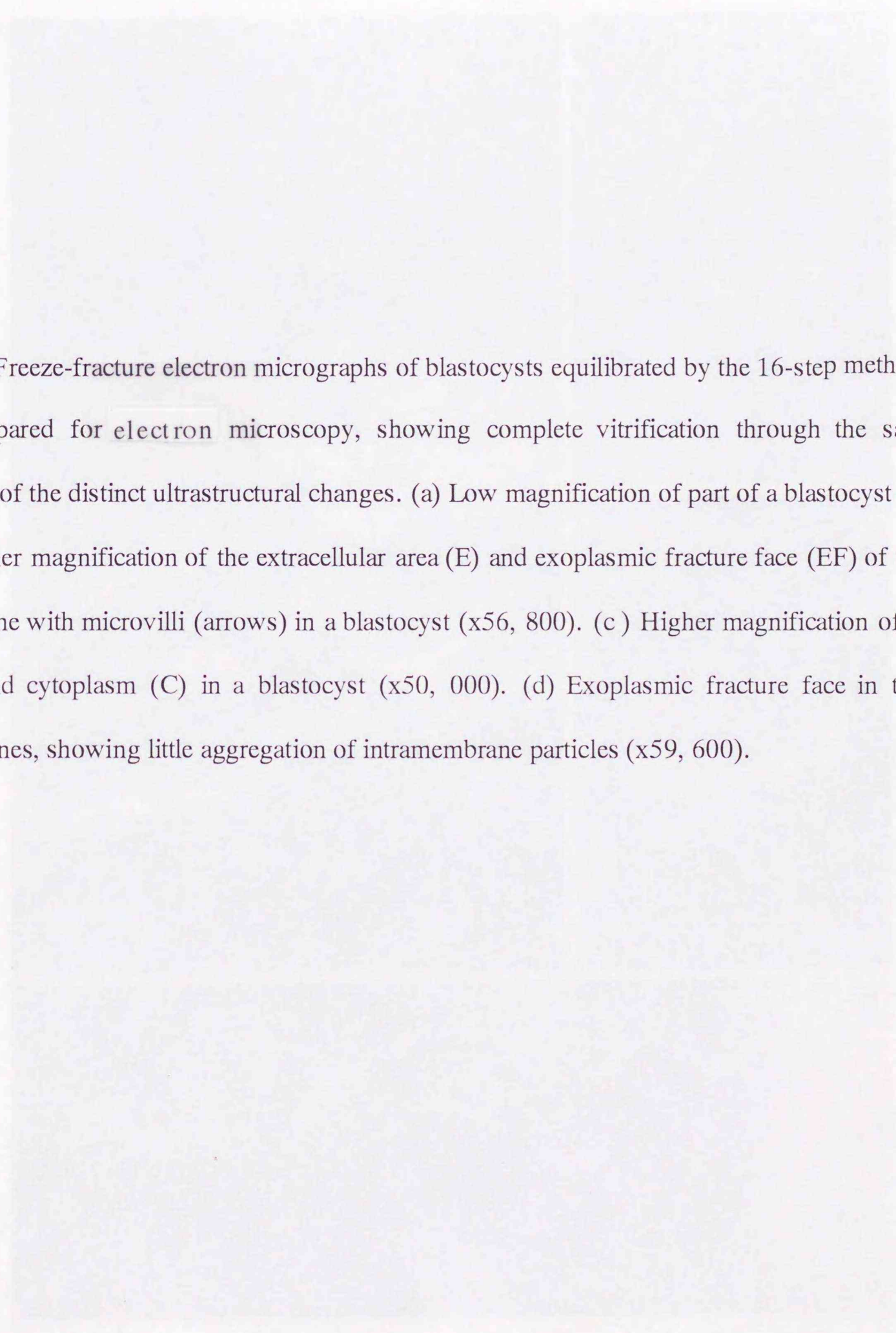
Figs. 5. Blastocysts equilibrated by 1-step (a), 2-step (b), 4-step (c), 8-step (d) and 16-step (e).



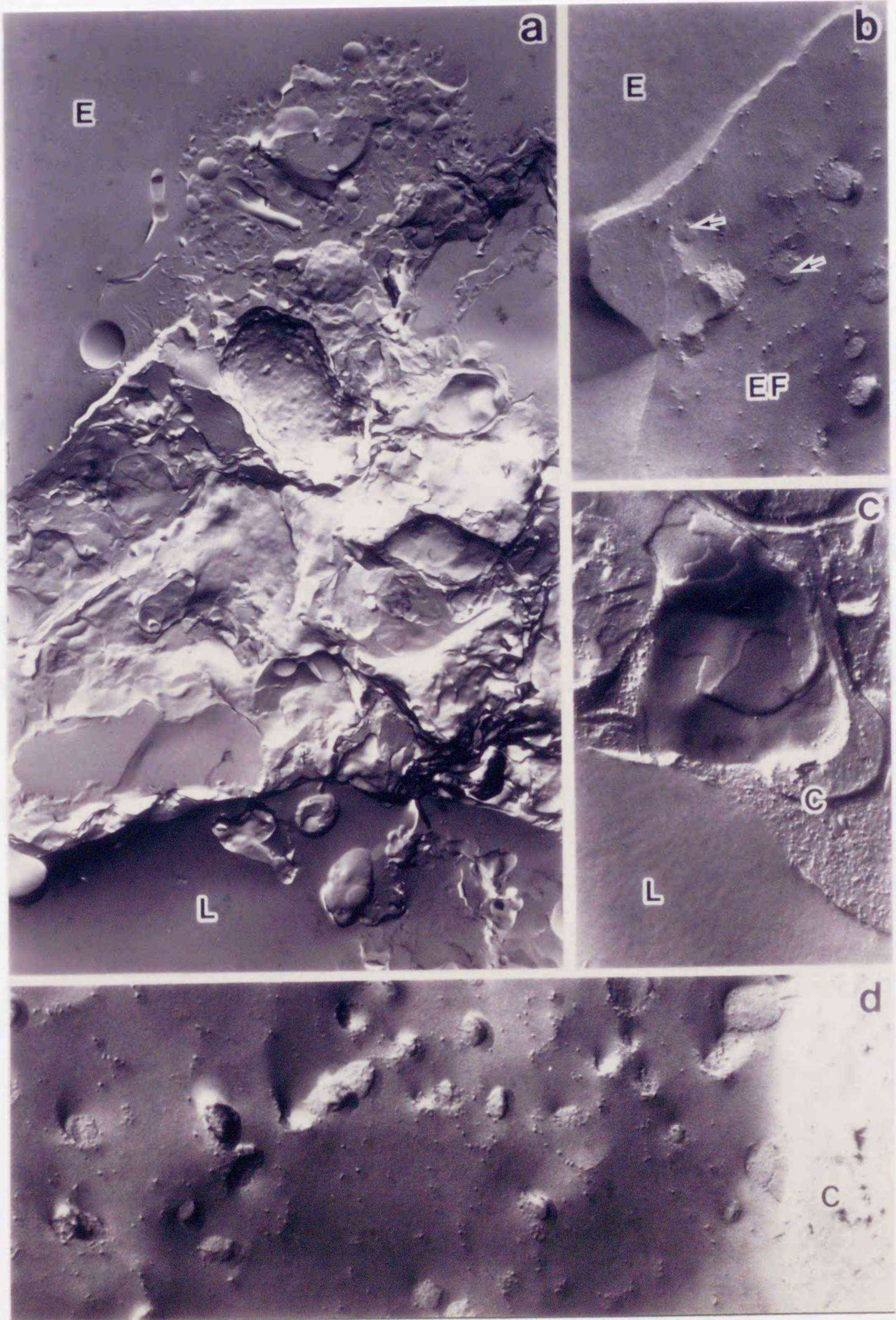
Figs. 6. Blastocysts equilibrated in vitrification solution by the 16-step method (a) and the 2-step method (b).

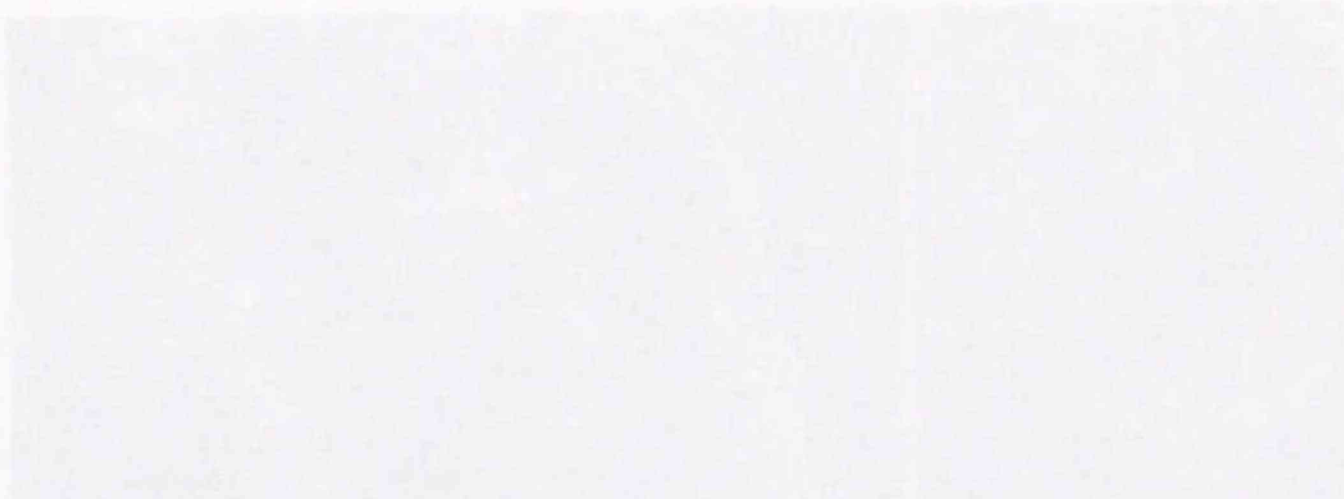


Fig. 7. A newborn calf obtained after the transfer of a vitrified-warmed blastocyst derived from *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization and *in vitro* culture.

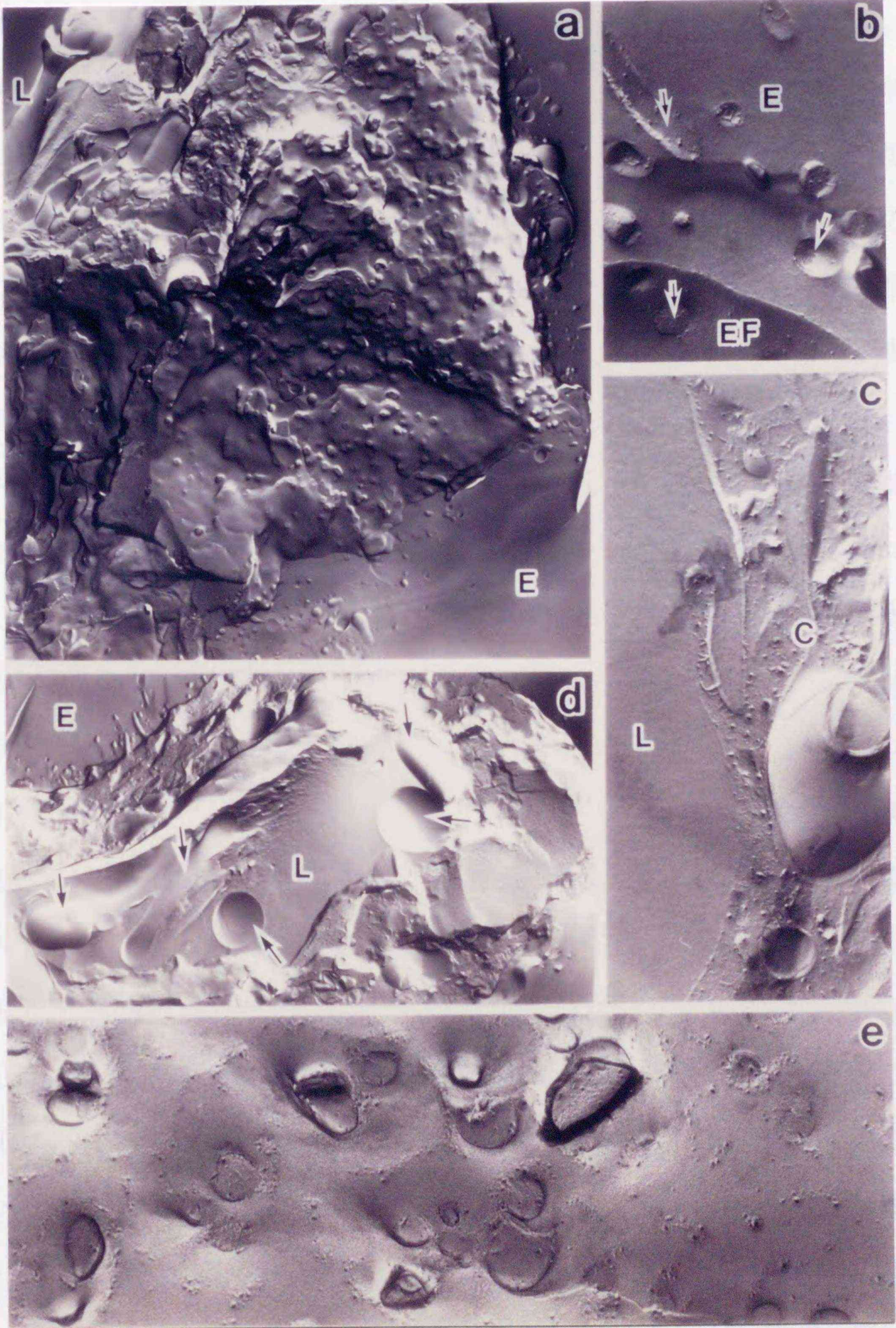


Figs. 8. Freeze-fracture electron micrographs of blastocysts equilibrated by the 16-step method, cooled and prepared for electron microscopy, showing complete vitrification through the sample and absence of the distinct ultrastructural changes. (a) Low magnification of part of a blastocyst (x4, 500). (b) Higher magnification of the extracellular area (E) and exoplasmic fracture face (EF) of the plasma membrane with microvilli (arrows) in a blastocyst (x56, 800). (c) Higher magnification of the cavity (L), and cytoplasm (C) in a blastocyst (x50, 000). (d) Exoplasmic fracture face in the plasma membranes, showing little aggregation of intramembrane particles (x59, 600).





Figs. 9. Freeze-fracture electron micrographs of blastocysts equilibrated by the 2-step method, cooled and prepared for electron microscopy, showing complete vitrification through the sample and occurrence of ultrastructural changes. (a) Low magnification of part of a shrunken blastocyst (x8, 800). (b) Higher magnification of the extracellular area (E) and exoplasmic fracture face (EF) of the plasma membrane with microvilli (arrows) in a blastocyst (x56, 800). (c) Higher magnification of the cavity (L), and cytoplasm (C) in a blastocyst (x50, 000). (d) Part of a shrunken blastocyst, showing formation of vesicles (arrows) in a cavity (L) due to equilibration (x8, 000). (e) Exoplasmic fracture face in the plasma membranes, showing a particular domain (x64, 000).



【考察】

凍結時、細胞内のみをガラス化する従来の緩慢凍結法と違い、胚のガラス化保存法では、細胞内外溶液をともにガラス化させるため、凍結溶液に凍害保護物質を高濃度に添加する必要がある。従って、一連のガラス化保存過程において添加された凍害保護物質が胚の生存性に及ぼす物理的、化学的影響が顕著になるため、凍害保護物質の選定は重要である。Rall & Fahy (1985) は、代表的な凍害保護物質であるジメチルスルフォキシドの細胞毒性を緩和するためにアセトアミドを添加したガラス化液を用い、さらに、平衡温度を低くして溶液の毒性を軽減させることにより、はじめてマウス胚のガラス化保存に成功した。Halasz & Collins (1984) は、グリセロールとプロピレングリコールを混合すると、それぞれを単独で用いた場合に比べて、細胞に対する毒性が軽減することをウサギの腎臓細胞を用いた試験により証明した。Sheffen et al. (1986) は、この効果を応用して、グリセロールとプロピレングリコールを混合添加した低毒性のガラス化液を考案し、マウス胚において、ガラス化保存、融解後の高い胚生存性を報告した。しかし、Massip et al. (1986) は Sheffen et al. (1986) の開発したガラス化液、すなわち、25%グリセロールと25%のプロピレングリコールの混合添加液を用いてガラス化保存を行った場合、ウシの生体から回収した体内受精由来胚盤胞では生存例が得られなかったと報告している。これらの報告と類似したガラス化液を用いたにもかかわらず、本実験では胚盤胞のガラス化保存後の高い生存性が認められた。この結果の違いは、胚の平衡条件の違いによることは明らかである。ガラス化保存過程における胚細胞への致死的な障害の一つとして、胚をガラス化液へ平衡する際の浸透圧障害が指摘されている (Steponkus et al., 1991)。一般に、ウシ胚の培養液の浸透圧は280~310mOsmolであるのに対し、本実験で用いたガラス化液は8200~8300mOsmolと極めて浸透圧が高いため、両液間の著しい浸透圧差により、平衡時に急激な胚細胞の脱水と極度の収縮が生じる可能性が推測された。事実、胚をガラス化液に1または2段階で平衡した場合、顕著な透明帯の変形や胚の著しい収縮が光学顕微鏡下で観察され、ガラス化保存胚の生存率もきわめて低かった。対照的に、4、8または16段階で緩慢に平衡を行った場合、胚の収

縮は緩和され、ガラス化保存後に高い生存率が得られた。特に、16段階区においては平衡時に透明帯の変形は観察されず、胚の収縮も軽度であり、ガラス化保存後の生存率は87%と高率であった。これらの結果から、胚のガラス化液への平衡の段階を増すことにより、細胞の急激な脱水により発生する致命的な浸透圧障害を緩和できることが示唆された。

2段階法ではガラス化液投入前に10分間の予備平衡を行うことによって、グリセロールとプロピレングリコールが細胞内へ浸透する。次いで、胚のガラス化液への投入によって、細胞外溶液のガラス化液への置換および予備平衡で細胞内に浸透した凍害保護物質の細胞内濃縮が行われる。一方、16段階法では、胚は低濃度から高濃度へと徐々にガラス化液へ平衡されるにつれ、細胞内凍害保護物質濃度は上昇し、最終ステップで細胞外溶液をガラス化液に置換してから液体窒素冷却する。これらのことから、2段階法、16段階法のいずれの方法で処理したウシの体外受精由来胚盤胞においても細胞内外のガラス化が予測された。電子顕微鏡観察の結果、2段階および16段階法で処理した胚のフリーズレプリカは双方とも細胞内外の完全なガラス化を示していた。この結果から、2段階法による胚の致命的傷害の原因が細胞内凍結、すなわち、冷却時における細胞内氷晶形成による細胞の機械的破壊ではないことが明らかとなった。

また、2および16段階法で処理した胚の原形質膜の微細構造には、顕著な差が認められた。2段階法で処理した胚細胞の原形質膜に観察されたaparticular domain (Fig. 9e) は、ガラス化液への投入による急激な脱水によって致命的な傷害を受けた細胞の原形質膜に観察された所見（藤川とSteponks, 1991）と酷似していた。この結果は、2段階法で処理した胚盤胞は、ガラス化液への平衡時に急激な脱水によって重大な傷害を受けていた可能性を示唆している。対照的に、16段階法で処理した胚盤胞の原形質膜ではこの様な顕著な微細構造の変化は観察されず、同法で処理した場合、平衡時における胚細胞への物理的な影響は少ないと考えられた。

以上のことから、グリセロールとプロピレングリコールを用いたウシの体外受精由来胚盤胞のガラス化保存法においては、ガラス化液への平衡を緩慢にすることによって平衡時

【小括】

ウシの体外受精由来胚盤胞のガラス化液への平衡条件およびガラス化保存過程における胚の細胞障害機構について知ることを目的として、グリセロールとプロピレングリコールを添加したガラス化液を用いて実験を行った。まず、ガラス化液に必要な凍害保護物質の最低濃度を検討した結果、グリセロール22.5%および22.5%であった。次に、この最低有効濃度の凍害保護物質を添加したガラス化液に1、2、4、8および16段階で胚を平衡し、ガラス化液への平衡条件が胚の生存率に及ぼす影響を調べた。各区の生存率はそれぞれ56、89、100、100および100%だった。また、平衡後ガラス化保存した胚の生存率はそれぞれ0、10、79、82および87%で、4段階以上の区で有意に高い値が得られた。次に2段階法（10%グリセロール、20%プロピレングリコール液中へ10分間胚を平衡後、ガラス化液へ胚を投入）および16段階法で処理した胚のガラス化保存後の生存性の検査および微細構造変化のフリーズレプリカ法による観察を行った。16段階法では高い(83%)生存率が得られたが、2段階法区では生存胚は得られなかった。しかし、両区とも細胞内外には氷晶の形成は観察されず、溶液の完全なガラス化が確認された。16段階法区では原形質膜の微細構造に大きな変化は見られなかったが、2段階法区の胚では原形質膜と細胞内器官が著しく接近して膜内粒子の凝集、あるいは膜内粒子が著しく減少した部位の発生が顕著に観察された。さらに、ガラス化保存胚を10頭の受胎ウシに移植した結果、6頭が受胎、5頭の正常な子ウシが得られ、ガラス化保存胚の正常な胎子および産子への発育能が確認された。

以上のことから、グリセロールとプロピレングリコールを用いたガラス化法において、ガラス化液への胚盤胞の平衡を緩慢にすることによって、平衡時の胚の脱水による障害を緩和し、高い生存性の得られることが明らか^らとなった。

第2章 エチレングリコールとショ糖を用いたウシの

体外受精由来胚盤胞のガラス化保存

【緒言】

第1章での実験結果から、16段階法によってガラス化液への胚の平衡を緩慢にすることにより、グリセロールとプロピレングリコールを添加したガラス化液を用いて、ウシの体外受精由来胚盤胞においてガラス化保存後に高い生存率の得られることが明らかとなった (Kuwayama et al., 1992a, 1994)。しかし、16段階法による平衡は手法として煩雑であり、ウシ胚のガラス化保存技術の実用化においては、より簡易な方法の開発が望まれる。さらに、野外での本技術の実用化のためには、緩慢凍結法で用いられている直接希釈法 (Leibo 1983, 1984; Renard & Heymann, 1983) や直接移植法 (Massip & Van Der Zwalmen 1984; Voelkel & Hu, 1992a, b) といった、融解後、凍害保護物質の希釈処理を簡易化あるいは省略できる手法の開発が必要である。

これまでの実験結果より、ガラス化保存処理過程における胚の致死的な傷害は、浸透圧の極めて高いガラス化液へ胚を平衡した場合の、急激な脱水による胚細胞の極度の収縮に起因すると推測された。この収縮は、平衡時の浸透圧差により細胞外へ排出される水と、細胞内へ浸透するガラス化液中の凍害保護物質との細胞膜透過性の差により引き起こされるので、平衡時の収縮を軽減する方法として、より細胞膜透過性の優れた凍害保護物質をガラス化液に用いることがまず考えられる。Miyamoto & Ishibashi (1977, 1978) は、グリセロールに比べて分子量が小さく、細胞膜透過性の高いエチレングリコールを用い、マウス胚の凍結保存に成功し、凍害保護物質としてのエチレングリコールの哺乳動物胚への有効性を示した。また、Voelkel & Hu (1992a, b) はエチレングリコールの優れた細胞膜透過性を利用して、ウシ胚を緩慢凍結、融解後、凍害保護物質の希釈、除去処理を行わないで直接受胎ウシに移植する、いわゆる直接移植法を考案し、高い受胎率を得た。この結果は、ウシ胚細胞膜に対するエチレングリコールの透過性の高さを示唆するものである。

また、胚のガラス化液への平衡時、急激な脱水による胚細胞の収縮を緩和する他の方法として、ガラス化液へ添加する凍害保護物質濃度を低下させることが考えられる。最近、Riha & Landa (1989)およびOstashko et al. (1992)は、凍害保護物質の濃度がこれまでの報告(50%)に比べて大幅に低い溶液、すなわち、30%グリセロールと1 Mショ糖を添加した凍結溶液を用いて、生体から採取したウシ桑実胚を凍結保存した結果、高い生存性の得られることを報告した。これらの方法は凍害保護物質濃度が低いだけでなく、胚の平衡方法も簡易であるため、実用上の大きな利点がある。

本章では、簡易なウシの体外受精由来胚盤胞のガラス化保存法および直接移植(希釈)法の開発を目的として、以下のようにエチレングリコールとショ糖を用いたガラス化保存法の検討を行った。

1. ガラス化液組成の検討
2. 希釈液への卵黄添加がガラス化保存胚の生存性におよぼす影響
3. ガラス化保存胚のストロー内希釈用カラムの検討
4. ガラス化保存およびストロー内希釈を行った胚の正常な胎子および産子への発生能の検討

【材料および方法】

1. ウシの体外受精由来胚盤胞の作出

ウシ体外受精由来胚盤胞の作出は第1章の方法に従って行った。すなわち、屠殺した黒毛和種雌ウシの卵胞内卵子を体外成熟後、受精能獲得誘起処理を行った黒毛和種雄ウシの凍結融解精子で体外受精を行い、7日間の体外培養により胚盤胞を作出した。

2. 胚の生存性の判定方法

ガラス化液へ平衡またはガラス化保存胚の生存性の判定は第1章の方法に従って行った。すなわち、ガラス化液への平衡、またはガラス化保存、融解後の胚は、凍害保護物質の希釈、洗浄後、24時間の体外培養を行い、形態学的観察により生存性の判定を行った (Fig.

10)。

3. 推計学的分析方法

本実験における推計学的分析は χ^2 検定 (Steel & Torrie, 1980) を用いて行った。

[実験1] ガラス化液組成の検討

1) 異なる組成のガラス化液への曝露が胚の生存性におよぼす影響

凍結基本液として20%CSを添加した修正リン酸緩衝液(mPBS)を用いた。平衡溶液は10%グリセロールを添加した基本液を用いた。胚を選別後、平衡液で5~10分間の平衡を行ったのちガラス化液へ投入した。ガラス化液は30%グリセロールと1Mショ糖を添加した基本液、またはグリセロールのかわりにエチレングリコールを添加した溶液を用いた。マウスピースコントロールのパスツールピペットにより胚をディッシュ内のガラス化液中で素早く移動させ、胚とともに導入した平衡液をガラス化液に置換した。胚はガラス化液へ合計1分間の曝露後、希釈液(0.5Mショ糖添加の基本液)へ移し、さらに、洗浄を行った後、培養して生存性を判定した。

2) 異なる組成のガラス化液への曝露がガラス化保存胚の生存性におよぼす影響

1) に従って平衡した胚を、グリセロールまたはエチレングリコールを添加したガラス化液とともにプラスチックストローへ吸引し、ストローの先端を熱シール後、直ちに液体窒素中に浸漬して急速に冷却してガラス化保存した。胚は融解後、希釈液へ移し、さらに、洗浄を行った後、培養して生存性を判定した。

[実験2] 希釈液への卵黄添加がガラス化保存胚の生存性におよぼす影響

平衡液には10%グリセロールを添加した基本液、ガラス化液には30%エチレングリコールおよび1Mショ糖を添加した基本液を用いた。卵黄添加の希釈液は以下のように作製した。新鮮な鶏卵(イサブラウン種)の卵黄を滅菌ガーゼで濾過後、ビーカー内のスターラーで攪拌中のmPBSへ5、10、15および20%(v/v)の濃度になるように添加した。10分間の攪拌後、混合液を50mlの遠沈管へ移し、1500×g、15分間の遠心分離を行った。上澄み45ml

を別の遠沈管へ移し、再び上記の条件で遠心分離を行った。上澄み40mlを吸引し、この溶液をもとにして20%CSおよび0.5Mショ糖を含んだ希釈液を作製した。希釈液は、孔径0.8、0.45および0.2 μ mの滅菌フィルター（アドバンテック）を連続して用いて濾過滅菌した後、実験に供した。

胚のガラス化保存は実験1.2)に従って行った。すなわち、融解後、ストローから取り出した胚はディッシュ中の0、5、10、15および20%の卵黄を添加した溶液をもとにした4種類の希釈液へ投入、同液中で胚をパスツールピペットにより3回移動させ、合計10分間凍害保護物質の希釈を行った。洗浄後、胚を培養して生存性を判定した。

[実験3]ガラス化保存胚のストロー内希釈用カラムの検討

実験2.に従って胚をガラス化液に平衡後、以下の4種類の方法でガラス化保存を行ったのち、生存性を調べた。

1群) 25 μ lのガラス化液とともに胚をストロー内へ吸引し、ストローを熱封入後、液体窒素へ浸漬して急速冷却した。融解後、胚をディッシュ内の希釈液(0.5Mショ糖を添加した基本液)中に取り出し、パスツールピペットにより同液内で胚を3回移動させ、合計10分間凍害保護物質の希釈、除去を行った。

2群) 25 μ lのガラス化液とともに胚をストロー内へ吸引後、綿栓部を下にしてストローを垂直に立て、19G脊椎針(テルモ)を用いて150 μ lの希釈液(10%卵黄加mPBS + 0.5Mショ糖 + 20%CS)を重層し、熱封入後、液体窒素へ浸漬して急速冷却した。融解後、ストローを凍結時と逆向きに、すなわち、綿栓部を下にして垂直に30秒間立てることにより凍害保護物質の希釈をストロー内で行った(Fig. 11)。

3群) あらかじめ150 μ lの希釈液(10%卵黄加mPBS + 0.5Mショ糖 + 20%CS)および25 μ lのガラス化液を連続してストロー内へ吸引後、マウスピースコントロールのパスツールピペットによって、ガラス化液層へ胚を導入、熱封入後、液体窒素へ浸漬して急速冷却した。融解後、ストローを凍結時と逆向きに、すなわち、綿栓部を下にして垂直に30秒間立てることにより凍害保護物質の希釈をストロー内で行った(Fig. 12)。

4群) 1)の方法によりガラス化保存した胚を融解後、直接基本液へ投入した(無希釈区)。

[実験4]ガラス化保存およびストロー内希釈を行った胚の正常な胎子および産子への発生能の検討

実験3の結果より、最も有効と考えられる方法、すなわち第3群の方法でガラス化保存した胚を移植現場にて融解後、ストロー内希釈し、発情周期を同期化させた受胎ウシ20頭に、非手術的に1胚ずつ移植した。また、対照として緩慢凍結法による直接移植法(桑山ら、1992b)で凍結した胚を16頭の受胎ウシへ移植して比較した。受胎ウシの妊娠診断は移植後60日以降に胎膜触診法にて行い、また、産子の観察は分娩時または分娩直後に行った。

【結果】

実験1. ガラス化液組成の検討

Table 7に示したように、グリセロールおよびエチレングリコールを添加したガラス化液へ曝露後、凍害保護物質を希釈した胚の生存率に有意差は認められなかった。また、Table 8に示したように、グリセロールおよびエチレングリコールを添加したガラス化液によりガラス化保存した胚の融解、培養後の生存率に有意差は認められなかった。

実験2. 希釈液への卵黄添加がガラス化保存胚の生存性におよぼす影響

Table 9に示したように、ガラス化保存胚の生存率は、5、10および15%卵黄添加区では無添加に比較して有意に高かった($P < 0.05$)。

実験3. ガラス化保存胚のストロー内希釈用カラムの検討

Table 10に示したように、希釈区(1、2および3群)の生存率は無希釈区(4群)に比べて有意に高い値であり($P < 0.01$)、希釈区の生存率間に有意差は認められなかった。

実験4. ガラス化保存およびストロー内希釈を行った胚の正常な胎子および産子への発生能の検討

ガラス化保存胚20個を20頭の受胎ウシに移植したところ、11頭の受胎(受胎率55%)が

確認された。このうち9頭から正常な新生子が誕生した（産子率45%）。また、対照区の緩慢凍結法による直接移植法では、16頭中8頭の受胎ウシが受胎（受胎率50%）し、うち7頭が正常子ウシを分娩した（Fig. 13, 産子率44%）。実験区と対照区の受胎率および産子率に有意差は認められなかった。

Cryo-protectant	No. of trials	Total no. of blastocysts examined	No. (%) of blastocysts survived
Glycerol	3	30	27(90)
Ethylene glycol	3	30	26(87)

*After equilibration and removal of cryoprotectants, blastocysts were cultured for 24 h.

Table 8. In vitro survival of bovine blastocysts vitrified by vitrification solution containing glycerol or ethylene glycol

Cryo-protectant	No. of trials	Total no. of blastocysts examined	No. (%) of blastocysts survived
Glycerol	3	30	24(80)
Ethylene glycol	3	30	24(80)

*After warming and removal of cryoprotectants, blastocysts were cultured for 24 h.

Table 9. In vitro survival of vitrified bovine blastocysts after dilution in albumen containing various concentrations of egg yolk

Concentration of egg yolk (%)	No. of trials	Total no. of blastocysts examined	No. (%) of blastocysts survived
0	3	30	24(80) ^a
5	3	30	27(90) ^a
10	3	30	26(87) ^a
15	3	30	29(97) ^a
20	3	30	25(83) ^b

*After vitrification and removal of cryoprotectants, blastocysts were cultured for 24 h.
^aValues with different superscripts are significantly different (P<0.05).

Table 7. *In vitro* survival of bovine blastocysts equilibrated in vitrification solutions containing glycerol or ethylene glycol^a

Cryo-protectant	No. of trials	Total no. of blastocysts examined	No. (%) of blastocysts survived
Glycerol	3	31	27(87)
Ethylene glycol	3	30	30(100)

^aAfter equilibration and removal of cryoprotectants, blastocysts were cultured for 24 h.

Table 8. *In vitro* survival of bovine blastocysts vitrified by vitrification solutions containing glycerol or ethylene glycol^a

Cryo-protectant	No. of trials	Total no. of blastocysts examined	No. (%) of blastocysts survived
Glycerol	3	30	21(70)
Ethylene glycol	3	30	22(73)

^aAfter warming and removal of cryoprotectants, blastocysts were cultured for 24 h.

Table 9. *In vitro* survival of vitrified-warmed bovine blastocysts after dilution with diluent containing various concentrations of egg yolk^a

Concentration of egg yolk (% v/v)	No. of trials	Total no. of blastocysts examined	No. (%) of blastocysts survived
0	3	30	21(70) ^b
5	3	30	27(90) ^c
10	3	30	29(97) ^c
15	3	30	29(97) ^c
20	3	30	25(83) ^{b, c}

^aAfter vitrification and removal of cryoprotectants, blastocysts were cultured for 24h.

^{b, c}Values with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

Table 10. *In vitro* survival of vitrified-warmed bovine blastocysts diluted with different methods^a

Dilution method	No. of trials	Total no. blastocysts examined	No. (%) of blastocysts survived
1 ^b	3	30	27(90) ^f
2 ^c	3	30	22(73) ^f
3 ^d	3	30	28(93) ^f
4 ^e	3	30	0(0) ^g

^aAfter vitrification and removal of cryoprotectants, blastocysts were cultured for 24h.

^bVitrified-warmed blastocysts were diluted in a dish.

^cBlastocysts were aspirated into the bottom of straws and 150 μ l of diluent (10% egg yolk, 0.5M sucrose and 20% CS in mPBS) were injected onto the vitrification solution (VS) column without air partition. After warming, VS and diluent were mixed in the straw.

^dBlastocysts were introduced to the VS column (25 μ l) which had been loaded under a column of diluent (150 μ l; 10% egg yolk, 0.5M sucrose and 20% CS in m-PBS). After warming, VS and diluent were mixed in the straw.

^eVitrified-warmed blastocysts were washed without dilution step.

^{f, g}Values with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

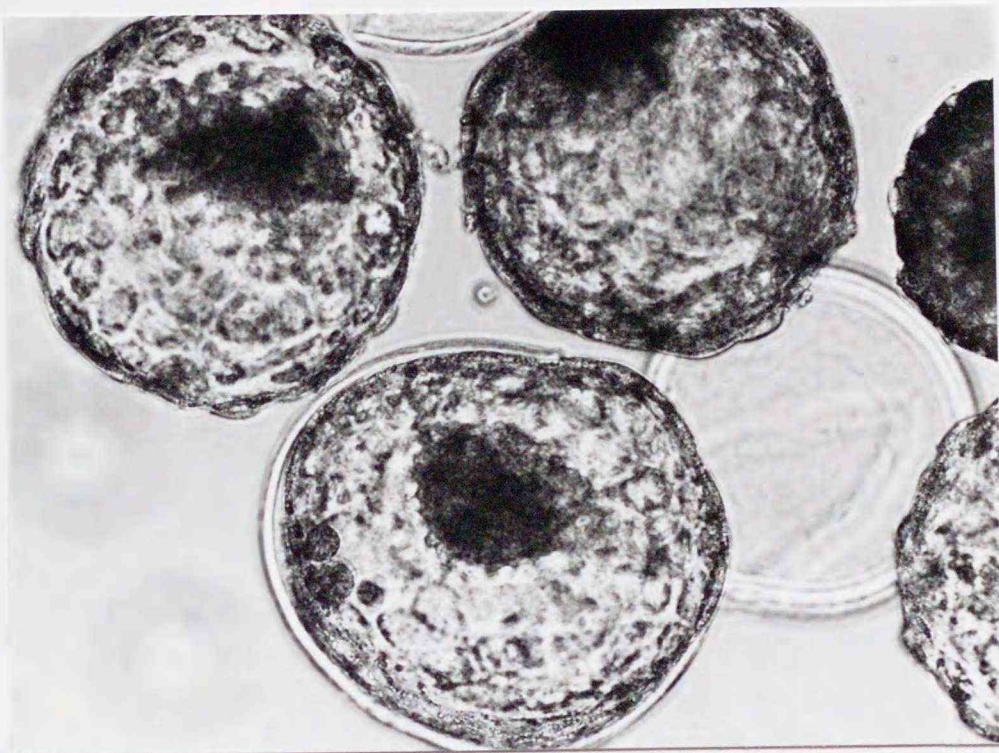


Fig. 10. Blastocysts survived after vitrification, warming and culture for 24 h.

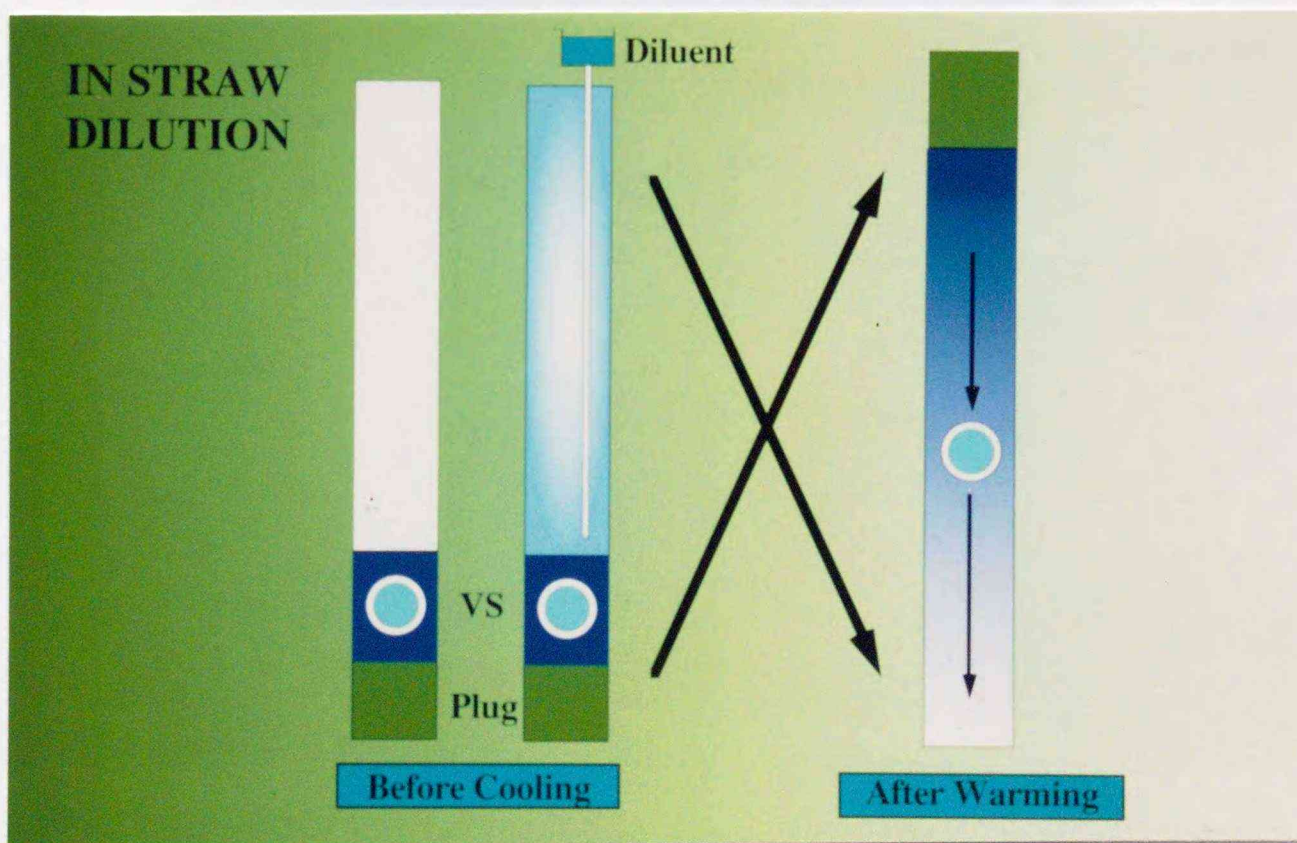


Fig. 11. Diagram of the straws of method 2.

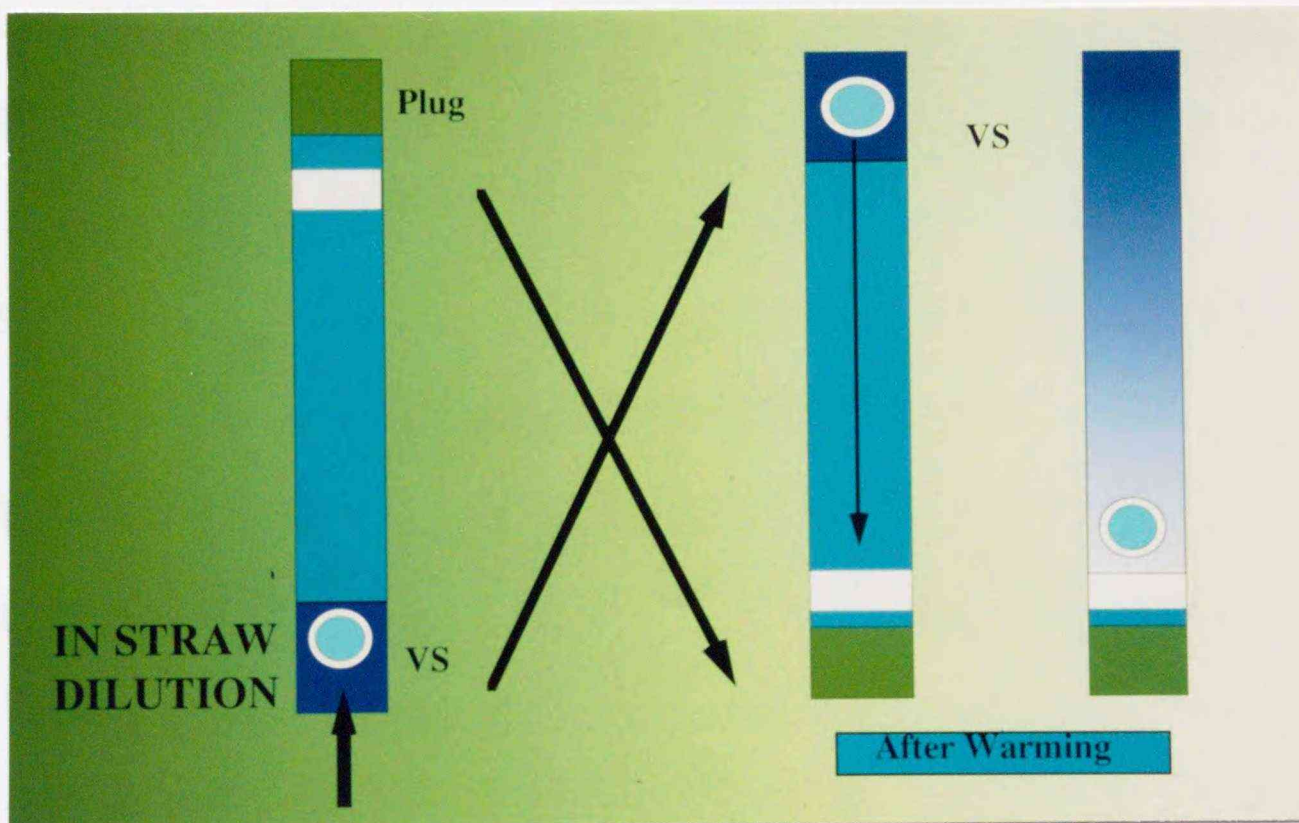


Fig. 12. Diagram of the straws of method 3.



Fig. 13. A newborn calf from direct transfer of vitrified and in straw diluted blastocyst.

【考察】

エチレングリコールとグリセロールへの胚の平衡実験では、エチレングリコール区において平衡後全ての胚が生存した。エチレングリコールは、グリセロールに比べて分子量が小さく、マウスやウシの胚細胞膜への透過性が非常に高いことが報告されている(桑山と浜野, 1991; Voelkel & Hu, 1992a, b)。エチレングリコール区における平衡後の高い生存率は、このエチレングリコールの高い細胞膜透過性がガラス化液へ平衡時の胚の収縮を緩和し、障害を軽減したためと考えられる。しかし、本実験で用いた30%濃度では、グリセロール区においても、平衡時の胚損耗率はわずかであり、ガラス化保存後の生存率はエチレングリコール区同様に高く、本実験条件下では1Mのショ糖と組み合わせることにより、良好なガラス化保存状態の得られることが示唆された。すなわち、これらの方法により第1章のような煩雑な平衡段階法を用いることなく、ガラス化保存後の高い生存率が得られることが明らかになった。しかし、ガラス化保存法では高濃度の凍害保護物質を添加するので溶液の浸透圧は極度に高くなる。そのため凍害保護物質の希釈時、胚細胞への復水の影響が緩慢凍結法に比べて強く、胚生存率向上のためには希釈時の復水による影響を軽減させることが重要であると考えられる。希釈時の急激な浸透圧の変化を緩和して細胞容積の増大による細胞膜の破壊を軽減するために、緩慢凍結法で利用されている方法、すなわち希釈液へ浸透圧緩衝剤として細胞膜非透過性のショ糖を添加する方法 (Leibo, 1983, 1984; Renard & Heyman, 1982, 1983)を利用して、ガラス化保存胚の1段階希釈により高い生存率が得られている (Tachikawa et al., 1993; Rall, 1992; Dinnyes et al., 1994)。本実験では、ショ糖を添加した希釈液への鶏卵黄添加の有効性が判明した。精液を生理食塩水を用いて高倍率に希釈すると、いわゆる希釈ショックを生じ精子の生存性が低下するが、卵黄を含む希釈液、例えば、卵黄クエン酸ソーダが開発され、ウシ精液の高倍率希釈が可能となった(梶田、1992)。その後、卵黄には低温障害防止効果のあることも分かり(梶田、1992)、現在では卵黄は凍結精液用の希釈液の必須成分として汎用されている。本実験では希釈液にのみ卵黄を添加しているため、その効果は希釈ショックを緩和する形で発揮されたものと考え

えられる。胚の細胞内に高濃度に浸透していた凍害保護物質が希釈液中に拡散していく過程で、胚は一時的に低張液にさらされた状態になる。細胞内に浸透する水により細胞が膨潤して細胞膜が破壊されるとすれば、卵黄は水の浸透を緩和している可能性が高い。高分子の物質は、束一的性質による浸透圧効果はほとんど無視できる程度に低いが、分子構造内に水分子を保持する作用がある (Shaw, 1983)。例えば、血液中のアルブミンはコロイド浸透圧により血管外に水分が過度に漏れでることを防いでいる。卵黄中に含まれる蛋白質もコロイド浸透圧により胚細胞内への水分流入を遅くしてガラス化保存後の希釈ショックを緩和した可能性が考えられる。また、卵黄の脂質が透明帯あるいは原形質膜の外側と作用し、水の透過性を低下させた可能性もある。今後、コロイド浸透圧作用の高い物質 (例えば、デキストラン、ポリエチレングリコール、ポリヴィニルピロリドンなど) やリン脂質を単独あるいは併用した希釈液の効果を検討することにより、卵黄の作用機序が明らかにされ、より効果的な希釈液開発のための重要な情報が得られるものと思われる。

ガラス化保存胚の実用利用には、野外で胚を融解後、ストロー内で凍害保護物質の希釈、除去を行える方法の確立が必要である。最近、ウシ胚の緩慢凍結方法において、広く使われ始めた直接移植法 (Massip & Van Der Zwalmen, 1984; Voelkel & Hu, 1992a, b) は、融解後、凍結溶液に入ったまま胚を直接ウシに移植し、受胎ウシの子宮内で凍害保護物質の希釈が行われる方法である。この方法は、凍結溶液に細胞膜非透過性のショ糖などを添加して、あらかじめ胚を収縮状態にしておいたり、エチレングリコールなど細胞膜透過性の高い凍害保護物質を用いて、希釈時の復水による胚細胞体積の増大による細胞膜損傷を軽減するものである。しかし、緩慢凍結法に比べて極めて高い濃度の凍害保護物質を用いて凍結するガラス化保存法では希釈時の浸透圧障害のため、直接移植法は不適當であると推測された。推測どおり第4群 (無希釈区) では生存胚は得られず、直接、基本液へ曝されたことによる過剰な復水により、全ての胚が致死的な障害を受けたと考えられる。さらに、ガラス化保存した体内受精由来胚での直接移植実験の報告での受胎率も8~31% (Ishimori et al., 1992) と高い値ではなく、凍害保護物質を無希釈のまま受胎ウシに移植する直接移植法は、

ガラス化保存胚には適さないと考えられる。一方、凍害保護物質の希釈をストロー内で行う直接希釈法、いわゆるワンステップ法(Leibo, 1983a, b, 1984)は、移植現場での簡易な希釈処理を可能とする方法である。しかし、この方法では、希釈液と凍結溶液を隔てた空気層を壊して両液を混合する際、多数の気泡が発生して胚を紛失するケースが発生すること、また、発生した気泡の大きさによっては、ストロー内の各液層が遮断され、希釈が良好な状態で行われない場合があることなどが実用利用上の問題点であった。そこで、本実験ではこの問題点を改善すべく、ガラス化液層と希釈液層の間に空気層を挟まず、両液を重層する方法を考案した。予備実験の結果、ガラス化液と希釈液の比重と粘性の違いから、ガラス化液を下にして重層した両液は室温下で30分間以上放置しても、混合することはなく、空気層を挟まなくてもストロー内希釈用のカラムとして利用できることが明らかとなった。ただ、ガラス化液に平衡した胚を吸引法でストロー内に導入する際、収縮によって変形した胚はストロー内壁に接着し易く、溶液の流れとともに移動しない場合があった。その場合、胚はガラス化液以外のカラム内に存在したまま、急速冷却される可能性がある。実際、本実験の2群に見られた死滅胚の中には、冷却時にガラス化液層外で凍結された胚が含まれていた。しかし、胚のストロー内導入をパスツールピペットによりガラス化液層に正確に導入した3群では、全ての胚がガラス化液層内で保存され、カラム外凍結の問題は発生しなかった。さらに、融解後、凍害保護物質をストロー内希釈したガラス化保存胚の移植後の受胎率は、一般に緩慢凍結胚で用いられているコンベンショナルな直接移植法(桑山ら, 1992b)の成績に比べて有意差のない値であった。これらのことより、エチレングリコールとショ糖を用いたガラス化保存法により、簡易な平衡方法でウシの体外受精由来胚盤胞を高率にガラス化保存することができ、さらに、同法でガラス化保存した胚のストロー内希釈法の実用化の可能性が示唆された。

【小括】

ウシの体外受精由来胚盤胞の簡易的なガラス化保存法およびガラス化保存胚のストロー内希釈法を開発するため、エチレングリコールとショ糖を用いたガラス化保存法の検討を行った。実験1では、10%グリセロールを添加した基本液（平衡液）に胚を5分間平衡後、1 Mショ糖と30%のグリセロールまたはエチレングリコールを添加した基本液に胚を曝露した結果、それぞれ87および100%の生存率が得られた。また、同様に平衡後ガラス化保存した胚の生存率は70および73%であった。実験2では1 Mショ糖と30%エチレングリコールを添加したガラス化液でガラス化保存した胚を融解後、0~20%の卵黄および0.5Mショ糖を添加した希釈液で凍害保護物質の希釈を行い、生存率を調べた。その結果、5~15%の卵黄添加区では無添加区に比較して有意に高い生存率が得られた。実験3では、胚を30%エチレングリコールと1 Mショ糖を添加したガラス化液に平衡後、2種類のストロー内希釈法について検討を加えた。あらかじめ150 μ lの希釈液（10%卵黄 + 0.5Mショ糖添加）とその下部に25 μ lのガラス化液を吸引しておいたストローへピペットにより胚を導入するストロー内希釈法によって、高い生存率（93%）が得られた。また、ストロー内希釈したガラス化保存胚を20頭の受胎ウシに1個ずつ移植を行ったところ、11頭が受胎し、9頭の正常な子ウシが得られ、ガラス化保存、ストロー内希釈胚の正常な胎子および産子への発生能が明らかとなった。

この結果より、ウシの体外受精由来胚盤胞は、30%エチレングリコールと1 Mショ糖を含むガラス化液を用いた簡易的な平衡法によってガラス化保存ができることが明らかとなった。さらに、ガラス化保存胚は、0.5Mショ糖と5~15%卵黄を添加した希釈液を用いることによりストロー内での凍害保護物質の希釈が可能であることが分かった。

総 括

ウシの体外受精由来胚盤胞に適した実用的なガラス化保存法の開発を目的として、基礎的ならびに応用的研究を行った。

1. グリセロールとプロピレングリコールを用いたウシの体外受精由来胚盤胞のガラス化保存

ウシの体外受精由来胚盤胞のガラス化保存法を検討するためにグリセロールとプロピレングリコールを用いたガラス化液で実験を行った。まず、ガラス化液に必要な凍害保護物質の最低濃度を検討した結果、グリセロール22.5%およびプロピレングリコール22.5%であった。次に、この最低有効濃度の凍害保護物質を添加したガラス化液に1、2、4、8および16段階で胚を平衡し、ガラス化液への平衡条件が胚の生存率に及ぼす影響を調べた。各区の生存率はそれぞれ56、89、100、100および100%だった。また、平衡後ガラス化保存した胚の生存率はそれぞれ0、10、79、82および87%で、4段階以上の区で有意に高い値が得られた。次に2段階法(10%グリセロール、20%プロピレングリコール液中へ10分間胚を平衡後、ガラス化液へ胚を投入)および16段階法で処理した胚のガラス化保存後の生存性を検査するとともに、フリーズレプリカ法を用いて微細構造の変化を観察した。16段階法では高い生存率(83%)が得られたが、2段階法では生存胚は得られなかった。また、両群とも細胞内外には氷晶の形成は観察されず、溶液の完全なガラス化が確認された。16段階法では原形質膜の微細構造に大きな変化は見られなかったが、2段階法では原形質膜と細胞内器官が著しく接近して膜内粒子の凝集、あるいは膜内粒子が著しく減少した部位(aparticulate domain)の発生が顕著に観察された。さらに、ガラス化保存胚を10頭の受胎ウシに移植した結果、6頭が受胎、5頭の正常な子ウシが得られ、ガラス化保存胚が正常な胎子および産子へ発育することが確認された。

2. エチレングリコールとショ糖を用いたウシの体外受精由来胚盤胞のガラス化保存

体外受精由来ウシ胚の簡易かつ有効なガラス化保存法と野外応用のための凍害保護物質のストロー内希釈法を開発するため、エチレングリコールとショ糖を用いたガラス化保存

法の検討を行った。10%グリセロールを添加した基本液（平衡液）に胚を5分間平衡後、1 Mショ糖と30%のグリセロールまたはエチレングリコールを添加した基本液に胚を曝露した結果、それぞれ87および100%の生存率が得られた。また、同様に平衡後ガラス化保存した胚の生存率は70および73%であった。次に、1 Mショ糖と30%エチレングリコールを添加したガラス化液でガラス化保存した胚を融解後、0~20%の卵黄と0.5 Mショ糖を添加した希釈液で凍害保護物質の希釈を行い生存率を調べた結果、5~15%の卵黄添加区では無添加区に比較して有意に高い生存率が得られた。また、胚を1 Mショ糖と30%エチレングリコールを添加したガラス化液に平衡後、2種類のストロー内希釈法を検討した。あらかじめ150 μ lの希釈液（10%卵黄 + 0.5 Mショ糖添加）とその下部に25 μ lのガラス化液を吸引しておいたストローへピペットにより胚を導入するストロー内希釈法を用いた場合、ガラス化保存後に高い生存率（93%）が得られた。さらに、ストロー内希釈したガラス化保存胚を20頭の受胎ウシに1個ずつ移植を行ったところ、11頭が受胎し9頭の正常な子ウシが得られた。

以上のことから、グリセロールとプロピレングリコールを用いたガラス化法においては、ガラス化液への平衡を緩慢にすることによって平衡時の胚の障害を緩和し、ガラス化保存後のウシの体外受精由来胚盤胞の高い生存性を得られることが明らかとなった。また、30%エチレングリコールと1 Mショ糖を含むガラス化液および0.5 Mショ糖と5~15%卵黄を添加した希釈液を使用することによって、2段階の簡易な平衡方法でもウシの体外受精由来胚盤胞を高率にガラス化保存することができ、さらに、ガラス化保存胚は凍結ストロー内で凍害保護物質の希釈を可能にすることが示された。すなわち、ウシの体外受精由来胚盤胞の簡易なガラス化保存とストロー内希釈法による実用化の可能性が示唆された。

謝 辞

本論文のとりまとめにあたり、懇切な御指導をいただいた北海道大学大学院獣医学研究科診断治療学講座繁殖学教室教授、金川弘司博士、同研究科比較形態機能学講座生化学教室教授、斉藤昌之博士、同研究科動物疾病制御学講座実験動物学教室教授、渡邊智正博士および北海道大学獣医学研究科診断治療学講座繁殖学教室助教授、高橋芳幸博士に深甚なる謝意を表します。また終始、懇篤なる御指導、御校閲および有益な御助言をいただいた静岡大学農学部教授、番場公雄博士、静岡大学農学部助教授、吉田光敏博士ならびに北海道大学低温科学研究所、藤川清三博士に哀心より感謝申し上げます。

引用文献

- Bank, H. & Maurer, R.R. Survival of frozen rabbit embryos. *Exp.Cell Res.* 89:188-196, 1974.
- Bilton, R.J. & Moore, N.W. In vitro culture, storage and transfer of goat embryos. *Aust.J.Biol.Sci.*29:125-129, 1976a.
- Bilton, R.J. & Moore, N.W. Storage of cattle embryos. *J.Reprod.Fert.* 46:537-538, 1976b.
- Brackett, B.G. & Oliphant, G. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.*12:260-274, 1975.
- Chupin, D., Florin, B. & Procureur, R. Comparison of two methods for one-step in-straw thawing and direct transfer of cattle blastocysts. *Theriogenology* 21:455-459, 1984.
- Dinnyes, A., Keefer, C.L., Stice, S.L., Solti, L., Vajta, G., Machaty, Z. & Rall, W.F. Vitrification of IVMFC bovine blastocysts in VS3 and EFS solutions: A preliminary report. *Theriogenology* 41:189, 1994.
- Dobrinsky, J.R. & Johnson, L.A. Cryopreservation of porcine embryos by vitrification: a study of in vitro development. *Theriogenology* 42:25-35, 1994.
- 堂地修、高倉宏輔、今井敬 ガラス化により超低温保存したウシ胚の移植。
家畜繁殖誌 36:69-72, 1990.
- Fahy, G.M. Vitrification. In "Low Temperature Biotechnology Emerging Applications and Engineering Contributions" (McGrath, J.J. & Diller, K.R. ed.), *Amer.Soc.Mech.Eng. BED* 1:98, New York, 113-146, 1988.
- Fahy, G.M., MacFarlane, D.R., Angell, C.A. & Meryman, H.T. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 21:407-426, 1984.
- Fujikawa, S. Freeze-fracture techniques. In "Electron Microscopy in Biology-A

Practical Approach (Harris, J.R.ed.), Oxford Press, Oxford, 173-201, 1991.

藤川清三、Steponkus, P.L. ガラス状凍結保存のメカニズムに関する研究.
凍結および乾燥研究会会誌 37:25-29, 1991.

Grout, B.W. & Henshaw, G.G. Freeze preservation of potato shoot-tip cultures.
Ann.Bot. 42:1227-1229, 1978.

Halasz, A. & Collins, G.M. Studies in cryoprotection 2: propylene-glycol and
glycerol. Cryobiology 21:144-147, 1984.

浜野晴三、桑山正成 培地に添加されたウシ胎児血清がウシ卵子の体外成熟
および体外受精後の発生におよぼす影響. 家畜繁殖技術会誌14:6-16, 1992.

許 登造、山川宏人、山井淳子、尾川昭三 急速凍結で硝子化状態のまま保
存されたマウス初期胚の生存性ならびに移植試験. 家畜繁殖誌32:29-32,
1986.

Ischenko, V.V., Ostashko, F.I. & Isachenko, E.F. Vitrification and ultra-rapid
freezing of rat embryos. Theriogenology 37:227, 1992.

Ishimori, H., Miki, Y., Kishi, Y., Saeki, K., Seike, K. & Kainuma, H. Vitrification
of bovine embryos. Theriogenology 37:228, 1992.

James, E. Cryopreservation of *Schistosoma mansoni* schistosomula using 40% v/v
methanol and rapid cooling. Cryo-Lett. 1:535-544, 1980.

Kasai, M., Hamaguchi, Y., Zhu, S.E., Miyake, T., Sakurai, T. & Machida, T. High
survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol-based solution
by a simple method. Biol.Reprod. 46:1042-1046, 1992.

Kasai, M., Komi, J.H., Takakamo, A., Tsudera, H., Salurai, T. & Machida, T.
A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity
vitrification solution, without appreciable loss of viability. J.Reprod.Fert.89:
91-97, 1990.

- Kobayashi, K., Nagashima, H., Yamakawa, H., Kato, Y. & Ogawa, S. The survival of whole and bisected rabbit morulae after cryopreservation by vitrification method. *Theriogenology* 33:777-788, 1990.
- Kobayashi, S., Tomita, M., Pollard, J.W. & Leibo, S.P. Survival of cryopreserved porcine embryos vitrified in ethylene glycol plus polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology* 44:228 (abstr.), 1994.
- Kono, T., Suzuki, O. & Tsunoda, Y. Cryopreservation of rat blastocysts by vitrification. *Cryobiology* 25:170-173, 1988.
- 河野友宏、角田幸生 ガラス化超急速凍結法によるマウス初期胚の生存性および移植試験. *家畜繁殖誌*33:77-81, 1987.
- Kuwayama, M., Fujikawa, S. & Nagai, T. Ultrastructure of IVM-IVF bovine blastocysts vitrified after equilibration in glycerol 1, 2-propanediol using 2-step and 16-step procedures. *Cryobiology* 31:415-422, 1994.
- 桑山正成、浜野晴三 ウシ体外受精由来胚の凍結保存. *家畜繁殖技術会誌*13:165-171, 1991.
- Kuwayama, M., Hamano, S. & Nagai, T. Vitrification of bovine blastocysts obtained by in vitro culture of oocytes matured and fertilized in vitro. *J.Reprod.Fert.* 96:187-193, 1992a.
- 桑山正成、古坂正人、佐藤将勝、浜野晴三 ウシ体外受精由来胚盤胞のダイレクト移植試験. *北海道牛受精卵移植研究会報*11: 28-32, 1992b.
- Leibo, S.P. A one-step in situ dilution method for frozen-thawed bovine embryos. *Cryo-Lett.* 4:387-400, 1983.
- Leibo, S.P. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed embryos. *Theriogenology* 21:767-790, 1984.
- Leibo, S.P. Commercial production of pregnancies from one-step diluted frozen-

- thawed bovine embryos. *Theriogenology* 25:166 (abstr.), 1986a.
- Leibo, S.P. Cryobiology: Preservation of mammalian embryos. In "Genetic Engineering of Animals" (Evans, J.W. & Hollaender, A.ed.), Plenum Press, New York, 251-272, 1986b.
- Leibo, S.P. Cryopreservation of embryos. *Proc. 11th Internat. Conf. Anim. Reprod. Artifi. Insem. Ireland* 5:370-378, 1988.
- Leibo, S.P. & Mazur, P. Method of preservation of mammalian embryos by freezing. In "Methods in Mammalian Reproduction" (Daniel, J.C.ed.) Academic Press, New York, 179-201, 1978.
- Luyet, B.J. The vitrification of organic colloids and of protoplasm. *Biodynamica* 29: 1-14, 1937.
- Luyet, B.J. Anatomy of the freezing process in physical systems. In "Cryobiology" (Meryman, H.T.ed.) Academic Press, London, 115-138, 1966.
- Massip, A. & Van Der Zwalmen, P. Direct transfer of frozen cow embryos in glycerol-sucrose. *Vet. Rec.* 115:327-328, 1984.
- Massip, A., Van Der Zwalmen, P., Scheffen, B. & Ectors, F. Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryo-Lett.* 7:270-273, 1986.
- 梶田博司 精子の凍結保存. 精子学. 毛利秀雄監修、東大出版会、225-233, 1992.
- 松本 徹郎、石渡 学、山井淳子、山川 宏人、近藤ゆり、川手秀一、尾川昭三 Vitrification 法で凍結融解されたマウス胚における胚の生存性に対するsucrose希釈の効果. *家畜繁殖誌* 33:200-205, 1987.
- Miyamoto, H. & Ishibashi, T. Survival of frozen-thawed mouse and rat embryos in the presence of ethylene glycol. *J. Reprod. Fert.* 50:373-375, 1977.

- Miyamoto, H. & Ishibashi, T. The protective action of glycols against freezing damage of mouse and rat embryos. *J.Reprod.Fert.* 54:427-432, 1978.
- Nakamichi, R., Ohboshi, S. & Fujihara, N. Vitrification of rat blastocysts developed in vitro. *Zygote* 1:281-285, 1993.
- Niemann, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock:Current status and research needs. *Theriogenology* 35:109-124, 1991.
- Niemann, H., Sacher, B., Schilbing, E. & Smidt, D. Improvement of survival rates of bovine blastocysts with sucrose for glycerol dilution after a fast freezing and thawing method. *Theriogenology* 17:102 (abstr.), 1982.
- 尾川昭三 ラット、マウスの人工授精および哺乳動物胚の凍結保存について. *実験動物* 27:110-122, 1978.
- 尾川昭三、長嶋比呂志、友田仁 ラット胚の凍結保存について. *日本畜産学会第68回大会講演要旨* 47, 1973.
- Ostashko, F.I., Isachenko, V.V., Isachenko, E.F. & Grischenko, V.I. Cattle embryos vitrification and ultrarapid freezing. *Proc.12th Int.Congrs.Anim.Reprod.*1469-1472, 1992.
- Papis, K., Fujikawa, S., Kojima, T. & Oguri, N. Effect of the composition of vitrification media on survival of rabbit embryos. *Cryobiology* 30:98-105, 1993.
- Polge, C., Smith, A.U. & Parkes, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. *Nature (Lond.)* 164:666, 1949.
- Rall, W.F. Cryopreservation of oocytes and embryos:methods and applications. *Anim.Reprod.Sci.* 28:237-245, 1992.
- Rall, W.F. & Fahy, G.M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos by vitrification. *Nature (Lond.)* 313:573-575, 1985.

Rapatz, G.L., Menz, L.J. & Luyet, B.J. Anatomy of the freezing process in physical systems. In "Cryobiology " (Meryman, H.T.ed.) Academic Press, London, 139-162, 1966.

Renard, J.P. & Heyman, Y. Effet de mode et de dilution du cryoprotecteur sur la viabilite des blastocystes de vache apres decongelation. 16th Internat.Congr. Refrigeratiuon Commission. 266:25-32, 1983.

Renard, J.P., Heyman, Y. & Ozil, J.P. Congelation de l'embryon bovin: use nouvelle methode de decongelation pour le transfert cervical d'embryons conditionnes une seule fois en paillettes. Ann.Med.Vet. 126:25-32, 1982.

Riha, J. & Landa, V. Postury vitrifikace embryi skotu a jejich prezivani po kultivaci in vitro. Zivac.vyroba. 34:1057-1062, 1989.

Shaw, D.J. 運動学的性質. コロイドと界面の化学. 北原文雄訳、廣川書店、19-39, 1983.

Scheffen, B., Van Der Zwalmen, P. & Massip, A. A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification. Cryo-Lett. 7:260-269, 1986.

Schwier, M.C., Rall, W.F., Stuart, L.D. & Wildt, D.E. In situ straw dilution of ovine embryos cryopreserved by conventional freezing or vitrification. Theriogenology 33:321 (abstr.), 1990.

Smith, A.U. Behaviour of fertilized rabbit eggs exposed to glycerol and to low temperatures. Nature (Lond.) 170:374-375, 1952.

Smith, A.U. In vitro experiments with rabbit eggs. Mammalian Ger.Found.Symp. London, 217-222, 1953.

Smorag, Z. & Gadja, B. Vitrification of non-cultured and cultured rabbit embryos. Anim.Reprod.Sci. 26:151-158, 1991.

Smorag, Z., Gadja, B., Wieczorek, B. & Jura, J. Storage-dependant viability of

- vitrified rabbit embryos. *Theriogenology* 31:1227-1231, 1989.
- Steel, R.G.D. & Torrie, J.H. *Principles and Procedures of Statistics*. 2nd ed. McGraw-hill Inc., Auckland, 1980.
- Steponkus, P.L., Langis, R. & Fujikawa, S. Cryopreservation of plant tissues by vitrification. *Adv.LowTemp.Biol.* 1:1-34, 1991.
- Suzuki, T., Yamamoto, M., Ooe, M., Sakata, A., Matsuoka, M., Nishikata, Y. & Okamoto, K. Effect of sucrose concentrations used for one-step dilution upon in vivo survival of bovine embryos refrigerated in glycerol and 1, 2-propanediol. *Theriogenology* 34:1051-1057, 1990.
- Tachikawa, S., Otoi, T., Kondo, S., Machida, T. & Kasai, M. Successful vitrification of bovine blastocysts, derived by in vitro maturation and fertilization. *Molec. Reprod.Devlop.* 34:266-271, 1993.
- Trounson, A.O., Shea, B.F., Ollis, G.W. & Jacobson, M.A. Frozen storage and transfer of bovine embryos. *J.Anim.Sci.* 47:677-681, 1978.
- Tsunoda, Y. & Sugie, T. Survival of rabbit eggs preserved in plastic straws in liquid nitrogen. *J.Reprod.Fert.* 49:173-174, 1977.
- 内海恭三、湯原正高 ラット胚の凍結保存に関する研究. 岡山大学農学部学術報告 44:24-27, 1974a.
- 内海恭三、湯原正高 凍結一融解後のラット胚の生存. 日本不妊学会誌 20:10, 1974b.
- Valdes, C.A., Abas Mazni, O., Kanagawa, H. & Fujikawa, S. Confirmation by cryo-electron microscopy of the absence of crystalization using a vitrification solution. *Cryo-Lett.* 11:351-358, 1990.
- Van Der Zwalmen, P., Touati, K., Ectors, F.J., Massip, A. & Ectors, F. Vitrification of bovine embryos. *Theriogenology* 31:270 (Abstr.), 1989.

Voelkel, S.A. & Hu, Y.X. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 37: 23-37, 1992a.

Voelkel, S.A. & Hu, Y.X. Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females. *Theriogenology* 37:687-697, 1992b.

Whittingham, D.G. Survival of rat embryos after freezing and thawing. *J.Reprod. Fert.* 43:575-578, 1975.

Whittingham, D.G. & Adams, C.E. Low temperature preservation of rabbit embryos. *J.Reprod.Fert.* 47:269-274, 1976.

Whittingham, D.G., Leibo, S.P. & Mazure, P. Survival of mouse embryos frozen to -196 and -269°C. *Science* 178:411-414, 1972.

Willadsen, S.M. Deep freezing of embryos in the large domestic species. 9th Int. Congr.Anim.Reprod. & Artif.Insemi. RT-F-4:255-261, 1980.

Willadsen, S.M., Polge, C. & Rowson, L.E.A. The viability of deep-frozen cow embryos. *J.Reprod.Fert.* 52:391-393, 1976.

Willadsen, S.M., Polge, C., Rowson, L.E.A. & Moor, R.M. Preservation of sheep embryos in liquid nitrogen. *Cryobiology* 11:560(Abstr.), 1974.

Wilmot, I. The effect of coolingrate, warming rate, cryoprotective agent and stage of developement on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Sci.*11:1071-1079, 1972.

Wilmot, I. & Rowson, L.E.A. Experiments on the low temperature preservation of cow eggs. *Vet.Rec.* 92:686-690, 1973.

Yoshino, J., Kojima, T., Shimizu, M. & Tomizuka, T. Cryopreservation of porcine blastocysts by vitrification. *Cryobiology* 30:413-422, 1993.

Vitrification of bovine blastocysts derived from *in vitro* maturation,
in vitro fertilization and *in vitro* culture

Masashige Kuwayama

Animal Biotechnology Center, Livestock Improvement Association of Japan

Since the first report of successful cryopreservation of mouse embryos by vitrification (Rall & Fahy, 1985), many studies have focused on the cryopreservation of embryos from other species (Niemann, 1991). However, there has been no report about the vitrification of bovine blastocysts derived from *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization and *in vitro* culture (IVMFC). Therefore, the following studies have been carried out to establish efficient procedures for cryopreservation of bovine blastocyst derived from IVMFC by vitrification.

1. Vitrification of IVMFC bovine blastocysts using glycerol and propylene glycol

Four experiments were conducted to determine the optimal conditions for the vitrification of IVMFC bovine blastocysts and to investigate the relationship between survival rates and ultrastructural appearance of the blastocysts after vitrification using the freeze-replica technique. In Exp. 1, the optimal concentrations of glycerol and propylene glycol in the basic medium (modified TCM199) for cooling and warming without formation of ice crystals were determined. A straw containing 0.25 ml of the solution was plunged into liquid nitrogen (LN₂), and then warmed. Vitrification of the medium was observed when both glycerol and propylene glycol were present at the concentrations higher than 45% (v/v) in the solution. In Exp. 2, blastocysts were equilibrated in a solution containing 22.5% glycerol and 22.5% propylene glycol in stepwise manners (1, 2, 4, 8, or 16 steps). After the removal of the cryoprotectants, the blastocysts were cultured for 24 h *in vitro*. The survival rates for the embryos equilibrated in 1, 2, 4, 8 and 16 step (s) were 56, 89, 100, 100 and 100%, respectively. Blastocysts equilibrated as above were vitrified in LN₂, then warmed and cultured *in vitro*. Higher survival rates were obtained for blastocysts equilibrated in 4, 8 and 16 steps (79, 82 and 87%, respectively) than for those in 1 (0%) or 2 (10%) steps. In Exp. 3, blastocysts were equilibrated in vitrification solution (VS: 22.5% glycerol + 22.5% propylene glycol) using either the 16-step method (18 min in total) or the 2-step method (10% glycerol + 20% propylene glycol for 10 min and then exposure to VS). The blastocysts were then vitrified in LN₂, and cultured for 24 h. While 83% of blastocysts survived following

the 16-step method, no blastocysts survived by the 2-step method. In Exp. 4, freeze-replica observations were carried out on blastocysts vitrified by the 16-step and the 2-step methods. No ice crystals were observed in the cytoplasm, blastocoelic cavity or extracellular areas of blastocysts, confirming complete vitrification. Little ultrastructural change was observed in the plasma membrane of the blastocysts equilibrated by the 16-step method. In contrast, blastocysts equilibrated by the 2-step method exhibited distinct aggregation of intramembrane particles and small vesicles in the plasma membranes. Ten blastocysts that survived after vitrification were transferred to ten recipients. Six of them became pregnant and 5 normal calves were obtained.

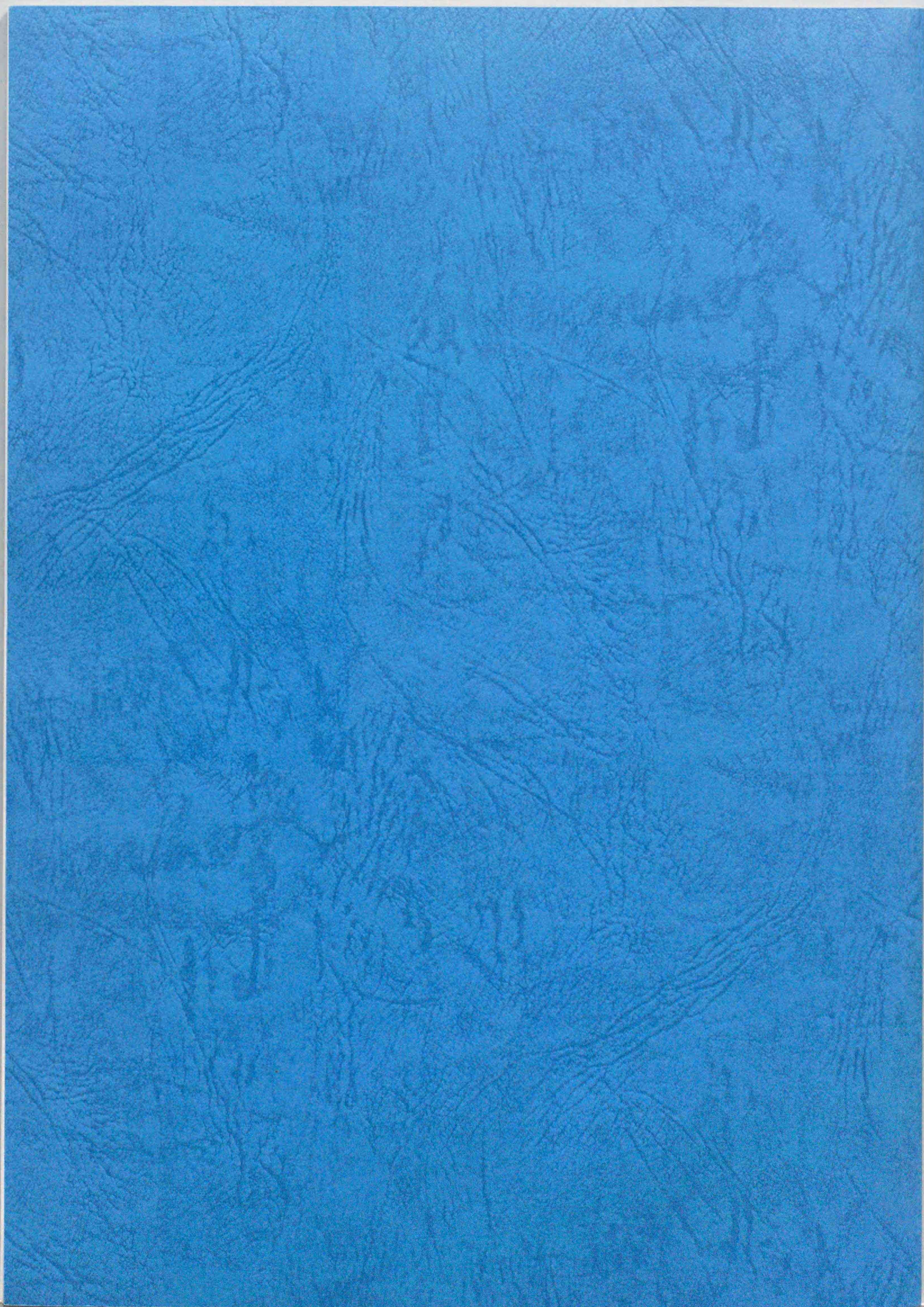
2. Vitrification of IVMFC bovine blastocysts using ethylene glycol and sucrose

Four experiments were conducted to develop a simple and efficient vitrification method and an in-straw dilution method after vitrification for IVMFC bovine blastocysts. In Exp. 1, blastocysts were equilibrated in 10% (v/v) glycerol and 20% calf serum (CS) in modified phosphate buffered saline (mPBS) for 5 min, and exposed to a vitrification solution (20% CS in mPBS + 1M sucrose) containing 30% glycerol or 30% ethylene glycol. The embryos were then diluted out of the cryoprotectants, and cultured for 24 h. The survival rates for the blastocysts exposed to glycerol or to ethylene glycol were 87 and 100%, respectively. Blastocysts equilibrated as described above were vitrified in LN₂, warmed and cultured for 24 h. High survival rates were obtained from both treatments (70% by glycerol, 73% by ethylene glycol). In Exp. 2, blastocysts were vitrified by 30% ethylene glycol + 1M sucrose solution as described above. After warming, blastocysts were exposed to diluents containing 0.5M sucrose and 20% CS in mPBS supplemented with either 0, 5, 10, 15 or 20% egg yolk. The highest survival rate (97%) was obtained when the diluent contained 10 or 15% egg yolk. In Exp. 3, blastocysts were equilibrated in mPBS containing 10% glycerol and 20% CS (5 min), exposed to VS (30% ethylene glycol, 1M sucrose and 20% CS in mPBS), and then loaded into a straw by one of three methods. In group 1, blastocysts were aspirated with 25 μ l of VS into a straw. In group 2, 25 μ l of VS containing a blastocyst was aspirated into the bottom of a straw and 150 μ l of diluent (10% egg yolk, 0.5M sucrose and 20% CS in mPBS) was injected onto the VS column without air partition. In group 3, blastocysts were introduced to the VS column (25 μ l) which had been loaded under a column of 150 μ l of diluent (10% egg yolk, 0.5M sucrose and 20% CS in mPBS). All straws were then sealed, plunged into LN₂ and

stored for 3 to 5 days. After warming, VS and diluent were mixed in the straw for 30 sec, the blastocysts were then washed and cultured for 24 h. The highest survival rate (93%) was obtained in Group 3. In Exp. 4, 20 vitrified-warmed and in-straw diluted blastocysts were transferred to 20 recipients. Eleven of them became pregnant and 9 normal calves were obtained.

These results demonstrate for the first time that by modification of the vitrification procedure of *in vivo* derived bovine embryos, IVMFC bovine blastocysts can be successfully cryopreserved.

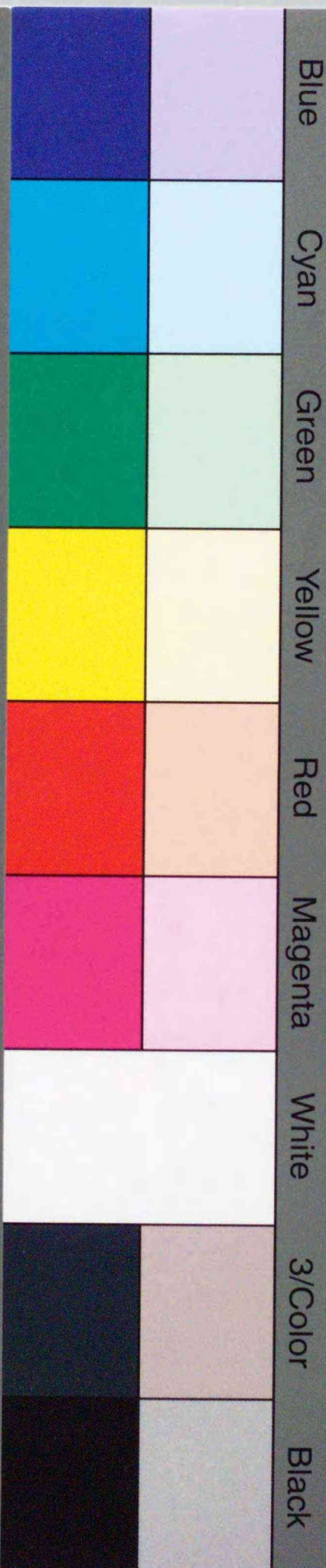
To achieve high survival rates of blastocysts, both the cells and their extracellular environment must be completely vitrified, and ultrastructural damage to the cell membrane must be minimized. The method developed in this study for in-straw dilution of vitrified blastocysts is simple and efficient. Consequently, vitrification of bovine blastocysts has great practical and commercial application.



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

