

ストロー内液層の長さが 凍結融解後の媒液の浸透圧に及ぼす影響 (予報)

○富樫 伶・牧野 綾音・黒澤 恵梨・西井 里衣・
宮田 佳苗・山口 誠司・小山 久一・堂地 修
(酪農学園大学)

諸言

哺乳動物胚の凍結保存に関する研究は1970年代に飛躍的に進歩し、今日までに実験動物、家畜のみならずヒトの胚でも成功例が報告されている^{1,3)}。

平成19年度農林水産省生産局の調査では新鮮胚移植の受胎率が52%、凍結胚移植が46%で、過去10年以上横ばい状態が続いており、受胎率向上は胚移植技術の普及において大きな課題となっている。特に、凍結胚の受胎率向上はわが国にとって重要な課題である。

ウシ胚の凍結保存技術の開発は、移植現場でより簡単に移植できるように簡易化に重点をおいて行われてきた^{4,10)}。近年は凍結融解後、耐凍剤を希釈除去することなく胚を移植できる直接移植法が多く用いられるようになった^{7,10)}。

ウシ胚を凍結保存する場合、その手法によってストロー内凍結媒液の液層構成は異なり、胚が収納される液層の長さも異なる。著者らの知る限り、胚を収納する液層の長さが凍結融解後の生存性に影響については十分に検討されていない。

本研究では、ストロー内の胚を収納する液層の長さが凍結融解後の胚の生存性に与える影響について検討するための一つの実験として、液層の長さが凍結融解後の凍結媒液の浸透圧に及ぼす影響を検討した。

材料および方法

1. 凍結媒液

本研究では1.5 M エチレングリコール (EG、和光純薬)、1.5 M EG+0.1 M ショ糖 (Suc、和光純薬)、1.4 M グリセリン (Gly、和光純薬)、1.4 M Gly+0.1 M ショ糖の4種類の凍結媒液を用いた。凍結媒液は、修正ダルベッコリン酸緩衝液 (PBS) を基本液として調製した。

2. ストローの作製

ストローは図1に示すように、0.25 mlプラスチックストロー (IMV、フランス) を用いて、液層部分の長さが2、3、5および7 cmのストローをそれぞれの凍結媒液ごとに作製した。まず凍結媒液を2 cm 吸引し、次いで1 cmの空気層を作り、さらに凍結媒液を吸引して2、3、5および7 cmの液層を作り、ストローの末端を熱シーラーで閉封した。ストローは、それぞれの長さ別に5本作製した。後述する浸透圧測定は5回反復して実施したため、凍結媒液別および液層の長さ別に各25本作製した。

3. 凍結方法

ストローは-7℃に設定したプログラムフリーザー (ET-UM、フジヤ矢野科学) のエタノール槽に浸漬し、45秒後に予め液体窒素で冷却したピンセットでストローを挟み植氷し同温度で15分間保持した。次いで-7℃から-30℃まで毎分0.3℃で冷却したのち、液体窒素に投入して凍結した。

4. 浸透圧測定法

浸透圧測定には、浸透圧測定器（ウエスコー MODEL 5100）を用いた。この浸透圧測定器の最大測定値は、2000 mOsm/kg であるため、測定用サンプルは超純水で2倍に希釈して用いた。浸透圧測定用のサンプル溶液は液体窒素からストローを取り出し、凍結した状態で液層の末端から5 mmの位置をストローカッターで切断し（図1）、融解後、マイクロピペットを用い5 μ lの凍結媒液を採取した。採取した凍結媒液5 μ lを1 mlチューブに移し、超純水5 μ lを加え希釈、浸透圧測定用サンプルとした。

なお、対照区として2倍希釈した凍結媒液（凍結なし）の浸透圧測定も行なった。

5. 統計分析

各媒液の浸透圧測定結果は、対立のある2群の差の検定を用いてt検定で統計処理を行った。

結果

各凍結媒液の浸透圧の測定結果は、図2~5に示した。いずれの凍結媒液においても同一の結果が得られた。すなわち、液層の長さ7 cmの場合、他の長さの液層に比べて浸透圧が有意に高かった ($P < 0.01$)。2、3および5 cm相互の間には差が認められなかったが、凍結前の4種類の凍結媒液を2倍に希釈して浸透圧を測定した結果（図6）、Gly (702.2 mOsm/kg) が最も低く、ついでEG (817.8 mOsm/kg)、Gly+Suc (985 mOsm/kg)、EG+Suc (855.4 mOsm/kg) の順に高く、いずれの間においても有意差 ($P < 0.01$) が認められた。

考察

本研究の結果から、ストロー内の液層の長さは、凍結融解後の凍結媒液の浸透圧に影響することが示された。液層の長さが7 cmの場合の浸透圧は、他の長さに比べて有意に高かった。しかし、2、3および5 cmの間には浸透圧の差は認められなかった。このことから、液層の長さが7 cm以上になると凍結融解後の凍結媒液の浸透

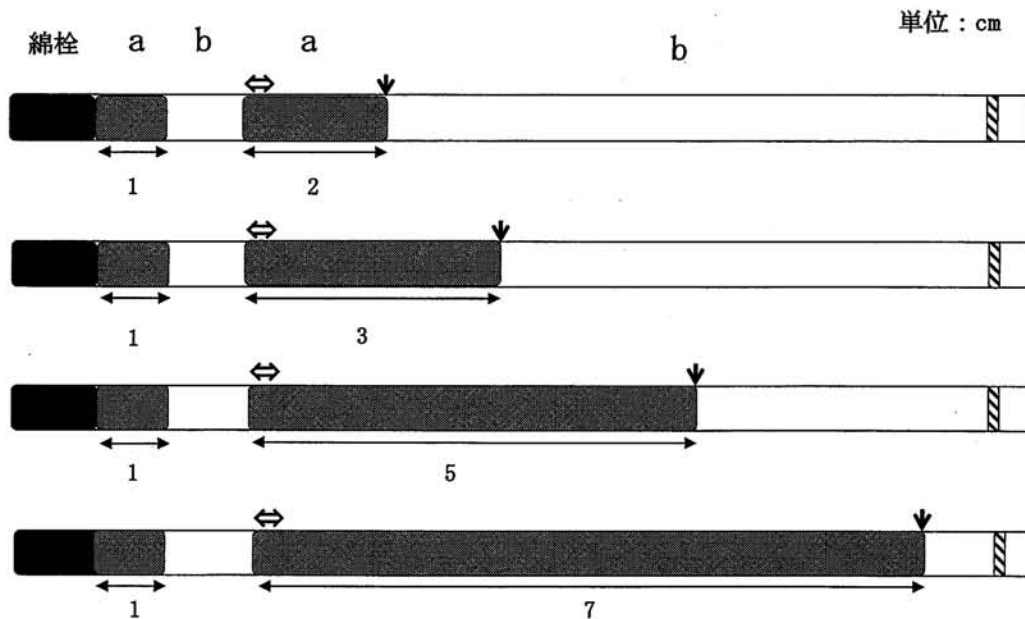


図1. 浸透圧測定に用いたストロー内の構成

- a: 1.4 M グリセリン
- 1.4 M グリセリン+0.1 M ショ糖
- 1.5 M エチレングリコール
- 1.5 M エチレングリコール+0.1 M ショ糖
- b: 空気層
- ↓: 植氷位置
- ⇔: ストローカッターで5 mm カット部位

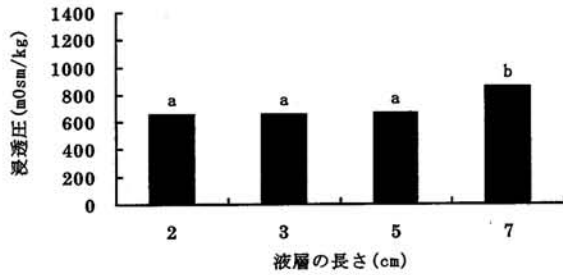


図2. 1.4 M グリセリンを用いた場合のストロー内液層の長さが凍結媒液の凍結融解後の浸透圧に与える影響
a. b: 異符号間に有意差あり ($p < 0.01$)

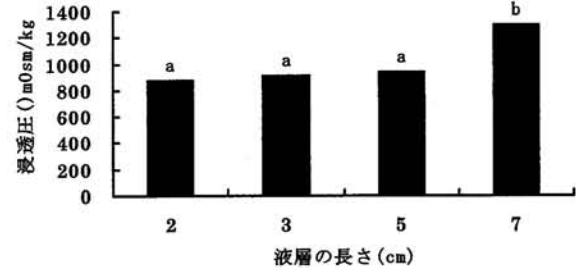


図3. 1.4 M Gly+0.1 M Suc を用いた場合のストロー内液層の長さが凍結媒液の凍結融解後の浸透圧に与える影響
a. b: 異符号間に有意差あり ($p < 0.01$)

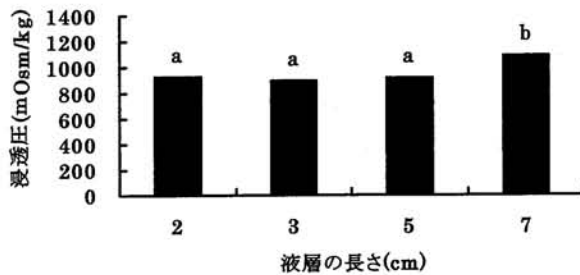


図4. 1.5 M EG を用いた場合のストロー内液層の長さが凍結媒液の凍結融解後の浸透圧に与える影響
a. b: 異符号間に有意差あり ($p < 0.01$)

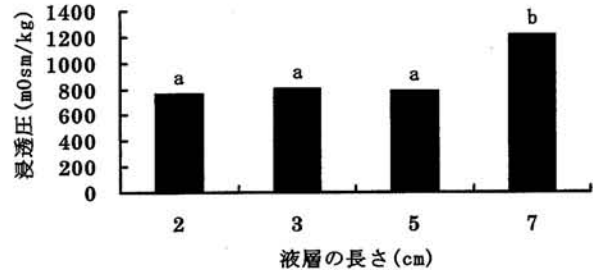


図5. 1.5 M EG+0.1 M Suc を用いた場合のストロー内液層の長さが凍結媒液の凍結融解後の浸透圧に与える影響
a. b: 異符号間に有意差あり ($p < 0.01$)

圧は高くなると考えられた。その理由として、ストロー内の液層の長さが極端に長いと、氷晶形成と伴う凍結媒液中の液層濃度が次第に高くなると考えられる。

本研究では、浸透圧を測定した液層に隣接する液層に強制植水を施し、浸透圧測定に用いた凍結媒液は、液層の空気層に近い末端部から採取した。すなわち、氷晶の成長が最後に到達する部分の凍結媒液を用いたことになる。アルコール液槽式のプログラムフリーザーを用いて胚を凍結する場合、ストローはアルコール液層中に水平または垂直に置かれた状態で冷却され、胚は液層の中央に位置するようにする。しかし、植水操作中にストローを垂直に立てると胚は降下し空気層の上面に位置する可能性がある。ストローを垂直に立てて冷却する方式のプログラムフリーザーを用いる場合、胚は常に液層の最下部に移動すると考えられる。

胚が液層の最下部に移動する場合、植水後の氷晶は液層上部から最下部に向かって成長することになる。このような場合、胚を収納する液層が長ければ、胚は冷却時および融解直後はより高い浸透圧環境に曝されることになる。

本研究の結果から胚を収容する液層が7 cm 以上になれば、冷却中および融解直後の液層下部の浸透圧は上昇すると考えられる。このような高い浸透圧環境が胚の生存性に与える影響については、今後、実際に胚を用いて詳細に検討する必要がある。また、ウシ胚を凍結する際のストロー内の胚を収納する液層の長さについて詳細に検討する必要がある。

要約

本研究では、胚を収容する液層の長さが凍結融解後の凍結媒液の浸透圧に与える影響について検討した。実験には、1.5 M エチレングリコール (EG)、1.5 M EG+0.1 M ショ糖 (Suc)、1.4 M グリセリン (Gly)、1.4 M Gly + 0.1 M Suc の4種類の凍結媒液を用い、液層の長さを2、3、5および7 cm の4段階とした。浸透圧は、凍結融解後の凍結媒液を2倍希釈して測定した。0.25 ml プラスチックストローを使用し、4段階に分けた液層ごとにストローを用意した。測定結果では、Gly (702.2 mOsm/kg) が最も低く、ついでEG (817.8 mOsm/kg)、

Gly+Suc (985 mOsm/kg)、EG+Suc (855.4 mOsm/kg) の順に高く、いずれの間にも有意差 ($P<0.01$) が認められた。全ての媒液において液層の長さ 7 cm が有意に高く ($P<0.01$)、液層の長さ 2、3 および 5 cm の各媒液間に顕著な差は認められなかった。また、Suc を含む媒液を用いると浸透圧の値が高くなり、その中でも液層部位 2、3 および 5 cm に比べ、7 cm において有意に高くなることが認められた。

以上の結果から、Gly+PBS、Gly+Suc、EG+Suc、EG+PBS の 4 種類の凍結媒液において、胚を収納する液層の長さが 7 cm 以上の場合は、融解後の胚生存率に影響する可能性が示唆された。

引用文献

1. Niemann H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. *Theriogenology* 1991; 35: 109-124.
2. Fahning MI, Garcia MA. Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. *Cryobiology* 1992; 29: 1-18.
3. Palasz AT, Mapletoft RJ. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnol Adv* 1996; 14: 127-149.
4. Niemann H, Sacher B, Schilling E, Smidt D. Improvement of survival rates of bovine blastocytes with sucrose for glycerol dilution after a fast freezing and thawing method. *Theriogenology* 1982; 17: 102 (Abstract).
5. Renard JP, Heyman Y, Ozil JP. Congelation de l'embryon bovin: une nouvelle méthode de décongélation pure le transfert cervical des embryons conditionnés une seule fois en paillettes. *Am Met Vet* 1982; 126: 23-32.
6. Leibo SP. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 1984; 21: 767-790.
7. Massip A, Van der Zwalmen P. Direct transfer of frozen cow embryos in glycerol-sucrose. *Vet Rec* 1984; 115: 327-328.
8. Suzuki T, Yamamoto M, Ooe M, Sakata K, Matsuoka K, Nishikata Y, Okamoto K. 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-propandiol. *Theriogenology* 1990; 34: 1051-1057.
9. Voelkel SA, Hu YX. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 1992; 37: 23-39
10. Dochi O, Imai K, Takakura H. Birth of calves after direct transfer of thawed bovine embryos stored in ethylene glycol. *Anim Reprod Sci.* 1995; 38: 179-185.