

連載

第20回

牛胚のガラス化凍結保存

たかはし よしゆき

ジェネティクス北海道 顧問 **高橋 芳幸**

昭和50年 北海道大学大学院獣医学研究科修士課程修了、
農林省畜産局採用(農林技官)
昭和51年 農林省日高種畜牧場勤務
昭和58年 北海道大学獣医学部・助教授
昭和61年 獣医学博士(北海道大学)
平成10年 北海道大学大学院獣医学研究科・教授
平成24年 北海道大学特任教授、名誉教授
平成25年 現職

胚の凍結保存法には、一般的な緩慢冷却による凍結保存法(第14回参照)だけでなく、ガラス化凍結保存法もあります。ガラス化保存法では高濃度の凍害防止剤を使用するため、凍結保存胚は移植する前に凍害防止剤を希釈除去する必要があります。しかし、ダイレクト移植が可能な器具を開発、ガラス化保存体外受精胚を販売する県もありますので、ガラス化保存法について、緩慢冷却保存法と比較しながら、その原理を概説します。

1. 緩慢冷却保存法による胚の凍結保存

下の枠内に一般的な緩慢冷却保存法における器材、冷却・融解・移植の要点、**図1**には緩慢冷却保存法の手順と各ステップにおける細胞内外の変化を示した。

保存液: **凍害防止剤**

8.3% エチレングリコール ± 0.1 M スクロース

10% グリセリン + 0.25 M スクロース

平衡処理: 10~15分

胚収納容器: 0.25ml ストロー

冷却: プログラム・フリーザー

緩慢冷却: **-5℃ → -30℃ (8.3%エチレングリコール)**

-7℃ → -25℃ (10%グリセリン + スクロース)

-0.3~-0.5℃/分 (冷却時間: 60~90分)

融解・移植: ストローを空气中10秒保持後、温水浸漬融解

→ **ダイレクト移植**

胚の平衡処理: 25℃前後の室温で、胚を凍結保存液の中に移すと、凍害防止剤が細胞内へ透過して、10~15分程度で細胞内外の浸透圧がほぼ等しくなる(平衡)。

ストロー封入と冷却: 胚を保存液とともにストロー内に収納し、-5℃~-7℃に設定されたプログラム・フリーザーに移して冷却する。

植氷: 液体窒素で冷却した鉗子でストローを摘み氷晶を作ると、保存液は氷晶の形成により濃縮するため、細胞は水分が流出して脱水される。

緩慢冷却: 10分程度保持した後、特定の温度(-25℃、-30℃前後)まで、ゆっくり冷却すると細胞の周りの氷晶が成長増加して保存液はさらに濃縮するため、細胞の脱水が進み、細胞内外の凍害防止剤の濃度も高まる。

急速冷却・凍結: 特定の温度まで冷却したストローを液体窒素中に移して急速に冷却すると、細胞内と細胞周辺がガラス化(結晶のない固体に変化)して、胚は大きな傷害を受けない。

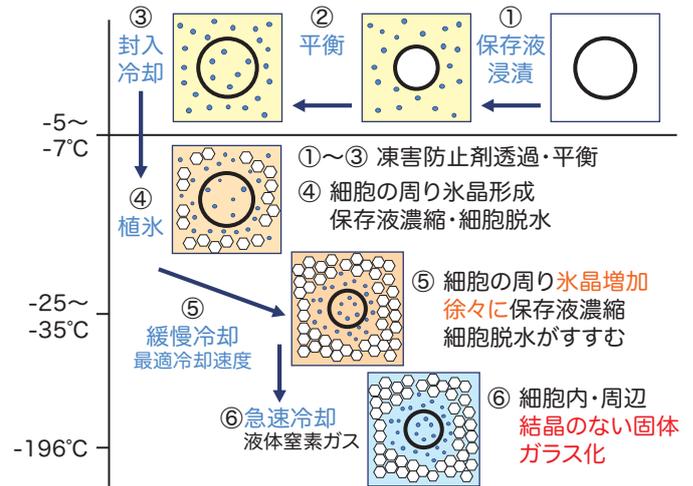


図1: 緩慢冷却法による胚の凍結保存の手順と原理

2. ガラス化保存法による胚の凍結保存

下の枠内に、近年のガラス化保存法で使用されている器材、冷却、融解・移植の要点をまとめた。平衡液とガラス化液を用い、ガラス化液には緩慢冷却保存法の凍結保存液に比べ3~4倍濃度の凍害防止剤が添加されている。

平衡液: **15~20% 細胞膜透過型・凍害防止剤**

7.5~10% エチレングリコール

+7.5~10% ジメチルスルホキシド(DMSO)

平衡処理時間: 3~15分

ガラス化液: **30~40% 細胞膜透過型 + 0.5 M スクロース**

15~20% エチレングリコール

+15~20% ジメチルスルホキシド(DMSO)

+0.5 M スクロース

ガラス化液浸漬時間: 30~60秒

容器・器具: 極細ストロー・チップ、クライオトップなど

冷却: **滅菌液体窒素中に浸漬**

加温融解: 温めた融解液(スクロース含有)に器具を浸漬

移植: 胚を希釈液に移して凍害防止剤を希釈除去後に移植

※融解希釈液を入れたストロー内に器具を浸け

加温融解

→ **ダイレクト移植**

図2には、ガラス化保存法の手順と各ステップにおける細胞内外の変化を示した。

胚の平衡処理: 25℃前後の室温で、胚を平衡液の中に移し、3~15分放置して凍害防止剤の細胞内への透過と平衡を図る。

胚のガラス化液への浸漬:高濃度の凍害防止剤とスクロースを添加したガラス化液に胚を移すと、細胞は水が流出して脱水、細胞内の凍害防止剤の濃度が高まる。

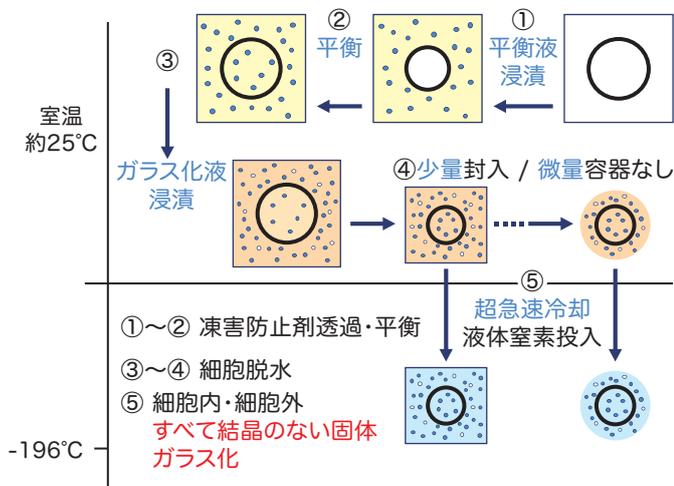


図2:ガラス化保存法による胚の凍結保存の手順と原理

胚の急速冷却:胚を極細容器に少量のガラス化液とともに収納、あるいは胚を微量のガラス化液とともに特殊なフィルムの上に乗せ、液体窒素の中に漬けて急速に冷却する(図3)。

このように急速冷却すると、細胞内も細胞の周りも、すべてガラス化、結晶のない固体に変化する。なお、胚は長時間ガラス化液に浸けると傷害を受けるので、胚をガラス化液に移してから30~60秒後に液体窒素に漬ける技術・スキルが求められる。

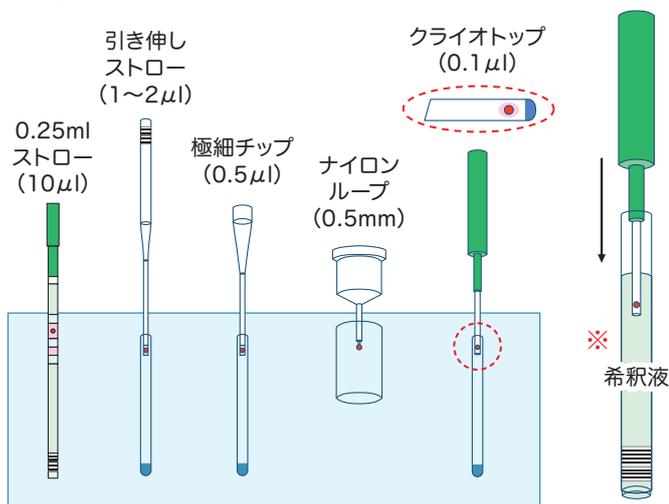


図3:ガラス化凍結保存に使用する代表的な器具の例
※ダイレクト移植用の希釈液を満たしたストロー

3.ガラス化凍結保存胚の受胎成績

平衡液・ガラス化液の組成と平衡液・ガラス化液への浸漬時間は様々で、種々の容器・器具が使用されている。また、緩慢冷却保存胚とガラス化保存胚の受胎成績を多数の移植例で比較検討した報告は少ない。

体内胚:通常、過剰排卵処理ドナー牛から回収した多数の

胚を処理するため、ガラス化保存した体内胚の移植報告は少ない(図4)。性別検査をした体内胚を異なるガラス化保存法・緩慢冷却保存法で凍結して多数例移植した報告も少ないが、低品質の胚や細胞を切取った胚にはガラス化法が有効かも知れない(図5)。

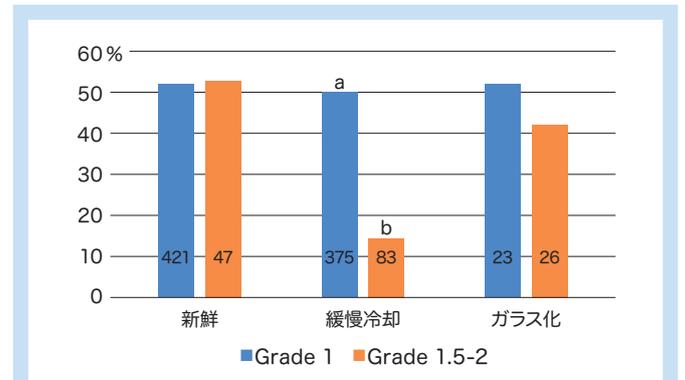


図4:ドナー牛から回収した体内胚の受胎成績
緩慢冷却保存胚はダイレクト移植、ガラス化保存胚は凍害防止剤を希釈除去後に移植(多治見ら, 2018)

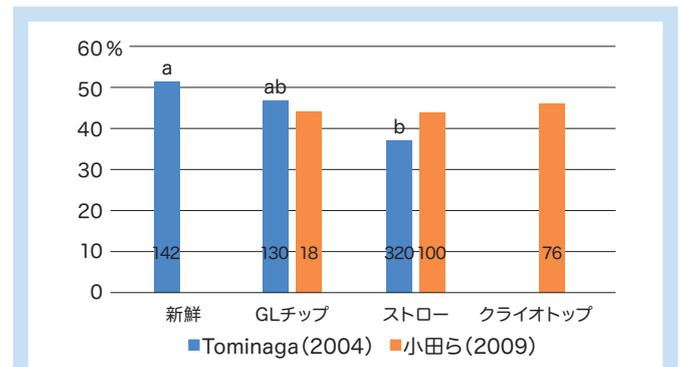


図5:性別検査・ガラス化保存体内胚の受胎成績
ガラス化保存胚は凍害防止剤希釈除去後に移植

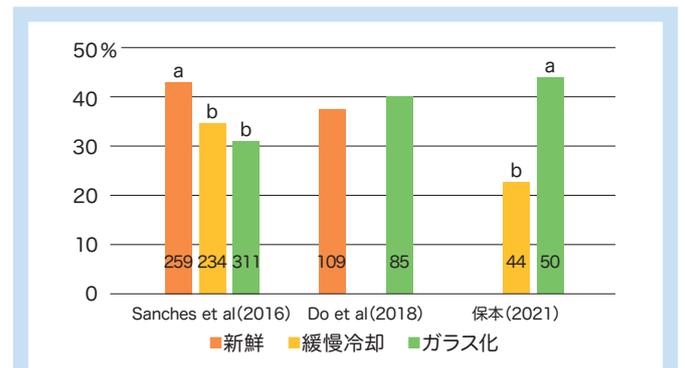


図6:ガラス化保存・体外生産胚の受胎成績
ガラス化保存胚は保本(2021)のみダイレクト移植

体外受精胚:体外受精胚の受胎率は体内胚に比べて低いので、そのガラス化凍結保存の報告は多数みられる。しかし、緩慢冷却保存法とガラス化保存法で凍結保存した多数の体外受精胚を移植した報告は限られる(図6)。ガラス化保存法の優位性・有効性は、体外受精胚の作出方法の違いに左右される可能性が高いので、卵子の成熟・受精・発生培養法の改善が望まれている。