

## ガラス化保存したウシ体外成熟卵母細胞の卵丘細胞付着の有無が体外受精後の胚発生に及ぼす影響

山田 彰司 安部 茂樹 長谷川 清寿 佐々木 恵美

要約 本試験では体外成熟卵母細胞をガラス化保存した場合、保存時の卵丘細胞の存在が、ガラス化融解後の体外受精、体外発生に及ぼす影響について調べた。卵母細胞は、食肉処理場由来の卵巣から採取し、緊密な卵丘細胞が付着したものを選別し、成熟培養に供試した。成熟培養18時間後の卵母細胞は、卵丘細胞の付着或いはガラス化処理の有無で4区に分けた。すなわち、成熟培養18時間後、0.1%ヒアルロニダーゼ添加M2液中でピペティングにより卵母細胞周囲の卵丘細胞を完全に取り除き、裸化処理しガラス化保存した区(区)、区と同様の処理を行い卵母細胞周囲の卵丘細胞が4~5層付着した状態にし、ガラス化保存した区(区)、成熟培養18時間後に区と同様の処理を行い裸化卵母細胞とし、成熟培養を2時間継続した区(区)および成熟培養18時間実施し区と同様の処理を行い、卵母細胞周囲の卵丘細胞が4~5層付着した状態で成熟培養を2時間継続した区(区)とした。卵母細胞のガラス化保存および融解はPapisら<sup>18)</sup>の方法に準拠した。体外受精および発生培養は既報<sup>1)</sup>に従い実施し、体外受精9~10時間後に卵子の一部を抜き取り精子の進入状況を調べ、また、体外受精後10日目までに発生した胚盤胞期胚の発生率を比較した。

単精子受精率は、および区では、48.8% (21/43) および50.0% (23/46) であり、区の72.5% (37/51) と比べ有意に低率 ( $P<0.05$ ) であった。一方、区の未受精卵率は21.7% (10/46) であり、および区の2.0% (1/51) および8.0% (4/50) と比べ有意に高率 ( $P<0.01$ ) であった。

媒精72時間後の2細胞以上への卵割率は、区の値66.7% (94/141) は区の値85.1% (177/208) に比べ有意に低率 ( $P<0.05$ ) であった。

媒精後7~10日目の胚盤胞への発生率は、区で19.9% (42/211)、区で18.4% (26/141)、区で38.0% (79/208) および区で46.4% (71/153) であり、および区の発生率はおよび区の発生率と比べ有意に低率 ( $P<0.05$ ) であった。

以上の結果から、体外成熟卵母細胞のガラス化保存には、卵丘細胞の付着の有無により影響が認められないが、ガラス化保存した卵母細胞の体外受精後の胚盤胞期胚への発生率が新鮮卵母細胞を用いた場合の発生率と比べ低率であったことから、ガラス化保存した卵母細胞は、体外受精あるいは受精後の胚発生に少なからずガラス化の影響を受けると考えられた。

キーワード：ガラス化保存 ウシ卵母細胞 卵丘細胞 体外受精

近年、ウシの体外受精技術の急速な進展に伴い、卵巣から採取した卵母細胞を効率的に子牛まで発生させることが可能となった。この体外受精技術を、長期保存した卵母細胞に利用し、子牛生産ができれば、雌側の特定系統の維持、優良遺伝資源の保存が可能となる。

ウシにおける卵母細胞の凍結保存は、緩慢冷却法で保存後の体外成熟卵子から産子が得られた<sup>6, 8, 16)</sup>ことによりその可能性が示されたが、卵母細胞は低温障害により、凍結融解後の生存および体外受精後の胚発生が著しく低率である<sup>5, 13, 16, 17)</sup>と報告された。その後、この卵母細胞の低温障害を回避するために、高濃度の耐凍剤溶液を用いたガラス化保存法が用いられ、未受精卵子の生存性が緩慢凍結法に比較し改

善された事例<sup>7, 9, 19)</sup>が報告されている。ガラス化保存法は、冷却時および融解加温時に細胞内外に形成される氷晶を完全に抑制し、低温障害が発生する温度域を急速に通過させることが可能なことから、卵母細胞、初期胚などの長期保存法として利用できることが示されている。

しかし、ガラス化保存法は、ガラス化溶液濃度が緩慢凍結法に比べ著しく高く、その化学的毒性が大きな障害となることや、ガラス化溶液への浸漬・除去時に生じる急激な浸透圧差による物理的障害等があげられ、卵母細胞をガラス化保存する場合、卵丘細胞付着の有無など、わずかな条件の違いがガラス化溶液の浸透などに微妙に影響し、ガラス化保存後の卵母細胞の生存性に大きく影響を及ぼすことが

考えられる。

そこで本試験では、Papisら<sup>18)</sup>の方法により体外成熟卵子をガラス化保存した場合、保存時の卵丘細胞の存在が、ガラス化融解後の体外受精、体外発生に及ぼす影響について調べた。

#### 材料および方法

卵母細胞の体外成熟、ガラス化保存および高温融解

卵母細胞の体外成熟は既報<sup>1)</sup>に準拠し実施した。食肉処理場で採取した卵巣は20℃に保温したリン酸緩衝食塩水 (PBS) 中に入れ輸送した。卵母細胞は、卵巣表面の2～5mmの小卵胞から採取し、緊密な卵丘細胞が付着したものを選別し、成熟培養に供した。成熟培養は25mMHEPES緩衝TCM-199に5%の子牛血清 (CS) と抗生物質を添加した成熟培地に卵母細胞を導入し5%CO<sub>2</sub>、95%空気38.5℃条件下で行った。成熟培養18時間後の卵母細胞を卵丘細胞の付着あるいはガラス化処理の有無で4区に分けた。すなわち、成熟培養18時間後、0.1%ヒアルロニダーゼ添加M2液中でピペティングにより卵母細胞周囲の卵丘細胞を完全に除去し、裸化処理してガラス化保存した区 (A区)、B区と同様の処理を行い卵母細胞周囲の卵丘細胞が4～5層付着した状態にしてガラス化保存した区 (C区)、成熟培養18時間後にB区と同様の処理を行い、裸化卵母細胞とし成熟培養を2時間継続した区 (D区) ならびに成熟培養18時間実施しA区と同様の処理を行い、卵母細胞周囲の卵丘細胞が4～5層付着した状態とし成熟培養を2時間継続した区 (E区) とした。

卵母細胞のガラス化保存および高温融解はPapisら<sup>18)</sup>の方法に準拠した。ガラス化は20%CSを加えたTCM-199aを基礎培液とし、これに3%エチレングリコール (EG) を添加した前平衡液で10分間の平衡後、基礎培液に30%EGおよび1Mシュークロースを加えたガラス化液 (VS13) 中に移し、30秒後に供試卵母細胞を含むガラス化微小滴を液体窒素中に直接滴下した。融解は37℃に加温した基礎培液に0.3Mシュークロースを加えた溶液中に供試卵母細胞を含むガラス化微小滴を直接投入し3分間静置後、さらに基礎培液中で5分間培養して行なった。

ガラス化保存・高温融解したAおよびB区の卵母細胞は成熟培養液中で2時間培養し、体外成熟時間を20時間とし、C区およびD区とともに体外受精に供試した。

精子処理および体外受精

精子は1頭の黒毛和種の凍結精液を用いた。凍結

精液は35℃の温湯中で融解後、ウシアルブミン無添加修正タイロード液<sup>3)</sup> (BO液) に10mMカフェイン (Caffeine-Na-benzoate, C-4144;Sigma) を添加した液 (Caf-BO液) で2回遠心洗浄 (500×g、5分) した。洗浄精子は、精子濃度をCaf-BO液で2.0×10<sup>7</sup>精子/mlに調整し、これを精子懸濁液とした。次いで、精子懸濁液はウシ血清アルブミンを20mg/mlおよびヘパリン (ノボインダストリーA/S) を10μg/ml添加した修正タイロード液 (BSA-BO液) で等量希釈した後、流動パラフィン下で100μl小滴にし、受精培地とした。

体外受精は、成熟培養20時間後の卵子を受精培地に導入し、39℃、5%炭酸ガス、95%空気の条件下で6時間培養した。

発生培養および検査

卵子は、媒精6時間後に発生培養液中に移した。体外発生培養は、媒精終了から72時間まで38.5℃、5%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>、90%N<sub>2</sub>の気相条件下でCR1aa液で培養した。72時間後からは、38.5℃、5%CO<sub>2</sub>、95%空気の気相条件下で5%CSを添加したCR1aa液で7日間発生培養を行い、媒精後10日目までに発生した胚盤胞期胚の発生率を比較した。

卵子の一部を体外受精9～10時間後に抜き取り、ホルマウント標本を作成後、酢酸オルセインで染色し、位相差顕微鏡で精子の侵入状況を調べた。

卵割検査は、媒精72時間後に行い、2～4、5～7および8細胞以上に区分した。

胚盤胞発生検査は媒精後8日目から10日目まで24時間間隔で行い、この期間に発生した胚盤胞の発生率を調べた。

受精率、卵割率および胚への発生率の有意差検定は、χ<sup>2</sup>検定を用いた。

#### 成 績

媒精9～10時間後の受精率については表1に示した。各試験区の単精子受精率は、AおよびB区では、48.8% (21/43) および50.0% (23/46) であり、C区の72.5% (37/51) と比べ有意に低率 (P<0.05) であった。一方、D区の未受精卵率は21.7% (10/46) であり、AおよびB区の2.0% (1/51) および8.0% (4/50) と比べ有意に高率 (P<0.01) であった。

媒精72時間後の2細胞以上への卵割率および胚への発生率については表2に示した。各試験区での卵割率は、66.7%～85.1%であり、C区の値66.7% (94/141) はA区85.1% (177/208) に比べ有意

に低率 ( $P < 0.05$ ) であった。

媒精後 7 ~ 10日目の胚盤胞期胚発生率は、区で 19.9% (42 / 211)、区で 18.4% (26 / 141)、区で 38.0% (79 / 208) および区で 46.4% (71 / 153) であり、および区の発生率はおよび区の発生率と比べ有意に低率 ( $P < 0.05$ ) であり、区の発生率は区のそれに比べ明らかに低率 ( $P < 0.01$ ) であった。

表 1 ガラス化保存した卵母細胞への卵丘細胞付着の有無が体外受精に及ぼす影響

区 分	供試数	単精子受精数 (%)	多精子受精数 (%)	未受精数 (%)
I	43	21 (48.8) <sup>b</sup>	17 (39.6)	5 (11.6)
II	46	23 (50.0) <sup>b</sup>	13 (28.3)	10 (21.7) <sup>y</sup>
III	51	37 (72.5) <sup>a</sup>	13 (25.5)	1 (2.0) <sup>x</sup>
IV	50	32 (64.0)	14 (28.0)	4 (8.0) <sup>x</sup>

異符号間に有意差: a, b ( $p < 0.05$ ) x, y ( $p < 0.01$ ).

表 2 ガラス化保存した卵母細胞への卵丘細胞付着の有無が体外受精後の胚発生に及ぼす影響

区 分	供試数	卵割胚数 (%)	胚盤胞期胚発生数 (%)
I	211	153 (72.5) <sup>y</sup>	42 (19.9) <sup>y</sup>
II	141	94 (66.7) <sup>y</sup>	26 (18.4) <sup>y</sup>
III	208	177 (85.1) <sup>x</sup>	79 (38.0) <sup>x</sup>
IV	153	129 (84.3) <sup>x</sup>	71 (46.4) <sup>x</sup>

異符号間に有意差: x, y ( $p < 0.01$ ).

## 考 察

体外成熟18時間後に卵丘細胞を除去あるいは付着させた状態でガラス化保存し、高温融解後 2 時間の追加成熟培養を実施した卵母細胞を用い、体外受精、体外発生培養を行いその卵割率および胚盤胞期胚への発生率について調べた。ガラス化保存の卵母細胞は、卵丘細胞の付着の有無にかかわらず体外受精後の胚盤胞期胚への発生率は 18.4% ~ 19.9% であり、ガラス化保存しない卵母細胞の発生率 38.0% ~ 46.4% と比べ低率であった。Martinoら<sup>14)</sup> は、成熟培養後の卵丘卵母細胞複合体をマイクログリッド上に置き、極微量のガラス化液とともに液体室素中に投入することでガラス化保存し、このガラス化保存卵母細胞を加温融解後に体外受精・卵管上皮細胞との共培養系を用い体外発生培養を行ったところ、胚盤胞期胚の発生率は、15% (新鮮対照群の発生率 36%)

であったと報告している。また、Vajtaら<sup>22)</sup> は内径 800  $\mu\text{m}$  厚さが 70  $\mu\text{m}$  のストローに 1.0 ~ 1.5  $\mu\text{l}$  のガラス化液とともに成熟卵母細胞を入れ、両端を封印しないで直接液体室素内に投入することでガラス化保存し、体外受精によって 25% (新鮮対照群の発生率 52%) の胚盤胞期胚の発生率を得たと報告している。さらに、Papisら<sup>18)</sup> は成熟卵母細胞を約 6  $\mu\text{l}$  のガラス化液とともに液体室素中に直接滴下することでガラス化保存し、体外受精後の胚盤胞期胚発生率は 30% (新鮮対照群の発生率 42%) であったと報告している。これらの報告では、ガラス化に用いた卵母細胞は、体外成熟後の卵丘細胞が付着した状態で供試されており、本試験のガラス化保存体外成熟卵母細胞を用いた体外受精後による胚盤胞期胚の発生率は、卵丘細胞の付着の有無にかかわらずこれらの報告とほぼ同様の値を示した。このことから、体外成熟後に卵母細胞をガラス化保存する場合には、卵丘細胞の付着が体外受精後の胚盤胞期胚への発生率に影響を及ぼさないことが明らかとなった。しかし、本試験を含め前述の報告における胚盤胞期胚の発生率は、何れもガラス化保存しない新鮮対照群の発生率の約半分であり、体外成熟した卵母細胞のガラス化保存の影響が少なからず存在することが考えられた。

卵母細胞の体外受精後の胚盤胞期胚への発生率が低率になる原因として、体外受精時の異常受精があげられている<sup>4)</sup>。本試験の受精検査においてもガラス化処理した卵母細胞においては、単精子受精の割合が未処理の卵母細胞の割合に比べ低率であり、ガラス化保存した裸化卵母細胞では多精子受精の割合がやや高率で、卵丘細胞の付着したガラス化保存卵母細胞では未受精の割合が明らかに高率であった。体外成熟卵母細胞は、受精中に表層顆粒から放出される物質により透明帯反応が誘導され、多数の精子侵入を防御する<sup>23)</sup> とされており、低温感作した体外成熟卵母細胞は、受精前の表層顆粒の放出を引き起こして透明帯を硬化させ受精率を低下させる、あるいは、受精中に表層顆粒の異常崩壊を誘起しやすく、この結果として容易に多精子侵入が認められるが、これは表層顆粒の配置の異常に起因する可能性がある<sup>10, 11)</sup> と報告されている。本試験のガラス化保存裸化卵母細胞でもやや高率な多精子侵入が認められ、卵丘細胞付着ガラス化保存で高率に未受精卵母細胞が認められたのは、ガラス化保存した卵母細胞においては、通常でも多精子受精が誘起され易いことに加え、低温感作により卵子内の構成成分になんらか

の変化が惹起された結果と思われる。

発生培養7～10日目の胚盤胞期胚発生率は、ガラス化保存した卵母細胞での発生率がガラス化しない卵母細胞の発生率と比べ低率であった。これは、低温感作したマウスおよびヒツジ卵子の卵割率および胚発生率が低率であったとする報告<sup>2, 12, 15)</sup>と一致した成績であった。マウスおよびヒツジにおいては、低温感作を受けた卵母細胞は、染色体の凝集および多極紡錘体の形成などの染色体の形成異常、原形質内の小胞の出現などによる卵割異常の発生が認められている。本試験のガラス化保存した卵母細胞の体外受精後の胚盤胞期胚発生率においても同様な異常の存在が示唆された。

ガラス化保存法の問題点として、ガラス化溶液の濃度が6～8モルの高濃度であることから、その化学的毒性、ガラス化液への浸漬・除去時に生じる急激な浸透圧差による物理的障害などがあげられる。これらの問題点の解決策としては、細胞の容積の小さい発生が進んだ胚では、ガラス化溶液への浸漬方法で、細胞内に予め10～20%のガラス化溶液中に含まれる耐凍剤の溶液を浸透させる前平衡を行う方法<sup>24)</sup>、ガラス化液の除去で、段階的に低濃度の溶液に移す段階希釈法<sup>8)</sup>、或いは、希釈液にスクロースなどの糖類を添加する方法<sup>20)</sup>などでガラス化後の生存率が高率となったことが報告されている。しかし、体外成熟した卵母細胞でもこれらの方法が試されているが、高濃度のガラス化液に浸漬しただけで、体外受精後の雄性前核形成率が低下し、胚盤胞期胚への発生率も低下した<sup>21)</sup>とする報告があることから、卵母細胞の場合、体外受精後の胚発生率を高率にするための条件等は今後詳細に検討する必要があると思われる。

以上のことから、体外成熟卵母細胞のガラス化保存には、卵丘細胞の付着の有無により影響が認められないが、ガラス化保存した卵母細胞の体外受精後の胚盤胞期胚への発生率が18～20%で新鮮卵母細胞の胚盤胞期胚への発生率より低率であったことから、ガラス化保存した卵母細胞の体外受精あるいは受精後の胚発生には少なからずガラス化の影響を受けると考えられた。

## 参 考 文 献

- 1) 安部茂樹ら．日本畜産学会報，64：1-5．1993．
- 2) Baumgartner A.P. et al. Experimental Cell Research.132:359-366.1981.
- 3) Brackett B.G. et al. Biology and Reproduction, 12:260-274.1975.
- 4) Carroll J. et al. Journal of Reproduction and Fertility, 90:547-553.1990.
- 5) Dinnyes A. et al. Cryobiology, 31:569-570. 1994.
- 6) Fuku E. et al. Cryobiology, 29:485-492.1992.
- 7) Fuku E. et al. Cryobiology, 32:139-156.1995.
- 8) Hamano S. et al. Theriogenology, 38:1085-1090.1992.
- 9) Hochi S. et al. Theriogenology, 49:787-796. 1998.
- 10) Hytell P. et al. Journal of Reproduction and Fertility, 78:615-625.1986.
- 11) Hytell P. et al. Journal of Reproduction and Fertility suppl. 38:35-47.1989.
- 12) Karp L.E. et al. Gynecol Invest, 6:337-341. 1975.
- 13) Lim J.M. et al. Theriogenology, 37:351-361. 1992.
- 14) Martino A. et al. Biology and Reproduction, 54 :1059-1069.1996.
- 15) Moor R.M. et al. Journal of Reproduction and Fertility, 75:467-473.1985.
- 16) Otoi T. et al. Theriogenology, 40:801-807.1993.
- 17) Otoi T. et al. Journal of Reproduction and Development, 41: 361-366.1995.
- 18) Papis K. et al. Theriogenology, 51 (1): 173 (abst.).1999.
- 19) Rall W.F. et al. Nature, 313: 573-575.1985.
- 20) Tachikawa S. et al. Molecular Reproduction and Development, 34: 266-271.1993.
- 21) Ullah N. et al. Theriogenology, 47 (1): 375 (abst.).1997.
- 22) Vajta G. et al. Molecular Reproduction and Development, 51: 53-58.1998.
- 23) Walf P.P. pp183-197. Eds L.Mastroianni, Jr & J. D. Biggers. Plenum Press. New York.
- 24) Zhu S.E. et al. Journal of Reproduction and Fertility, 98:139-145.1993.