

ストロー内希釈液の違いが発生日齢および発育ステージの異なる
超急速ガラス化ウシ体外受精胚の生存性に及ぼす影響

○笠正二郎・森美幸・上田修二
(福岡農総試)

【目的】

我々はウシ体外受精胚を超急速ガラス化する際に20% グリセロール, 20% エチレングリコール (EG), 0.3M スクロース (Suc), 0.3M キシロースおよび3% ポリエチレングリコールを添加したガラス化液 (GESXP2020) を用いると, 高い生存性が得られることを報告した (第58回西日本畜産学会大会)。今回は発生日齢および発育ステージの異なる超急速ガラス化体外受精胚のストロー内の融解における希釈液が生存性に及ぼす影響を調査した。

【材料および方法】

体外受精後, 卵丘細胞と共培養した発生7日齢胚盤胞期胚の半数 (93 胚), 発生7日齢拡張胚盤胞期胚 (96 胚) および発生7日齢胚盤胞期胚の残り半数で, 発生8日齢において拡張胚盤胞期胚に発育した72 胚を2種の前平衡液に各5分間浸漬後, GESXP2020 に移してガラス化液とともに凍結用具に滴下し, 30秒間平衡後に凍結用具とともに液体窒素に投入して超急速ガラス化した。希釈液は0.5M Suc を添加した液 (希釈液1), 0.25M Suc および5% EG を添加した液 (希釈液2) および0.5M Suc および5% EG を添加した液 (希釈液3) を比較した。全ての希釈液にはリン酸緩衝液に20%の新生子牛血清を添加した。希釈液の浸透圧は希釈液1が885mOsmol, 希釈液2は1,550mOsmol および希釈液3は1,900mOsmol であった。凍結用具のストロー内封入は, 予め希釈液をストローに吸引し凍結しておき, 用具をストロー内に磁石を用い導入し, 封閉後, 液体窒素内で保存した。胚の融解は, ストローを25℃の微温湯に投入し, 凍結用具をスト

ロー外側から磁石で希釈液に誘導し, 5分間行った。融解希釈後, 胚を72時間培養し, 生存率, 透明帯脱出した胚盤胞期胚率 (脱出率) および透明帯脱出胚のうち内部細胞塊の発育が良好な良質ランク胚の割合 (良質率) を調査した。

【結果および考察】

発生7日齢の胚盤胞期胚の融解72時間後の生存率, 脱出率および良質率に差は見られなかった (図1)。拡張胚盤胞期胚では, 発生7日齢および8日齢とも希釈液3が他の希釈液と比較して良好な発育を示し (図2, 図3), 発生7日齢が最も高い発育 (脱出率94%) を示した (図2)。また, 発生7日齢の胚盤胞期胚は希釈液2での希釈と比べ, 発生8日齢の拡張胚盤胞期胚を希釈液3で希釈した方が生存性は優れる傾向 (脱出率71%vs83%) であった (図1, 図3)。これらのことから, 0.5M Suc および5% EG を添加した希釈液で超急速ガラス化ウシ体外受精胚を融解すると良好な生存性が得られ, また, 脱出率および良質率から考慮すると, 発生7日齢の胚盤胞期胚は発育継続し, 発生8日齢で拡張胚盤胞期まで発育させることが推奨される。

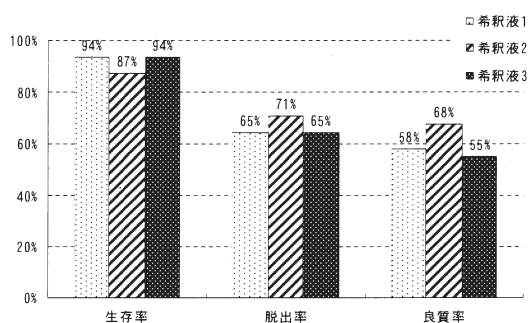


図1 発生7日齢の胚盤胞期胚の希釈後生存性

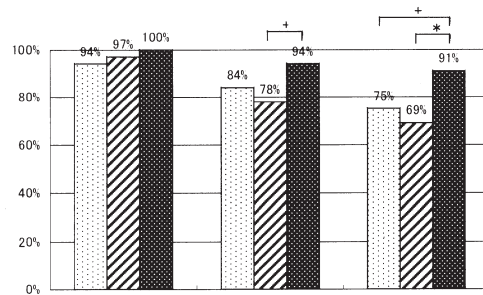


図2 発生7日齢の拡張胚盤胞の希釈後発育

+ : 0.05 < p < 0.1, * : p < 0.05

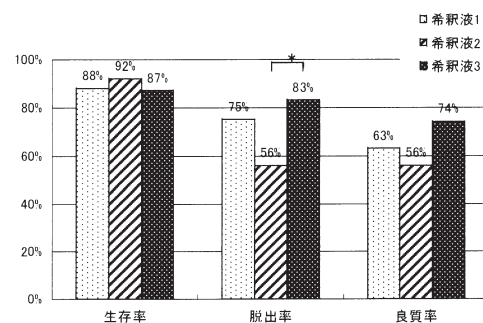


図3 発生8日齢の拡張胚盤胞の希釈後発育

* : p < 0.05