

連載

第14回

牛の凍結胚:取扱いと融解の基本

たかはし よしゆき
高橋 芳幸

ジェネティクス北海道 顧問
 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

牛の凍結胚(凍結受精卵)は、凍結精液と同じように融解したストローを器具にセットして雌牛(レシピエント)の子宮に注入・移植(ダイレクト移植)できるようになった(融解したストローから胚を取出し、凍害防止剤を希釈除去する操作が不要になった)。しかし、凍結胚の取扱い・融解は、凍結精液と異なる点がある。そこで、今回は牛の凍結胚を適切に取扱い、融解していただくために、胚の凍結保存の概要と凍結胚の取扱い・融解について説明します。

1. 胚の凍結保存の概要

ドナーから採取した胚あるいは体外受精由来胚は、発育段階(ステージ)や形態を検査した後、品質の良いもの(品質コード1:エクセレント、グッド)だけを凍結保存する。凍結保存の対象として選別された胚は、適切な洗浄操作を加えた後、以下の手順で、プログラム・フリーザーを用いて凍結保存される(図1)。

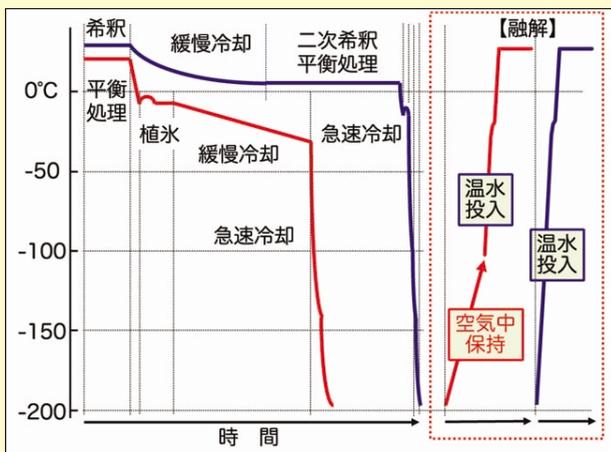


図1 牛の胚と精液の凍結・融解の概要
 胚と精液の凍結過程を左に、融解過程を右に、それぞれの過程の温度変化を赤線と青線で示した。

胚の平衡処理:室温で胚を凍害防止剤が添加されている凍結保存液の中に移し、細胞内に透過できる凍害防止剤(グリセリン、エチレングリコールなど)の細胞内への透過・平衡と細胞内外の浸透圧の平衡

をはかる。凍害防止剤の種類・濃度、温度によって違いはあるが、20~25℃では10~15分で細胞内の凍害防止剤の濃度・浸透圧が保存液とほぼ等しくなる。

ストロー収納と識別表示:平衡処理が済んだ胚を保存液とともに0.25ml 容量のプラスチック・ストロー内に収納し、識別ロッド・ラベルを付ける。

国内では識別表示の基準はないが、国際的にはストローのロッド(柄、持ち手)に凍結処理技術者・団体番号、胚の発育ステージ・品質、凍結保存年月日、ドナーの情報(品種、登録番号、略号)、交配雄牛の情報(品種、登録番号)を印字したラベルを貼る(図2)。



図2 凍結胚を収納したストローの識別ロッド・ラベル
 国際胚技術学会(ETS)のマニュアルに沿って作図したダイレクト移植用のラベル(黄色)の例

凝固点付近までの冷却と植氷:凍結保存液の凝固点に近い温度(-5℃~-7℃)に設定されたプログラム・フリーザーのアルコール槽の中に浸けて急速冷却する。その後、液体窒素に浸けて冷却した鉗子、ピンセットなどを用いてストローを摘むことにより、保存液(細胞外)に氷晶の形成を促す(植氷操作)。

緩慢冷却:植氷操作によりストロー内の保存液に氷晶形成が確認されたら、特定の温度まで、ゆっくり冷却する(0.3~0.6℃/分の冷却速度;60~90分間)。このような条件で冷却すると、細胞の外の氷晶形成、保存液の濃縮、細胞の脱水が徐々に進み、細胞内成分と保存液が濃縮され、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(-25~-35℃)まで冷却したストローを液体窒素ガスの中に移して急速に冷

却すると、細胞内も細胞周辺の保存液もガラス化(結晶構造のない固体に変化)、胚は大きな傷害を受けない。

液体窒素ガス中に移して急速に冷却・凍結したストローは液体窒素内に投入、その中でケイン・ゴブレットに収納し、液体窒素タンク内のキャニスターに入れて保管する。ケイン・ゴブレットには、収納する凍結胚の情報(凍結胚作製者・団体番号、凍結年月日、ドナー・交配種雄牛番号など)を記載する(図3)。

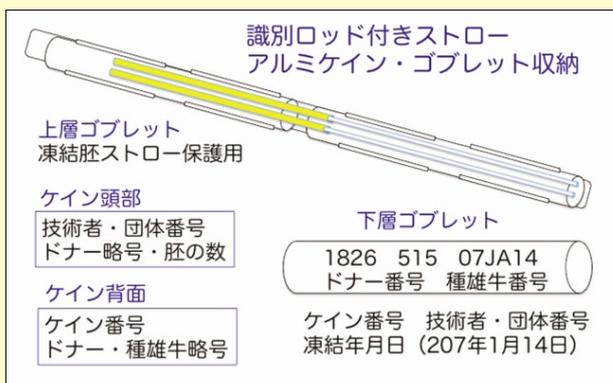


図3 凍結胚ストローを収納するケイン・ゴブレット
国際胚術学会 (ETS) のマニュアルに沿って作図

2. 胚の取扱いと融解の基本

融解の基本:凍結精液は液体窒素タンクから取り出したストローを直接温水に浸けて融解するが、凍結胚は液体窒素タンクから取り出したストローを風の無い場所で一定の時間(5~10秒程度)空気中に保持してから、温水(20~37℃)に浸けて融解する。

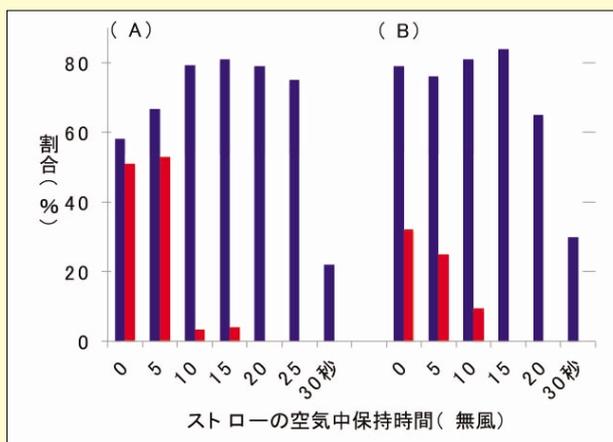


図4 融解時のストローの空気中保持時間が胚の生存性に及ぼす影響
風のない場所でストローを0~30秒間空気中に保持した後、35℃の温水に浸けて融解した胚の生存率(青)と透明帯破損率(赤)を示す。また、(A)と(B)は、それぞれ異なる保存液や冷却条件で凍結保存した胚のデータを示す。

ストローの空気中保持:ストローを空気中に保持せずに温水へ浸けると一部の胚はフラクチャー傷害を受ける。著者らの実験例では、ストローを空気中に5秒間保持してから温水に浸けても、30~50%の胚に透明帯の破損が見られ、透明帯が破損した胚の約50%は胚細胞にも傷害が見られた(図4)。

フラクチャー傷害は、融解時だけでなく凍結保存時にも見られ、特定の温度域(-110~-140℃)を急速に冷却あるいは融解した場合、結晶形成領域とガラス化された領域の容積変化(冷却時の容積減少率、融解時の容積増加率)の違いから領域の境界にできる亀裂(フラクチャー・プレーン)に起因する。その亀裂が胚の一部(透明帯だけ)に当たっても胚に傷害はないが、胚に当たると物理的傷害を与える(図5)。

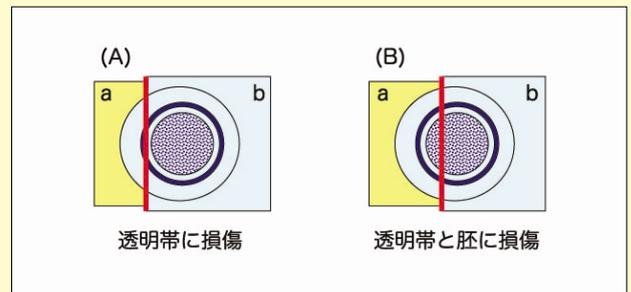


図5 フラクチャー・プレーンとフラクチャー傷害
胚とその周辺がガラス化された後、急速に冷却(融解)されると結晶形成領域(a)とガラス化領域(b)の容積減少率(増加率)が異なるため、両領域の間に亀裂(フラクチャー・プレーン:赤線)が生じる。透明帯だけが損傷を受ける場合(A)と胚細胞にも損傷を受ける場合がある(B)。

ストローを温水に浸ける前に空気中で保持すると、特定の温度域(-110~-140℃)の融解速度が緩慢になるため(図6)、フラクチャー・プレーンの発生を避けることができる。しかし、ストローを長時間空気中で保持するとストロー内の温度が上がり、細胞内も細胞周辺も脱ガラス化(ガラス化された固体から液体に変化)する(図6)。脱ガラス化されると細胞外に新たな氷晶が形成され、細胞外の浸透圧が高まり、胚細胞は浸透圧傷害を受ける。また、細胞内にも氷晶が形成される危険性もある(図9参照)。

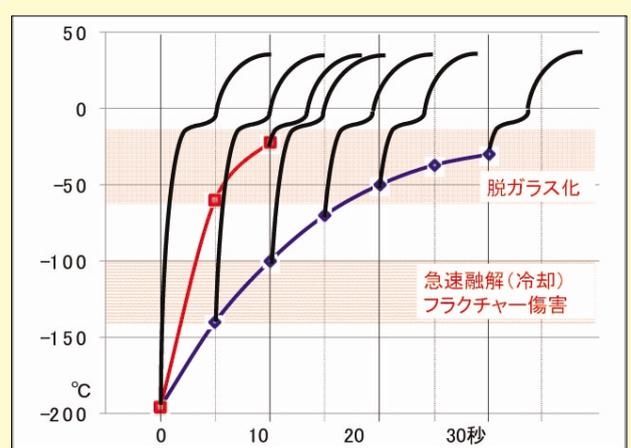


図6 異なる条件で融解した時のストロー内温度の変化
空気中に0~30秒間保持した後、温水に浸けた場合のストロー内の温度変化と傷害の発生温度域を示す。青線は無風、赤線は軽風下での空気中保持時の温度変化、黒線はそれぞれの空気中保持後、温水に浸けた時の温度変化を示す。

無風の場所で融解:凍結精液と同様に、風のない場所で融解作業を行う。風のある場所でストローを空气中に保持すると、短時間でストロー内の温度は急上昇し、胚とその周辺は脱ガラス化するため胚は傷害を受ける(図6、図7)。

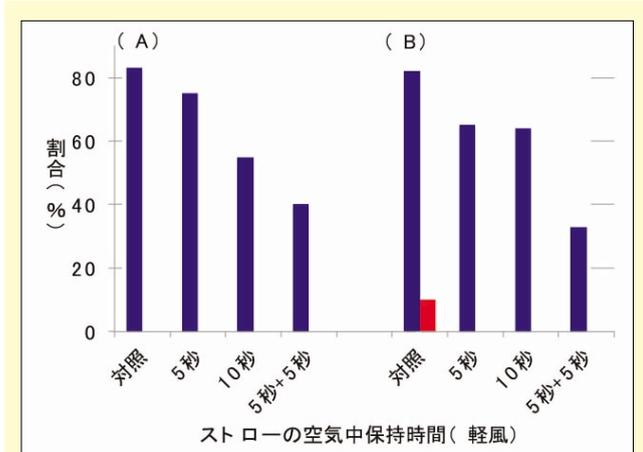


図7 風のある場所で融解した時のストロー空气中保持時間が胚の生存性に及ぼす影響
 軽風(風力2)のある場所でストローを5秒、10秒空气中に保持あるいは軽風下で5秒、無風で5秒空气中に保持した後、温水に浸けて融解した胚の生存率(青)と透明帯破損率(赤)を示す。また、(A)と(B)は、それぞれ異なる保存液や冷却条件下で凍結保存した胚のデータを示す。

凍結胚ストロー取扱いの基本:ケイン・ゴブレットの中のストロー・ラベルの確認など、ストローを外気に曝す機会が多い。融解時と同様に、風のある場所でストローを外気に曝すとストロー内温度は一気に上昇して胚に傷害を招く。また、無風でもストローを長時間外気に曝すとストロー内の温度は脱ガラス化を起こす温度に上昇して、胚は傷害を受ける(図8、図9)。

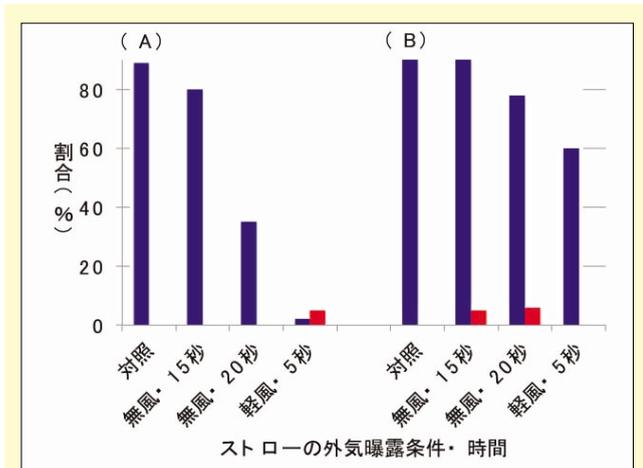


図8 ストローの外気曝露が胚の生存性に及ぼす影響
 無風あるいは風(軽風)のある場所で、ストローを液体窒素の中から取出して5~20秒間空气中に保持する操作(外気曝露)を5~10回繰返した後、35℃の温水に浸けて融解した胚の生存率(青)と透明帯破損率(赤)を示す。また、(A)と(B)は、それぞれ異なる保存液や冷却条件下で凍結保存した胚のデータを示す。

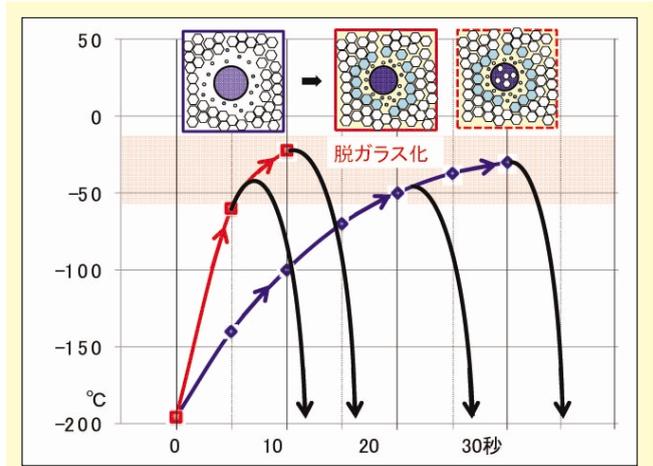


図9 異なる条件で外気曝露したストロー内の温度変化
 空气中に5~30秒間保持した後、温水に浸けた場合のストロー内の温度変化と脱ガラス化温度域を示す。青線は無風、赤線は軽風下での空气中保持時の温度変化、黒線はそれぞれの空气中保持後、液体窒素中に戻した時の温度変化を示す。

ストロー取出しの基本:凍結精液と同様に、ケイン・ゴブレットを収納したキャニスターは液体窒素タンクのネック部分のフロスト・ラインまで引き上げる。また、ケインは上層のゴブレット(ストロー・ロッド)がタンクの外に出る程度に引き上げ、ストロー・ロッドに記載された識別表示を確認する(図10)。ストローがタンクの外に出ないように注意して、融解・移植胚のストローをできるだけ速やかに取出し融解する。また、速やかにケインをキャニスターに戻してタンク内に収納する。

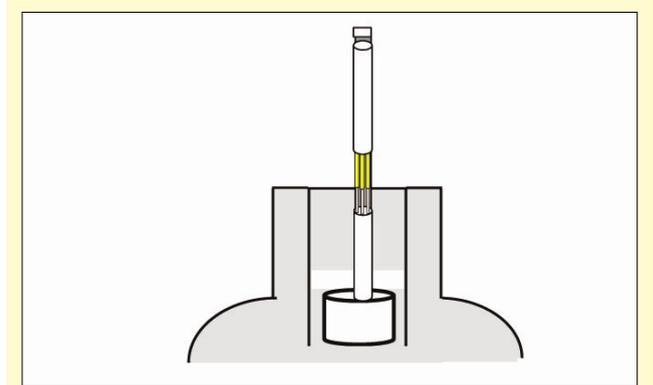


図10 ケイン・ゴブレットからの凍結胚ストローの取出し
 キャニスターをフロスト・ラインまで引上げ、ケイン・ゴブレットを取出す。ケインはストロー・ロッドが確認できる程度引き上げ、ストローがタンクの外に出ないようにする。

【注意点】図4~9のデータは、特定の条件下で凍結保存した体外受精由来胚を用いた結果(数値)で、すべての凍結胚に当てはまる数値ではありません。フラクチャー傷害発生率、最適なストローの空气中保持時間、外気曝露により傷害が発生する条件は、凍結保存液の組成、冷却速度、ストローの材質など凍結条件の違いにより異なります。凍結胚の取扱い・融解は、凍結胚を作製した技術者・団体が発行する指示書に従ってください。