

直接移植が可能な性判別凍結卵の開発

西木秀人
(生産技術科)

【要 約】雌雄鑑別卵のガラス化保存を試みた。生体由来の雌雄鑑別卵の生存性試験では、ガラス化までの修復培養時間が短い区における生存率は 54.2%で、移植試験でも短時間培養区にのみ受胎(受胎率 1/3=33.3%)が認められた。

【目 的】

従来の緩慢凍結法では、性判別のために卵細胞の一部を切り取った受精卵の長期保存には依然として課題が残されている。近年、氷晶形成を抑制した状態で超低温保存することが可能なガラス化法が改良され、生存率の向上につながっている。そこでガラス化処理の簡易化および最適なストロー内 1 段階希釈法についての共同試験に参加し、有効性が認められたガラス化保存液と手法を応用し、雌雄鑑別卵の長期保存法の開発を行う。

【方 法】

- 1) 共同試験「ガラス化保存受精卵の直接移植に向けた検討」：体外受精後 7～8 日目の胚盤胞期以降の A および A' ランク卵を用い、耐凍剤濃度ならびに成分の異なる 3 種の保存液(表 1)を用いてガラス化し、加温(融解)後の生存性および透明帯脱出率を比較した。
- 2) 雌雄鑑別卵のガラス化：共同試験で有効性が認められた保存液(GESXP2020)を用いて生体由来の雌雄鑑別卵をガラス化保存し、細胞採取からガラス化までの修復培養時間の違い(短時間区：4～9 時間，長時間区：18～24 時間)が加温後の生存性に及ぼす影響を調査した。また雌と判定された卵については加温後の移植試験も行った。

【成果の概要】

- 1) 3 種の耐凍剤組成を持つガラス化保存液を用いた時、加温(融解)後培養の生存率は、いずれの経過時間においても EDSB1515 が有意に低く、培養後 96 時間では GESXP2020:65.0%，GESXP1020:52.9%，EDSB1515:25.0%であり、有意に GESXP2020 が高かった ($p<0.01$) (図 1)。また透明帯脱出率においては、48 時間以降いずれの経過時間においても有意に GESXP2020 が高く ($p<0.001$)、培養後 96 時間では GESXP2020 : 56.5%，GESXP1020 : 35.4%，EDSB1515 : 13.7%であった (図 2)。
- 2) 生体由来の雌雄鑑別卵を用いた修復培養時間の比較では、短時間区における加温(融解)後培養 72 時間での生存率(54.2%)は、長時間区(0%)に比べ有意に高かった ($p<0.05$) (図 3)。また、移植試験においても短時間区では 33.3%の受胎率であったが、長時間区では受胎が認められなかった (表 2)。
- 3) まとめ：20%グリセリン，20%エチレングリコール，3%ポリエチレングリコールを耐凍剤成分とする保存液を用いた雌雄鑑別卵のガラス化保存では、細胞採取後の修復培養時間を短くした方が生存率，受胎率に優れていたが、依然として実用レベルには低いと考えられ、より一層の改良が必要であった。

表 1 保存液（耐凍剤）組成

GESXP2020 :	20%グリセリン	20%エチレングリコール	3%ホリエチレングリコール
GESXP1020 :	10%グリセリン	20%エチレングリコール	3%ホリエチレングリコール
EDSB1515 :	15%エチレングリコール	15%DMSO	BSA0.4%

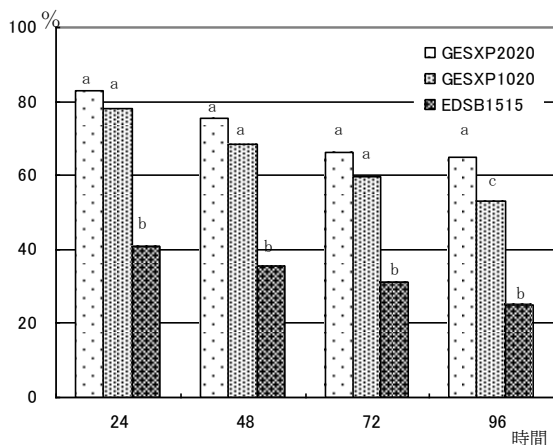


図 1 保存液の種類と生存率
同時間異符号間に有意差あり (P<0.01)

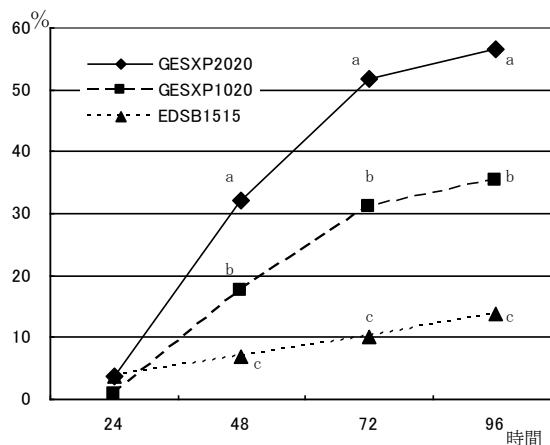


図 2 保存液の種類と透明体脱出率
同時間異符号間に有意差あり (P<0.001)

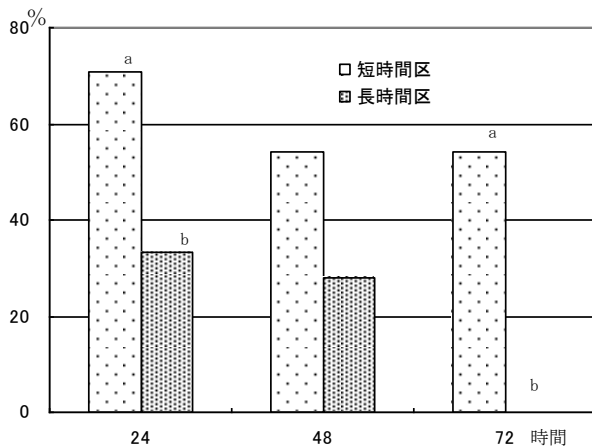


図 3 修復培養時間と生存率
同時間異符号間に有意差あり (P<0.05)

表 2 移植成績

由来	短時間区	長時間区
移植数	3	5
受胎頭数	1	0
受胎率 (%)	33.3	0.0