

第3回哺乳動物生殖工学研究会

プログラム・抄録集

会期　： 平成3年12月 7日（土）
午後2時30分～5時30分

会場　： 北里本館2階大会議室
港区白金 5-9-1 TEL 03-3444-6161

開会の辞

会長 横山峯介

シンポジウム『精子・卵子・胚の凍結保存』

座長 鈴木宏志・浜野晴三

S-1 マウスの系統維持を目的とした胚の凍結保存

岡本正則（放射線医学総合研究所 5Z）

S-2 マウス受精卵・胚の超急速凍結保存

田谷順子（埼玉医科大学総合医療センター 15Z）

S-3 マウス精子の凍結保存

竹島 勉（動物繁殖研究所 7Z）

S-4 ラット未受精卵および前核期受精卵の超急速凍結保存

中瀬直己（日本生物科学研究所、NTサイエンス 9Z）

S-5 ウシ胚の凍結保存 —ワンステップストロー法における凍結条件の検討—

平泉真吾（青森県畜産試験場 17Z）

S-6 ウシ体外成熟・体外受精・体外培養胚盤胞の凍結保存

福田芳詔（北里大学獣医畜产学部 助教授）

一般講演

座長 古館専一

I Analysis of porcine follicular fluid substance(s)
responsible for male pronucleus formation in in vitro
matured oocytes.

F.P. Daen、内藤邦彦、豊田 裕（東京大学医科学研究所）

2 肝炎ウイルスと分子生物学

星 友二（埼玉県赤十字血液センター、北里研究所免疫第1 15Z）

———— 総 会 ———

S - 1 マウスの系統維持を目的とした胚の凍結保存

岡本正則（放射線医学総合研究所）

放医研では、57系統のマウスが研究用として生産・維持されている。また、研究の高度多様化にともない、将来はさらに系統の増加が予想される。しかし、これら多くの系統を繁殖により継代維持するためには、多大の労力、経費、飼育場所が必要であり、現状ではこれに対応することはできない。このため当研究所では、より効率的な実験動物の生産・供給、系統維持を行なうことを目的として、胚の凍結保存を実施している。すなわち、生産・維持しているマウスの系統を再検討し、使用予定のない系統については凍結保存に切り替え、繁殖により維持している系統数を順次減らす計画である。ここでは、放医研で実施しているマウスの系統維持を目的とした胚の凍結保存について、主として実用上の観点から紹介する。

S-2 マウス受精卵・胚の超急速凍結保存

田谷順子（埼玉医大総合医療センター）

今日、初期胚の凍結保存法は実験動物を含む産業動物胚の効率的利用に応用されている。マウス胚の凍結法として、毎分0.2～0.8℃の緩慢な速度で-70℃付近まで冷却し、その後、液体窒素へ浸漬するいわゆる緩慢凍結法が最初採用された。これに対し近年、高濃度凍害保護物質存在下で、胚を直接液体窒素中へ投入するガラス化法あるいは超急速凍結法が、胚の凍結法に適用されるようになった。そこで、上述のような凍結法の流れを背景に、本研究会では演者がこれまで行なってきたマウス受精卵・胚の超急速凍結法について紹介する。

S - 3 マウス精子の凍結保存

竹島 勉（動物繁殖研究所）

1952年Polge と Rowsonが牛精子の凍結保存に成功して以来、ウマ、ヒツジ、ウサギ、ニワトリ、ヒトなどの動物種で多くの研究がなされている。しかし、マウス精子の凍結保存については、Rapatzらがfructoseとskim milkで（1978年のGrahamの総説による）、演者らが1984年にraffinose と skim milk で、それ以降、横山、多田、奥山によりraffinose を主成分とした保存液で成功例が報告されたに過ぎない。今回、raffinose と skim milkを凍害保護物質とした凍結方法を中心に紹介する。

保存液を作製する場合、蒸留水に諸濃度のraffinose を60℃の温水で溶解し、これに skim milkを加える。次に、これを超遠心器で15分間遠心分離し(10000G)、上清の透明な部分を、 0.45μ のミリポアフィルタ-ユニットで濾過滅菌し、保存液を作製する。精子の採取は、性成熟した雄の精巣上体尾部をシャーレ内の保存液0.4ml に浸漬し、眼科用ハサミで細切した後、シャーレを約1分間、円を描くように回転させ、精子を精巣上体管から保存液内に拡散させる。保存液内に均一に拡散した精子浮遊液を0.5ml のサンブルチューブに約0.1ml ずつ移し、凍結保存する。凍結操作は、精子液の入ったサンブルチューブを密栓し、液体窒素ガス中に10分静置した後、液体窒素に浸漬する二段階凍結法が簡便である。冷却速度は、室温から-196℃まで約30~40℃/min である。融解はサンブルチューブを液体窒素から取り出し、室温の水槽に入れ融解する。融解後の保存液の希釈法は、サンブルチューブ内の精子液が完全に融解したのを確認した後、精子液をシャーレ内の0.4ml 培養液(HTF) 低部に静かに挿入し、CO₂ 培養器内で30分静置する。次に、あらかじめ1.5ml の培養液を吸引した2.5ml の注射筒に精子液を吸引した後、注射筒先端に 0.45μ のミリポアフィルタ-ユニットを装着し、内筒を押し出すことにより濾過し、続いてミリポアフィルタ-ユニットの先端から2ml の培養液を吸引し、再び濾過する。これらの操作を再度繰り返した後、適正な精子濃度になるように培養液を吸引する。これらの操作を行なう時に三方活栓を用いると便利である。15、18、21% 濃度のraffinose 単体で精子を凍結した場合、融解直後の精子生存性は、18% raffinose で良好ではあるが、ほぼ1時間以内に運動が停止してしまう。一方、これら 3% skim milk を添加した保存液では、融解後、その生存性は、3時間程度までは十分であり、中でも、18% raffinose + 3% skim milkが安定した成績を得ることができる。凍結-融解後の精子を用いて産

仔を得る場合、体外受精・胚移植、人工授精、卵管内への精子注入などが考えられる。

S-4 ラット未受精卵および前核期受精卵の超急速凍結保存

中渴直己（日本生物科学研究所、NTサイエンス）

近年、演者はマウス未受精卵あるいは胚を培養液から高濃度の保存液へ直接移し、直ちに、液体窒素中に浸漬する超急速凍結を試み、融解後、良好な生存性が得られることを報告した。本法は凍結融解操作が簡便かつ短時間で完了すること、緩慢冷却装置を必要とせず、低コストであることから、他の動物種においても応用可能であれば、哺乳動物卵子あるいは初期胚の凍結保存法としてきわめて有効な手段になるものと考えられる。

現在、ほぼ同様の方法を用いて、ラット未受精卵および前核期受精卵の凍結保存を試みており、移植によりそれら卵子由来の新生仔も、既に、得られているが、本法を用いて凍結したラット卵子の凍結保存成績は、マウスのそれと比べて低く、確立の域に達するまでには今一步の感がある。本研究会では、今までに得られたその保存成績について紹介すると共に、今後の改良点について触れる。

平泉真吾・中島 聰・小野寺邦男・仙北富志男
(青森県畜産試験場)

【目的】最近、青森県において受精卵移植を希望する農家が急速に増大し、移植技術とともに簡易で生存性の高い凍結融解技術の確立が求められている。今回は、ワンステップ法における植氷温度および凍結速度が融解後の体内受精卵に及ぼす影響を、従来行なってきたステップワイス 法と比較検討した。

【方法】試験には、当場で繁養している日本短角種および黒毛和種に常法に従い過排卵処理を施し、人工授精後7日目に回収した発育ステージが初期胚盤胞～拡張胚盤胞のいわゆるAランクの優良卵を供試した。凍結用培地には 10% グリセロール を含む20% FCS 加 PB1を用い、グリセロール平衡時間は受精卵を直接凍結用培地に移し0.25ml ストローへ図1のように封入し、30分行なった。凍結は図2に示すとおり行なった。融解は各方法ともストローを空気中に5秒間放置した後、38℃の温水中に7秒間静置することにより急速融解した。グリセロールの除去は、ステップワイス 法では受精卵を6、3 および 0% のグリセロールを含む、PB1 に各々5分間移し替え、段階的に除去した。ワンステップ A法およびB法では、受精卵を含むグリセロール層とショ糖層を混和し5分間静置後、PB1 層と混和し1段階でグリセロールを除去した。その後 CS 加 199培地で1～24時間培養し、胚盤胞腔の再生が認められたもの、あるいは凍結前のステージ以上に発育したもの生存胚とした。【結果】凍結融解後の生存率を表1に示した。凍結融解後の生存率は、ワンステップ A法では10/19(52.6%)であり、ステップワイス 法の25/30(83.3%)に比べ低い値であった。しかし、ワンステップ B法すなわち植氷温度を-5℃、植氷保持時間を15分、冷却速度を0.5 ℃ / 分にすることにより、生存率は29/35(82.9%)となりステップワイス 法とほとんど差がなく高い生存率を示した。以上の結果より、今回行なったワンステップ B法は、生存率が高く、操作が簡単であることから、凍結融解技術の簡易化が計られ、今後受精卵移植技術の普及に貢献するものと考えられた。また移植による受胎の有無については現在検討中である。

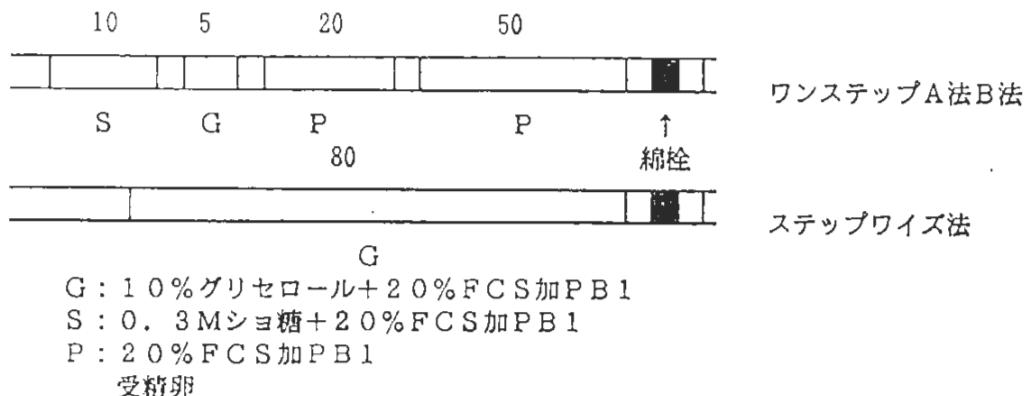


図1 ストローへの受精卵の封入方法

方 法	凍結開始温度	冷却速度	植氷温度	冷却速度	液体窒素浸漬温度
ステップワイズ法	15°C → 每分 → -7°C 1°C 10分保持	-7°C → 每分 → -30°C 0.3°C 10分保持	-30°C		
ワンステップA法	-7°C → 直接 → -7°C 10分保持	-30°C 0.3°C → 保持なし			
ワンステップB法	-5°C → 直接 → -5°C 15分保持	-30°C 0.5°C → 保持なし			

図2 凍 結 方 法

表1 凍結融解後の生存率

凍結方法	培養卵子数	発育卵子数	生存率 (%)
ステップワイズ法	30	25	83.3%
ワンステップA法	19	10	52.6%
ワンステップB法	35	29	82.9%

S - 6 ウシ体外成熟・体外受精・体外培養胚盤胞の凍結保存

福田芳詔（北里大学獣医畜産学部）

In vitro系で作出された胚盤胞の凍結保存は、胚の有効利用の面から産業上欠かせない。In vitro系で作出された胚盤胞の耐凍性は、供卵牛から回収された胚盤胞のそれに比べると劣るようと思われる。本実験では、従来、供卵牛から回収された胚盤胞を用いて開発された凍結保存法が、in vitro 系で得られた胚盤胞の凍結保存にどの程度利用できるかについて検討した。

胚盤胞は、24時間成熟培養後、体外受精し、卵丘細胞と共に培養して得られた7～8日齢のものを供試した。凍結基礎培地には20% CS加 PB1で、耐凍剤は1.36M(10%) グリセロールを用いた。胚のグリセロール平衡は室温で、0.3M グリセロールに3分間、0.75M グリセロールに7分間、1.36M グリセロールに8分間浸漬して行なった。0.25mlストローに1個ずつ胚を収め、-5.0℃のエタノール槽に直接浸漬した。2～3分後に植氷し、15分間保持してストロー下端まで氷を形成させた。以後、0.3 ℃ / 分、0.5 ℃ / 分および 0.6℃ / 分で -27～-3 5 ℃まで冷却し、ただちにLN₂へ浸漬して保存した。融解は、LN₂から取り出したストローを室温下の空気中で5秒間保持後、35℃の温水中に15秒間浸漬して行なった。耐凍剤の除去は、室温下で浸透圧ショックを和らげるために、グリセロール・ショ糖混合法を行なった。すなわち、融解胚は6.6% グリセロール + 0.3M ショ糖、3.3% グリセロール + 0.3M ショ糖、0.3M ショ糖の順に5分間隔で移し、発生培地である10% CS加 Hepes 199培地で2回洗浄後、卵丘細胞と共に培養した。観察は、培養開始時、培養後4、24および48時間に行ない、少なくとも凍結前の発生段階まで形態学的に回復したものを生存胚と判定した。成績が出揃っていないが現在までの成績から、冷却速度0.5 ℃ / 分、LN₂ 浸漬温度 -30℃で最も高い生存率を(87%)が得られている。In vivo 胚盤胞についての検討は行っていないので比較できないが、in vitro 系で作出された胚盤胞でも本質的には供卵牛から回収された胚盤胞での最適冷却速度とLN₂ 浸漬温度が適用できるものと思われる。

1 Analysis of porcine follicular fluid substance(s)
responsible for male pronucleus formation in
in vitro matured oocytes

F. P. Daen, K. Naito and Y. Toyoda

The Institute of Medical Science, University of Tokyo,
Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108, Japan

TYH medium has no optimal capability of promoting male pronucleus (mPN) formation in in vitro matured porcine oocytes. Reports revealed oocytes that matured under porcine follicular fluid (pFF) resulted to an excellent increase formation of mPN. This baseline study was undertaken to investigate the substance(s) responsible for increase mPN formation in porcine oocytes matured and fertilized in vitro. (MATERIALS AND METHODS) Porcine follicular fluid was fractionated by means of ultra centrifugation at 37,000 rpm for 48 hours. Fraction resulted to four parts labeled as Top, Second, Third and Bottom. All fractions were used as maturation media. TYH and pFF media were used as negative and positive control respectively. In vitro maturation and fertilization were done according to the method of Naito et al (1988). In addition, fractions were analysed for protein and sugar concentrations. (RESULTS) In protein concentration analysis, the Top, Second, Third and Bottom fractions obtained 0.8, 3.5, 5.0 and 35.0 mg/ml level respectively. Difference was nil among all fractions for acid and neutral sugar level test. Twenty four hours after maturation, oocytes that matured under the Top fraction manifested high clarity expansion of the surrounding cumulus cells same as that of oocytes matured under pFF. On the other hand, remaining fractions (Second, Third, Bottom) and TYH medium exhibited very little or no expansion at all. Finally for mPN formation, pFF obtained the high (60%) and TYH the low (16%) percentage which strongly agreed with the previous report. Top fraction got the higher rate of mPN formation (59%) than Second, Third and Bottom fractions (23%, 40% and 33% respectively), although it obtained the least level of protein concentration. (CONCLUSION) Results suggest Top fraction contained the highest probability for the existence of the substance(s) stimulating mPN formation.

2 肝炎ウイルスと分子生物学

星 友二（埼玉県赤十字血液センター、北里研究所免疫第1）

近年、血液伝播性非A非B型肝炎ウイルスと呼ばれていたウイルスがHCV(Hepatitis C virus)、経口伝播性非A非B型肝炎ウイルスがHEVと名付けられ、ヒト肝炎ウイルスは、A, B, C, D, E型のウイルスに分類されるようになった。経口感染するA型とE型は、日本の衛生環境では稀であり感染しても一過性感染なのであまり問題とならない。B型については献血された血液の中から、HBV陽性血をほぼ100%検出することが可能となり、輸血によるB型肝炎の発症は予防できるようになった。C型は持続性感染になり易く、後には慢性肝炎、肝硬変、肝癌への移行があり、問題となっている。1989年に米国ベンチャー企業Chiron社が、従来のウイルス学的手法と異なる分子生物学的手法を用いてHCVゲノムの一部をクローニングに成功し、現在では核酸の全塩基配列が決定されている。さらに、検査試薬も開発され市販されている。しかし、HCVのウイルス本態は、いまだ明らかにされていない（ウイルス粒子が発見されていない）。そこで今回は、未知ウイルスの新しい研究法として分子生物学的手法について私の研究も含め紹介したい。