

学 位 論 文 題 名

エチレングリコールとジメチルスルフォキシドを用いた
マウスおよびウシ胚のガラス化低温保存

学位論文内容の要旨

胚の凍結保存は、ウシ胚移植において重要な技術の一つである。近年、新しい胚の低温保存法としてガラス化法が開発された。ガラス化による低温保存は冷却に必要な時間が短く、高価な凍結器を必要としないという利点を有し、胚の低温保存技術の省力化を大きく促す。本論文では、ガラス化法を改良し、胚の低温保存をさらに簡便で、実用的な技術にすることを目的として以下の様に実験を進めた。

2章では、マウスの桑実胚と胚盤胞の両発育ステージの胚に有効なガラス化溶液を検索したところ、エチレングリコール(EG)とジメチルスルフォキシド(DMSO)の混合溶液が有効であった。

3章では、25.0%EGと25.0%DMSOの混合溶液(VSED)を用いマウス胚盤胞をガラス化する場合、融解後の胚の生存性に影響する要因について検討した。その結果、50%VSEDとVSEDへの浸漬時間が、融解後の胚の生存性に大きく影響したが、50%VSEDとVSEDに浸漬するときの温度、冷却速度および希釈溶液中のsucrose濃度と希釈時間の影響は少ないことが明らかとなった。ガラス化胚盤胞の移植後の受胎率は、新鮮胚のそれと比較して有意な差は認められず、正常な産子が得れた。

4章では、VSEDを用いウシ胚をガラス化する場合の50%VSEDへの平衡化時間の影響および移植後の生存性について検討した。冷却前の50%VSEDへの最適な平衡化時間は1～2分であった。移植後の受胎率は、桑実胚と初期胚盤胞で52.9(9/17)、胚盤胞で40.0%(4/10)と従来の緩慢凍結法に匹敵するものであり、正常な産子が得られ、VSEDはウシ胚のガラス化にも有効であった。

5章では、ガラス化胚を保存用ストローから取り出すことなく直接移植するために、融解後、直ちにガラス化溶液と希釈溶液をストロー内で混和する方法を考案した。マウス胚盤胞を用いた2つの予備実験で、 $-20\sim-25^{\circ}\text{C}$ でのVSEDへの最適浸漬時間は2～5分であることおよび融

解後の0.5 M sucrose PBS 中での希釈時間は30分以内が望ましいことが明らかとなった。この方法によりガラス化したウシ胚を融解後レシピエントに直接移植した。希釈溶液に0.5 M sucrose を含む PBS を用いた場合の受胎率は8.3% (1/12) および sucrose を含まない PBS を用いた場合は30.8% (4/13) であり、ガラス化ウシ胚の直接移植による受胎が認められた。

本論文に示された胚のガラス化法およびガラス胚の直接移植法は、胚の低温保存技術の省力化を促進し、畜産および発生工学の発展に寄与すると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	金 川 弘 司
副 査	教 授	杉 村 誠
副 査	教 授	斉 藤 昌 之
副 査	助 教 授	高 橋 芳 幸

胚の凍結保存は、ウシ胚移植において重要な技術の一つである。近年、新しい胚の低温保存法としてガラス化法が開発された。ガラス化による低温保存は冷却に必要な時間が短く、高価な凍結器を必要としないという利点を有し、胚の低温保存技術の省力化を大きく促す。本論文では、ガラス化法を改良し、胚の低温保存をさらに簡便で、実用的な技術にすることを目的として以下の様の実験を進めた。

2章では、マウスの桑実胚と胚盤胞の両発育ステージの胚に有効なガラス化溶液を検索したところ、エチレングリコール (EG) とジメチルスルフォキシド (DMSO) の混合溶液が有効であることを示した。

3章では、25% EG と25% DMSO の混合溶液 (VSED) を用いマウス胚盤胞をガラス化する場合、融解後の胚の生存性に影響する要因について検討した。その結果、50% VSED と VSED への浸漬時間が、融解後の胚の生存性に大きく影響したが、50% VSED と VSED に浸漬するときの温度、冷却速度および希釈溶液中の sucrose 濃度と希釈時間の影響は少ないことが明らかとなった。ガラス化胚盤胞の移植後の受胎率は、新鮮胚のそれと比較して有意な差は認められず、正常な産子が得られた。

4章では、VSED を用いてウシ胚をガラス化する場合の50% VSED への平衡化時間の影響および移植後の生存率性について検討した。冷却前の50% VSED への最適な平衡化時間は1~2

分であった。移植後の受胎率は、桑実胚と初期胚盤胞で53% (9/17)、胚盤胞で40% (4/10) と従来の緩慢凍結法に匹敵するものであり、正常な産子が得られ、VSED はウシ胚のガラス化にも有効であった。

5章では、ガラス化胚を保存用ストローから取り出すことなく直接移植するために、融解後、直ちにガラス化溶液と希釈溶液をストロー内で混和する方法を考案した。マウス胚盤胞を用いた2つの予備実験で、 $-20\sim-25^{\circ}\text{C}$ でのVSEDへの最適浸漬時間は2～5分であることおよび融解後の0.5M sucrose PBS 中での希釈時間は30分以内が望ましいことが明らかとなった。この方法によりガラス化したウシ胚を融解後レシピエントに直接移植した。希釈溶液に0.5 M sucrose を含む PBS を用いた場合の受胎率は8% (1/12) および sucrose を含まない PBS を用いた場合は31% (4/13) であり、ガラス化ウシ胚の直接移植による受胎が認められた。

本論文に示された胚のガラス化法およびガラス化胚の直接移植法は、胚の低温保存技術の省力化を促進し、畜産および発生工学の発展に寄与すると考えられる。よって審査員一同は、石森久雄氏が博士(獣医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。