

学 位 論 文 題 名

Vitrification of mouse oocytes and embryos using ethylene glycol as the sole cryoprotective agent

（エチレングリコールを単独の凍害防止剤として  
用いたマウス卵子および初期胚のガラス化保存）

学位論文内容の要旨

卵子および初期胚の低温保存は、動物繁殖の分野では実用性を持っている。ガラス化はあらゆる動物種の卵子および初期胚の低温保存法として、簡易的、実用的かつ経済的な方法である。数種の凍害防止剤を用いた卵子および初期胚のガラス化保存に関する研究が報告されているが、一種類の凍害防止剤のみを含む溶液によるガラス化保存に関する研究は報告されていない。本研究では、エチレングリコールを単独の凍害防止剤として用いたマウス卵子および初期胚のガラス化保存法の有用性を証明するために、以下の実験を行った。

研究1では、エチレングリコールが単独の凍害防止剤としてマウス8細胞期胚のガラス化に使用できるかどうかを検討するとともに、胚のガラス化前のエチレングリコールへの暴露時の温度が融解後の8細胞期胚の生存性に与える影響について調べた。実験1においては、ガラス化に必要なエチレングリコールの最低濃度は7Mであることが示された。実験2では、8細胞期胚は2Mのエチレングリコールを加えた10%子牛血清を含むリン酸緩衝液（PBS）に、2、5あるいは10分間暴露した後、さらに7Mのエチレングリコールを加えたPBSに2あるいは5分間暴露した。その後、胚はガラス化せずに1Mのショ糖溶液に5分間暴露し、胚内のエチレングリコールを希釈除去した。エチレングリコールに暴露した胚は無処理の対照群と同様の胚盤胞への発育率を示した。実験3および4では、8細胞期胚を18

～22℃あるいは24～30℃で、2および7Mのエチレングリコールに実験2と同じように各種の時間暴露した後、ガラス化した。高室温下（24～30℃）でエチレングリコールへ暴露すると胚盤胞への発育率は低かった。一方、18～22℃で7Mのエチレングリコールに2分間暴露した胚の発育率は、無処理の対照群と同等の高い値であった。しかし、5分間暴露した胚は有意に低い発育率を示した（ $p<0.0001$ ）。これらの実験結果から、マウス8細胞期胚は、18～22℃で最初に2Mのエチレングリコールに2～10分間の暴露した後、7Mのエチレングリコール中での2分間の平衡を行うことにより、ガラス化保存できることが示された。さらに、24℃以上でのエチレングリコールへの暴露が、胚の発育に有害であることが明らかになった。

研究2では、マウス1細胞期胚を7Mのエチレングリコール中で効果的にガラス化できるかどうか、また、ガラス化・融解胚の体外での発育を培養液交換によって改善できるかどうかについて検討した。実験1では、エチレングリコールへの暴露時間とガラス化が胚の発育に与える影響について、培養液交換を行わずに検討した。1細胞期胚は7Mのエチレングリコールを加えた修正リン酸緩衝液(PB1)中に1、2あるいは5分間、18～20℃で暴露し、その後ガラス化を行った場合と行わなかった場合について比較検討した。その結果、エチレングリコール暴露だけでは胚の発育に影響はないが、ガラス化により胚の発育に有害な影響が現れた。実験2においては、培養24時間目に培養液交換を行い、実験1と同様の暴露時間でのエチレングリコールへの暴露とガラス化が胚の発育に与える影響を検討した。1あるいは2分間エチレングリコールへ暴露した胚は高い胚盤胞への発育率を示した。しかし、5分間暴露したガラス化胚の発育率は著しく低下した（ $p<0.05$ ）。実験3では、7Mのエチレングリコールに2分間暴露した胚の生存性と細胞数について無処理胚と比較検討した。培養24時間目に培養液交換を行った場合、ガラス化・融解胚は無処理胚と差異のない高い胚盤胞への発育率を示した。研究2の実験から、マウス1細胞期胚は7Mのエチレングリコールを含むPB1中に1あるいは2分間暴露することによりガラス化保存が可能であり、本実験条件下では、培養

24時間目に培養液を交換することによってガラス化胚の発育率の改善されることが示された。

研究3では、7Mのエチレングリコールを含むPB1への一段階あるいは二段階暴露によるガラス化法が、マウス卵子の低温保存に適用できるかどうか検討した。また、融解卵子に対する1Mのショ糖溶液中でのエチレングリコールの希釈時間（5あるいは10分間）の影響およびガラス化溶液へのショ糖の添加効果についても検討した。まず、実験1ではガラス化を行わずに7Mのエチレングリコールを含むPB1への暴露が卵子の発育能に及ぼす影響について検討した。すなわち卵子は、一段階で7Mのエチレングリコールを含むPB1に2分間、あるいは2および7Mのエチレングリコールを含むPB1にそれぞれ2分間ずつ二段階で暴露した。その結果、どちらの暴露方法を用いても、7Mのエチレングリコールへの暴露は、卵子の発育に対して有害であることが示された。実験2においては、ガラス化卵子の発育に対するエチレングリコールへの暴露方法およびガラス化・融解後のエチレングリコールの希釈時間の影響について検討した。実験1と同様に一段階あるいは二段階にエチレングリコールに暴露した後、卵子を液体窒素中でガラス化した。融解後、エチレングリコールの希釈を5あるいは10分間行い、全ての卵子を体外受精して胚盤胞への発育率を調べた。その結果、希釈時間が5分間の場合、二段階でエチレングリコールに暴露した方が一段階の暴露よりも卵子の胚盤胞への発育率は高かった ( $p < 0.01$ )。希釈時間を10分間に延長した場合、一段階および二段階暴露の間に有意な差は認められなかった。次に、0.5Mのショ糖添加および無添加の7Mのエチレングリコールを含むPB1を用いて卵子を一段階暴露した後ガラス化し、融解卵子は10分間エチレングリコール希釈した。ショ糖のガラス化保存液への添加はガラス化卵子の発育能を大きく改善しなかった。研究3では、マウス卵子は7Mのエチレングリコールによってガラス化保存が可能であり、一段階でのエチレングリコール暴露後の卵子の生存性は、希釈時間を10分間に延長することによって改善されることが示された。しかし、7Mのエチレングリコールに0.5Mのショ糖を添加しても、卵子の発育能は改善されなかった。

以上の結果から、エチレングリコールが単独の凍害防止剤としてマウス8細胞期胚、1細胞期胚および未受精卵子のガラス化保存に有用であることが明らかになった。また、エチレングリコールによるマウス卵子および初期胚を効果的にガラス化するためには、以下の点が重要であることが分かった。1) ガラス化保存するためのリン酸緩衝液中のエチレングリコールの最低濃度は7Mである。2) 7Mエチレングリコール暴露時の温度は重要であり、卵子や初期胚は18～22℃で暴露することにより高い生存性が得られる。3) ガラス化・融解した1細胞期胚の生存性は、培養24時間目に培養液を交換することによって改善される。4) ガラス化卵子の生存性は、1Mショ糖溶液に10分間暴露してエチレングリコールを希釈することによって改善される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 金 川 弘 司  
副 査 教 授 斉 藤 昌 之  
副 査 教 授 渡 邊 智 正  
副 査 助 教 授 高 橋 芳 幸

## 学 位 論 文 題 名

### Vitrification of mouse oocytes and embryos using ethylene glycol as the sole cryoprotective agent

(エチレングリコールを単独の凍害防止剤として  
用いたマウス卵子および初期胚のガラス化保存)

卵子や初期胚の低温保存技術の簡易化には、単独の凍害防止剤を用いたガラス化溶液の開発とガラス化した卵子および初期胚の生存性に関する因子の解明が必要である。

申請者は、エチレングリコールを単独の凍害防止剤として用いたマウスの卵子および初期胚のガラス化保存法について検討した。ガラス化に必要なエチレングリコールの最低濃度は7Mであることを確認した後、マウス8細胞期胚のエチレングリコールへの暴露時の温度が胚の生存性に与える影響を検討した。18～22℃で2Mのエチレングリコールに2～10分間、さらに7Mのエチレングリコールに2分間暴露してガラス化すると90%以上の胚が胚盤胞へ発育するが、24℃以上で同様の処理をした場合、胚の発育率が低下することを明らかにした。次に、マウス1細胞期胚のガラス化における1段階暴露法について検討した。7Mのエチレングリコールに1あるいは2分間暴露した後ガラス化すると胚盤胞への発育率は高く、発生培地を途中で交換すると約90%の発育率の得られることを示した。さらに、7Mのエチレングリコールを用いたマウス卵子のガラス化保存における段階的暴露と融解後のエチレングリコール希釈方法を検討した。1段階暴露した卵子は、5分間の希釈では低い生存率であったが、希釈時間を10分間にすると2段階暴露の卵子と同等の高い生存率が得られた。また、ガラス化溶液へショ糖を添加したが、ガラス化卵子の体外受精後の発育能は向上しなかった。

以上のように申請者は、マウス卵子および初期胚のガラス化保存においてエチレングリコールが単独の凍害防止剤として有効であることを示した。さらに、エチレングリコールを用いたガラス化保存における卵子および胚の生存性を左右す

る要因を明らかにし、高い生存率を得ることに成功した。よって、審査員一同は、申請者が博士（獣医学）の学位を受ける資格を有するものと認めた。