

希少糖を用いた牛胚の凍結保存に関する試験

大谷徳寿、渡邊朋子¹⁾、谷原礼論、高橋和裕¹⁾、中嶋哲治²⁾、田中 隆、徳田雅明³⁾

Effects of rare sugar in creopreserved bovine embryo.

Noritoshi OTANI, Tomoko WATANABE, Ayatsugu TANIHARA, Kazuhiro TAKAHASHI, Tetsuji NAKAJIMA,
Takashi TANAKA, Masaaki TOKUDA

要 約

牛赤血球を用いて、凍結融解刺激により破壊され溶出したヘモグロビンの割合を比較することによる添加剤(糖)の溶血阻止効果(細胞膜保護効果)の比較を行い、各糖の効果と最適濃度を検討した。また、耐凍剤(エチレングリコール:EG)の効果を糖で置き換えることが可能かどうかを比較検討した。その結果、EG区(糖無添加区)に比較して、溶血阻止効果が有意に高かったのは、各糖の0.4M区、シュークロース0.2M区および、トレハロース0.6M区であった。

また、耐凍剤添加区(EG)と無添加区を比較した結果、無添加区の溶血度が有意に高かった。これにより、耐凍剤(EG)を糖で置き換えることは困難であることが明らかとなった。

緒 言

牛胚凍結保存液には細胞膜保護の目的でトレハロースやシュークロースなどの添加が行われている。しかし、胚を用いた試験では結果がでるまで長期間を要し、より効果の高い添加剤のスクリーニングには適していない。そこで、牛胚での試験を行なう前段階として、牛赤血球を用いて細胞膜保護効果を推定・比較する方法すなわち、凍結融解刺激により破壊され溶出したヘモグロビンの割合を比較することによる添加剤の溶血阻止効果(細胞膜保護効果)の比較を行い、希少糖の効果と最適濃度を検討した。

また、耐凍剤(エチレングリコール)の効果を糖で置き換えることが可能かどうかを比較検討した。

材料及び方法

1. ヘモグロビンの測定法

静岡県畜産試験場報告第24号「牛胚凍結保存液に用いる添加剤の細胞膜保護効果の推定」に準じて実施した。被検サンプル100 μ lとラウリル硫酸ナトリウム(SLS)を含むヘモグロビン発色試薬50 μ l(ヘモグロビンB-テストワコー:和光純薬)を96穴マイクロプレート(NUNC)で混合し、マイクロプレートリーダー(IMMUNO-MINI-NJ-2300:Inter Med)を用いて540nmで吸光度を測定した。

2. 試験条件の検討

本試験の条件で吸光度を測ることによって、溶血度を判定することの正否について検討した。黒毛和種3頭から採取した血液をD-PBS(GIBCO)を用いて900rpm・5分・3回洗浄し、上清を分離した後、D-PBSで100倍希釈した血球浮遊液を各々10本ずつ作成した。これらを基準サンプルとし、20、40、60、80、100%の溶血度になるように標準液を作成し、吸光度を測定した。

1)香川県農林水産部畜産課、2)香川県西部家畜保健衛生所、3)香川大学医学部

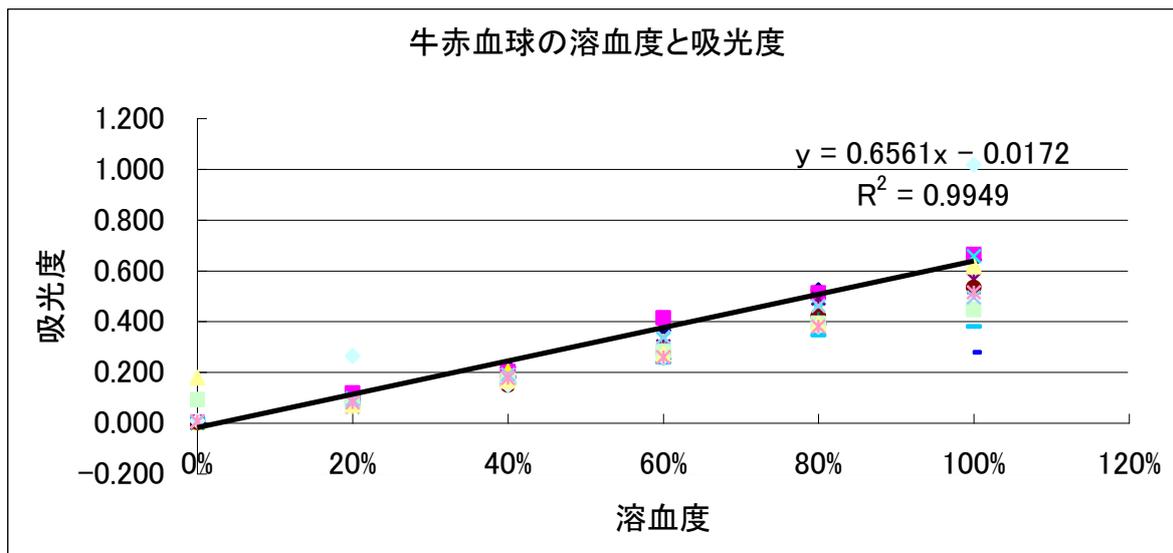


図1：牛赤血球の溶血度と吸光度

その結果、図1のとおり、 $y=0.6561x-0.0172$ という回帰曲線が得られ、相関係数は0.99と高い値を示したので、以後の試験にこの方法を採用した。

3. 試験方法

試験1：凍結保存液への糖添加による牛赤血球の溶血阻止効果の比較

- (1) 供試験体：牛赤血球(黒毛和種雌3頭)
- (2) 供試糖：D-アロース (A 1 1、単糖、分子量 180)、D-プシコース (Psi、単糖)、シュークロース (Sue、二糖類、分子量 342)、トレハロース (Tre、二糖類)、グルコース (Glu、単糖)。
比較した添加濃度は、0.1M、0.2M、0.4M、0.6M、0.8Mの5段階。

(3) 試験区分 (凍結保存液)

EG区 (糖無添加)：20%CS+PBS+1.8MEG

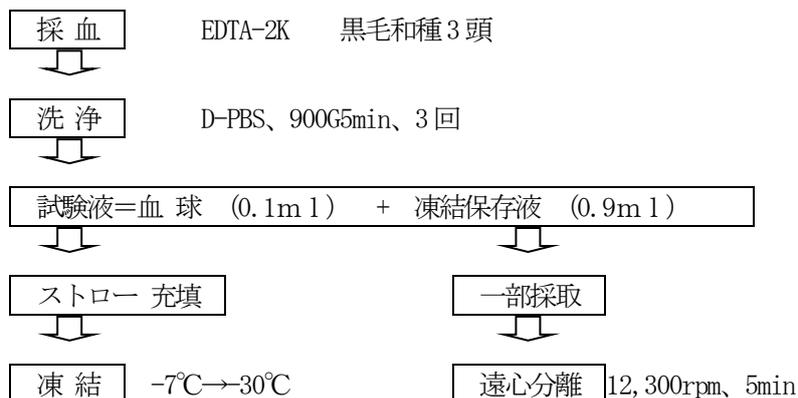
糖添加区：20%CS+PBS+1.8MEG+糖

Cont区：20%CS+PBS

*CS：非働化牛血清、PBS：D-PBS GIBCO、EG：エチレングリコール (耐凍剤)

(4) サンプルの調製

黒毛和種3頭から採血した血液をD-PBSで3回洗浄後、凍結保存液で10倍希釈して試験液とし、この一部を遠心分離し、その上清を0%溶血サンプルとした。残りは、胚移植用ストロー(0.25ml)に吸引・凍結し、30分以上液体窒素浸漬後、融解し、試験液を凍結保存液で10倍希釈後、一部採取したものを100%溶血サンプルとし、遠心分離した上清を試験サンプルとした。



希少糖を用いた牛胚の凍結保存に関する試験

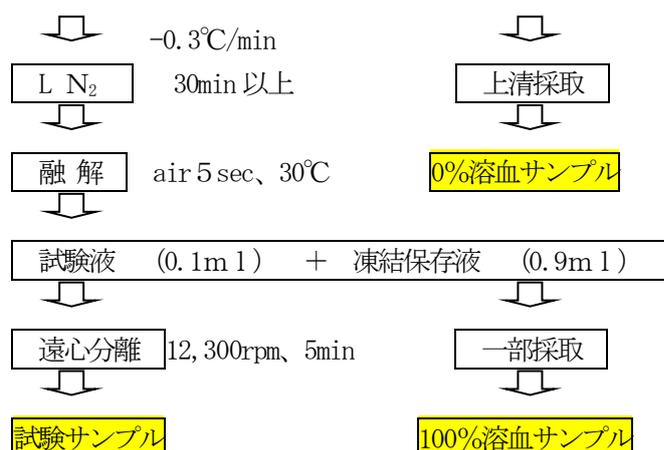


図2：サンプル調製

(5) 凍結・融解方法の条件

ダイレクト法(胚において、耐凍剤除去を行わず、融解後そのまま移植する凍結法)

- ・凍結前処理：15～20分間耐凍剤の平衡を行い、ストローに封入。
- ・凍結方法：-7°Cの冷却槽（プログラムフリーザー：FHK ET-1）にストローを入れ、約5分後に植氷し、10分間保持、-30°Cまで-0.3°C/分で冷却後、液体窒素（-196°C）に30分以上浸漬。
- ・融解方法：液体窒素からストローを取り出し、空気中に5秒間保持後、30°Cの微温湯で20秒。

(6) ストローの構成(図3)

Air	試験液	Air	試験液	綿栓
-----	-----	-----	-----	----

植氷は、綿栓横の試験液部分に実施し、融解後の試験液は、Air部分を切断して回収した。

(7) 溶血度の判定

$$\text{溶血度} = \frac{\text{試験サンプルの吸光度} - \text{0\%溶血サンプルの吸光度}}{\text{100\%溶血サンプルの吸光度} - \text{0\%溶血サンプルの吸光度}}$$

(8) 試験回数

三反復

試験2：凍結保存液への耐凍剤の添加の有無の比較

(1) 供試験体、(2) 供試験糖は、試験1と同じ。ただし、比較した糖の添加濃度は、0.2M、0.4M、0.6M、0.8Mの4段階。

(3) 試験区分（凍結保存液）

耐凍剤添加区（EG添加、糖無添加）：20%CS+PBS+1.8MEG

耐凍剤無添加区（EG無添加、糖添加）：20%CS+PBS+糖

Cont区：20%CS+PBS

*CS：非働化牛血清、PBS：D-PBS GIBCO、EG：エチレングリコール（耐凍剤）

(4) サンプルの調製、(5) 凍結・融解方法の条件、(6) ストローの構成、(7) 溶血度の判定、(8) 試験回数は、試験1と同じ条件で実施した。

結果及び考察

試験1：凍結保存液への糖添加による牛赤血球の溶血阻止効果の比較

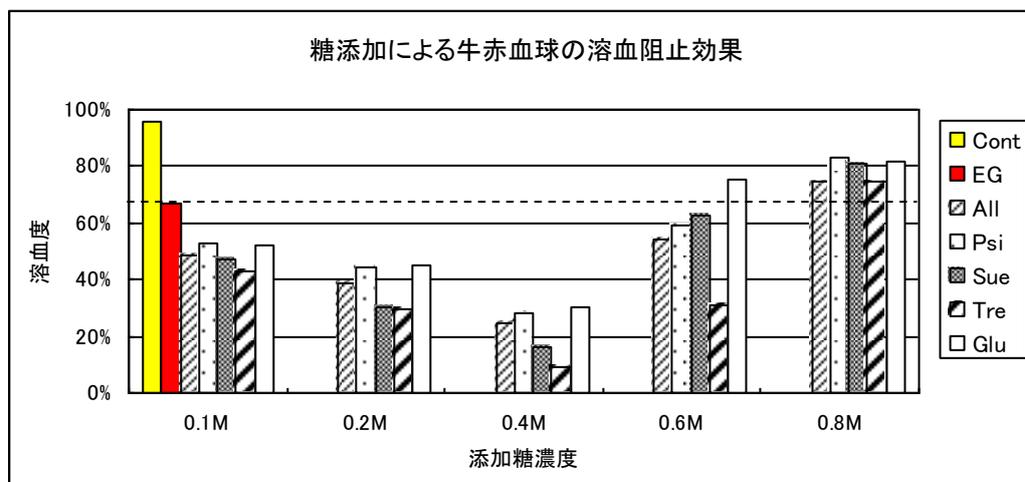


図4：糖添加による牛赤血球の溶血阻止効果

- EG区（糖無添加区）に比較して、溶血阻止効果が有意に高かったのは、各糖の0.4M区、シュクロース0.2M区および、トレハロース0.6M区であった。それ以外の試験区では、EG区と有意差はなかった。静岡県畜試の報告では、1.8MEG+0.4%BSAに0.1Mのシュクロース、トレハロース、グルコースを添加し、溶血阻止効果があったことを報告しているが、今回の試験では異なった結果となった。この要因としては、三反復実施した凍結試験結果、0.1M区におけるバラツキが大きかったためと思われる。

表1. 各糖の0.4M区における溶血阻止効果

凍結保存液	溶血度					
EG	67.2±15.2%	EG				
Glu0.4M	30.0±3.3%	*	Glu0.4M			
Psi0.4M	28.1±7.5%	*		Psi0.4M		
All0.4M	25.0±2.8%	**			All0.4M	
Sue0.4M	16.0±4.3%	**	*		*	Sue0.4M
Tre0.4M	9.0±4.8%	**	**	*	**	Tre0.4M

** : P<0.01, * : P<0.05

- D-アロースの溶血阻止効果は、D-プシコース、グルコースと有意差が無く、シュクロース、トレハロースに比べて有意に低かった。
- D-プシコースの溶血阻止効果は、D-アロース、シュクロースおよび、グルコースと有意差が無く、トレハロースに比べて有意に低かった。
- トレハロースの溶血阻止効果は、シュクロースのそれと差は無かったが、その他の糖に比べて有意に高かった。
- トレハロースとシュクロースの効果には差が見られなかったこと、分子量が大きな糖(二糖類)が単糖類に比べ、高い溶血阻止効果を示したことについては、静岡県畜試の報告と軌を一にするものと思われる。

希少糖を用いた牛胚の凍結保存に関する試験

試験2：凍結保存液への耐凍剤の添加の有無の比較

	溶血度	
耐凍剤添加区 (EG)	74.7±3.2%	EG
耐凍剤無添加区		
A110.2M	97.5±2.2%	**
A110.4M	90.7±2.6%	**
A110.6M	90.2±2.5%	**
A110.8M	89.6±2.4%	**
Psi0.2M	92.2±9.8%	*
Psi0.4M	91.0±1.6%	**
Psi0.6M	90.4±6.3%	*
Psi0.8M	94.7±0.5%	**
Sue0.2M	92.7±1.4%	**
Sue0.4M	88.4±1.0%	**
Sue0.6M	87.2±4.5%	*
Sue0.8M	89.1±2.3%	**
Tre0.2M	94.0±5.3%	**
Tre0.4M	89.8±1.6%	**
Tre0.6M	88.6±3.4%	**
Tre0.8M	88.9±2.2%	**
Glu0.2M	97.1±1.9%	**
Glu0.4M	89.5±3.8%	**
Glu0.6M	93.3±1.2%	**
Glu0.8M	89.1±6.3%	*

・耐凍剤添加区(EG)と無添加区を比較した結果、無添加区の溶血度が有意に高い結果となった。これにより、耐凍剤(EG)を糖で置き換えることは困難であることが分かった。

**: $P < 0.01$ 、*: $P < 0.05$

表2. 耐凍剤添加区と無添加区の比較

参考文献

斉藤 美英、野田 準一、佐野 文彦、三宅 晃次：牛胚凍結保存液に用いる添加剤の細胞膜保護効果の推定
静岡県畜産試験場研究報告第24号，5-8，1997