

家畜バイテクセンターが生産する凍結体外受精卵の取扱いについて

卵通信ミニ（技術編 Vol.2）の「凍結体外受精卵の取扱い」に関連する「詳細情報」を解説します。

1. 家畜バイテクセンターの体外受精卵の凍結方法

家畜バイテクセンター（以下、当センター）が生産・供給する凍結体外受精卵は、前報で解説したとおり、媒精後7日目と8日目に発生した拡張胚盤胞を直接移植法（ダイレクト法）で凍結保存して、種雄牛センター経由で移植技術者等に配布しています。具体的には、媒精日を0日目として、7日目の午前・午後と8日目の午前中に拡張胚盤胞まで発育した卵を耐凍剤（10%グリセリン）の入った溶液で平衡後、形態が回復した受精卵のみをダイレクト移植用凍結媒液（10%グリセリン+0.25M ショ糖）で凍結します。

2. 凍結卵の取り扱いおよび融解移植の際の留意事項

ダイレクト法で凍結された当センターの体外受精卵の取扱や融解・移植に際しては以下のような点について留意することが重要となります。

1) ストローの液体窒素保管中や識別する際の留意事項

液体窒素中に保存された凍結卵を含むストローを取り出す際に、キャニスターをボンベの入り口付近に持ち上げて作業を行うことがよくありますが、外気に一定時間以上曝露して、ストロー内の温度が危険温度域の -100°C を越えないように留意することが重要です。

この温度以上にストローが曝露された場合には脱ガラス化が起きて、再度液体窒素に戻した場合には再氷晶が形成（以下の2）②参照）されて生存性が低下します。

ストローが外気に曝露されないようにするために、ストローが液体窒素中に浸漬された状態を保つことを推奨しています。具体的には、①キャニスターの底を塞ぐ、②ケーン付き試験管内にストローを入れて、キャニスターに保存する等、ボンベの入り口付近までキャニスターを持ち上げてもストローが液体窒素中に浸漬された状態を保つように工夫をすることが重要です（図1参照）。

図1. 凍結体外受精卵の保管中および取扱い時の留意事項

1. 液体窒素ボンベの温度分布

液体窒素ボンベ内部は -192°C ~ -194°C ですが、蓋を開けて長時間経つと、入り口付近は -100°C ~ -150°C となります。

2. 外気への曝露時間の影響

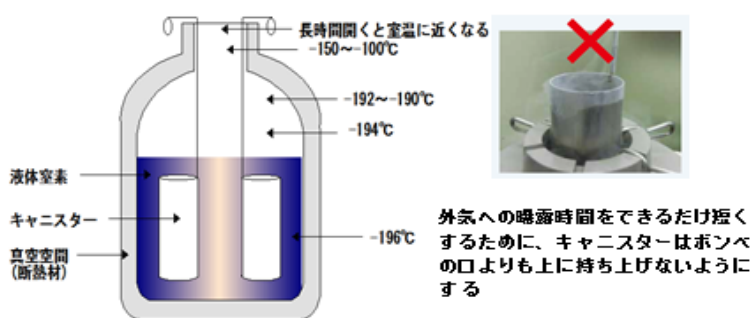
ストローの入ったキャニスターを持ち上げて、確認のために短時間でもストローを直接外気にさらすとストロー内部の温度が上昇します。必要以上に外気に曝露すると温度が上がります。

-100°C を超えるとストロー内の卵細胞の脱ガラス化が始まり、再度液体窒素に戻すと再氷晶形成が起きて、卵細胞が傷害を受けます。（図3. 参照）

3. 外気曝露を防ぐための方法

ストローの取り出しや検査時に、外気の曝露を防止する方法として、以下の2つの方法があります。

- 1) ストローを入れるキャニスターの底を塞ぐ。キャニスターを持ち上げても、ストローが液体窒素内に浸漬されている状態を保つ。（写真1）
- 2) ケーン付き試験管にストローを保管し、キャニスターを持ち上げてもストローが液体窒素中に浸漬された状態を保つ。（写真2）



外気曝露時間 (秒)	ストロー内温度 ($^{\circ}\text{C}$)
0	-196.0
5	-119.2
10	-84.2
30	-27.4



写真1



写真2

2) マニュアルの指示通りの融解方法の励行とその必要性（融解時の傷害発生の機序）

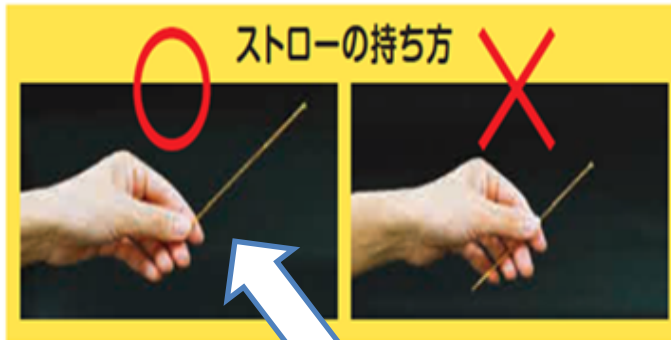
凍結体外受精卵を融解するには、以下のようなマニュアル通りの方法で行うことが重要です（図2参照）。

- 空气中保持は、無風状態の環境下で10秒間保持（その間、ストローは振らない）
- 温湯中保持は、30～35℃の温湯中に投入して10秒間保持

図2. 凍結体外受精卵の融解方法



融解の際の保持時間や温湯の温度は、タイマーや温度計で正確に測定する



綿栓部分を持ってください

- ① ストローをピンセットで液体窒素から取り出し
- ② 空气中融解は、無風状態の環境下で10秒間保持（その間、ストローは振らない）
注) 無風状態にする工夫の例
- 車内であればエアコンを切る
- バケツ中など囲いのあるスペースを作る 等
- ③ 温湯中融解は、予め準備した30～35℃の温湯中に投入して10秒間保持
- ④ ストローの保持や移植器に装着する際には、受精卵の入っているカラムの部分に手指が触れないように注意する（温度感作を避ける）
- ⑤ 融解後はできるだけ速やかに移植を行うために、融解前に受精卵の保定や検査を行う

融解の際の空气中保持時間や温湯の温度は、その受精卵の供給機関によって異なります。当センターの体外受精卵の融解は、このマニュアルにある指示通りの方法で行うことが必要です。昨年度の「体外受精卵移植技術者会議」における実態調査の結果では、必ずしも指示通りの方法（温度、保持時間）で融解が行われていない機関も散見されました。

他の供給機関から指示のあった融解方法と混乱して、当センターの指示通りの方法で融解されなかったと推察されますが、当センターの凍結体外受精卵を指示通りの方法で融解しないと、以下のような傷害が起きて受胎率が低下する可能性があります。

① フラクチャー傷害

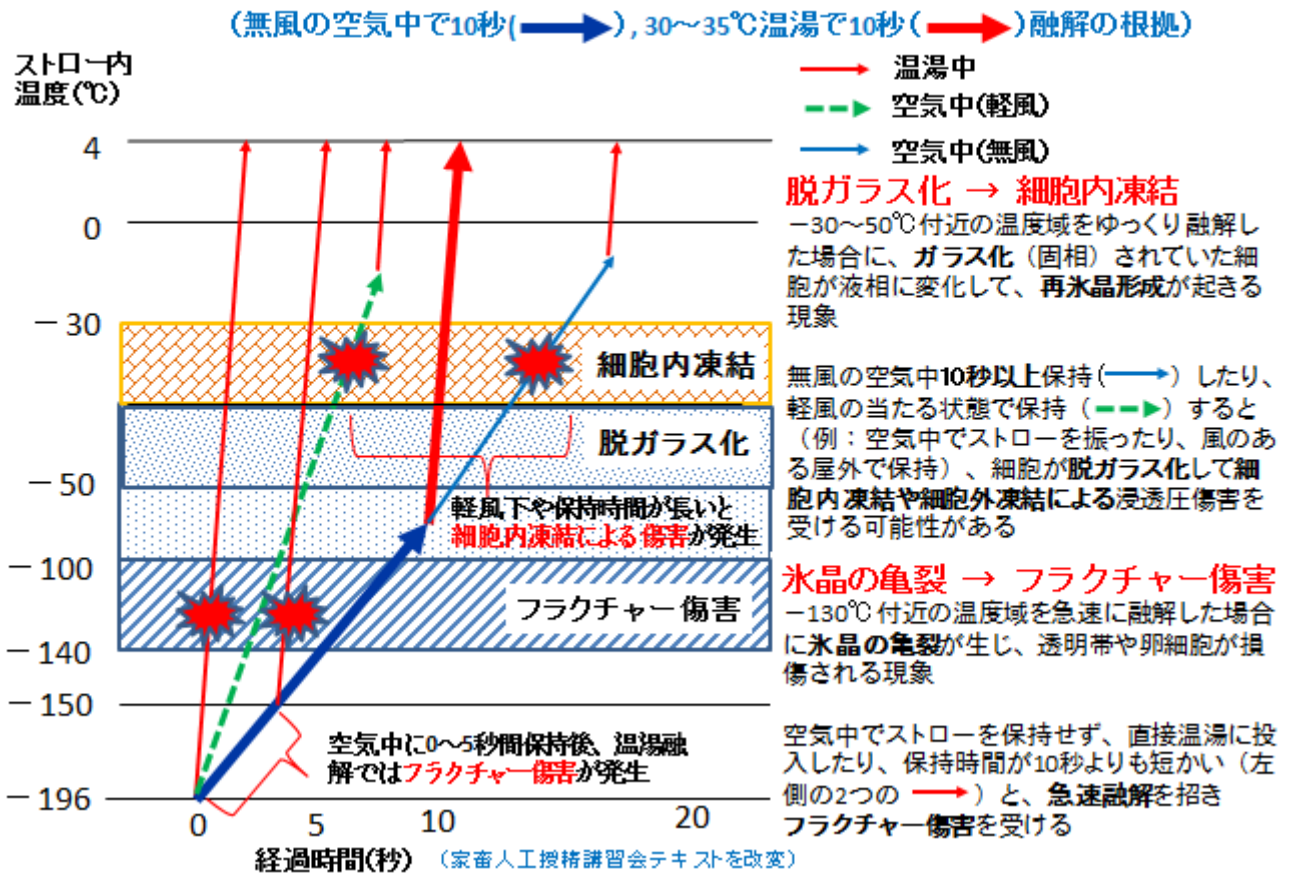
液体窒素から取り出したストローを直接温湯中に投入したり、空气中の保持時間が10秒間よりも短くなると、-130℃付近の温度域で急速融解が起き、ストロー内の氷晶の亀裂が生じて、透明帯や細胞質に損傷が生じ、受精卵の生存性が損なわれます。

② 脱ガラス化による細胞内再氷晶形成

空气中でストローを振って軽風（顔に風を感じる程度の強さ）がストローに当たる状態となったり、あるいは10秒以上長く保持すると、-30～-50℃付近の温度域をゆっくり通過するので、ガラス化されていた細胞が液層に変化した後再度凍結され傷害を受けます。

（図3参照）

図3. 凍結体外受精卵の融解方法の違いによる傷害の発生機序



空气中での融解は無風状態で 10 秒間保持することが必要ですが、もし、ストローを空气中で振れば「軽風」と同様な状況となるため留意が必要です。また、ストローを空气中で保持をする時に軽風が吹いている屋外で行ったり、車内でエアコンの風を受ける場所などで行うと、たとえ 10 秒間保持したとしても融解が進み、上記の②の再氷晶形成が起きて傷害を受ける場合もあるので、無風の状態を作れるような工夫(車内のエアコンを止める、囲いやバケツの中で空气中融解する等)をすることが必要です。

凍結卵の供給機関によっては、空气中の保持時間を「5 秒から 10 秒間」と指示している場合もありますが、当センターの凍結卵も同様と考えて、仮に 10 秒よりも短い保持時間とし、温湯中で融解した場合には、①のフラクチャー傷害が発生して、受胎率を低下させる可能性があります。

3) 融解後の移植までの経過時間の短縮の必要性

ダイレクト法の凍結受精卵は、いずれの凍結方法でも、移植までの経過時間が受胎率に影響する可能性があります。一般的には、融解後 15 分以内に移植を終了することが推奨されおり(堂地, LIAJ News,69 (2001), 家畜診療, 54, 8 457-465,(2007))、当センターの凍結体外受精卵の移植に際しても、融解後移植までの経過時間をできるだけ短くすることが重要です。

特に、当センターが用いているダイレクト法の耐凍剤は 10%グリセリン+0.25M ショ糖溶液です。この耐凍剤溶液の耐凍能は優れているものの、融解後ストロー内の受精卵がこの溶液内で一定時間以上保持されると生存性や受胎性が低下する可能性を示唆する報告(大谷ら,繁殖技研誌, 11, 14-19(1989))があることから、留意が必要です。

また、最近、子宮角の深部移植が可能となる牛受精卵深部注入カテーテル(商品名:「YT ガン」(株)ヤマネテック、「モ 4 号」ミサワ医科工業)を用いた移植が多くなっていますが、従来の移植器に比べると、操作に慣れるまでは融解後のストローを移植器に装着を完了するまでの時間が長くなるだけでなく、注入用カテーテルを子宮角深部へ挿入する時間長くなり、かえってダイレクト法の凍結体外受精卵の受胎性を低下させる可能性があります。

以上のことから、当センターの凍結体外受精卵の移植にあたり、移植を急ぐ余り焦って手技が雑になってしまうことは避けなくてはなりません。融解後移植終了までの時間を短くすることが重要となります。

移植対象頭数が複数の場合には全て凍結卵を一度に融解せず、受卵牛1頭ごとに1本ずつ融解し、融解後移植終了までの経過時間を短くするための工夫が重要となります。