

# ユーロコリンズ液による卵巣保存

億 正樹 浦田博文 大西桂史 青山 譲

## 要 約

採取した牛卵巣をリンゲル液で洗浄後、15°C、20°C、室温（20～28°C）のそれぞれ気相中にて24時間保存後成熟培養を行ない、成熟培養開始後18、20、22、24時間に第1極体の放出を観察した。15°C、20°C保存での極体放出はそれぞれ85.4%、82.1%と差は認められなかったが、室温保存では27.8%と著しく低下し、変性卵率が48.6%と上昇していた。また、15°C、20°Cでの極体放出のピークは、20時間後、22時間後に認められ、20°C保存では若干成熟が早まる傾向が認められた。

次に、保存温度を15°Cとし、気相中を対照として、リンゲル液浸漬、ユーロコリンズ液浸漬を比較した。気相中での第1極体放出率は64.1%に対し、リンゲル液51.7%、ユーロコリンズ液70.1%であった。また、気相中での変性卵率は13.2%に対し、リンゲル液19.5%、ユーロコリンズ液3.0%であり、ユーロコリンズ液浸漬が最も良好であった。

## 緒 言

体外授精や核移植に用いる未成熟卵子は、屠体から採取した卵巣を20°Cのリンゲル液等で保存し、6時間以内に成熟培養を開始しなければならない。しかし、牛海綿状脳症（BSE）の発生により屠殺当日の卵巣の持ち出しが禁止され、卵巣採取後直ちに食肉流通センター検査室で冷蔵し、検査終了後の翌朝8時に持ち出しの許可が出るまで、約22時間保存しなければならなくなった。その後輸送に2時間程度かかるため、卵巣採取から成熟培養まで約24時間かかり、発生率が著しく低下した。そこで、分離腎保存液であるユーロコリンズ液による卵巣保存法を検討した。

## 材料及び方法

### 試 験 1 （保存温度の比較）

卵巣の保存法は、卵巣採取後リンゲル液で数回洗浄後、卵巣のみを蓋を開放したデュアー瓶に入れクーリングインキュベーターで保存し、再び蓋をして当所に持ち帰り成熟培養を開始した。なお、卵巣採取から成熟培養までに要した時間は24時間であった。成熟培養は、既報<sup>1)</sup>に基づき行なった。すなわち卵巣の5mm以下の小卵胞から未成熟卵子を18G注射針で吸引し、卵丘細胞が緊密に付着しているものを選別して、5%FCS加TCM-199培地で5%CO<sub>2</sub> in airの環境下で培養した。そして培養後18、20、22、24時間後に、ピペット及びヒアルロニダーゼにて卵丘細胞を除去し、

### ユーロコリンズ液（100ml中）

リン酸1水素カリウム	740mg
リン酸2水素カリウム	205mg
塩化カリウム	112mg
炭酸水素ナトリウム	84mg
ブドウ糖	3.5g

### リンゲル液（100ml中）

塩化ナトリウム	860mg
塩化カリウム	30mg
塩化カルシウム	10mg

表-1 保存液の組成

成熟率の指標とするため第1極体の放出率を経時的に観察した。

試験区として保存温度を15℃、20℃、室温保存の3区設定した。なお室温の保存時は20℃で24時間後の卵子吸引時は28℃であった。

### 試験 2 (保存液の比較)

牛卵巣の保存方法は基本的には試験1と同様で、保存温度は試験1で最も良好な温度に設定した。成熟培養開始24時間後に卵丘細胞を除去し、第1極体の放出率を観察した。

試験区として3区設定し、何も入れない気相を対照として、リングル液浸漬保存、ユーロコリンズ液浸漬保存(表-1)を比較した。

### 結果

極体放出のピークは、15℃では20時間後、20℃では22時間後に認められ、20℃保存では若干成熟が早まる傾向が認められた。一方、室温保存では極めて低いレベルで推移した(図-1)。15℃保存での、極体放出は85.4%、20℃保存では82.1%と、僅かに15℃が良い成績であったが両者はほぼ同じレベルであった。室温保存では27.8%と著しく低下し、変性卵率が48.6%と上昇していた(図-2)。以上の結果から試験2の保存温度は15℃に設定した。

保存液の比較では、気相中の第1極体放出率は64.1%であるのに対し、リングル液51.7%、ユーロコリンズ液70.1%であった。

変性卵率は気相中の13.2%に対し、リングル液19.5%、ユーロコリンズ液3.0%であり、ユーロコリンズ液浸漬が最も良好であった(図-3)。

### 考察

24時間保存した牛卵巣由来未受精卵子の発生能について、いくつかの報告はなされている。しかし、その多くが生理食塩水にて保存しており、24時間卵巣を保存しても胚盤胞まで発生はするものの、その発生は発生率が低下する

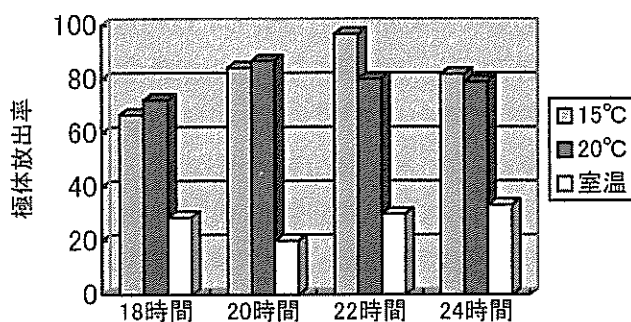


図-1 第1極体放出率の推移

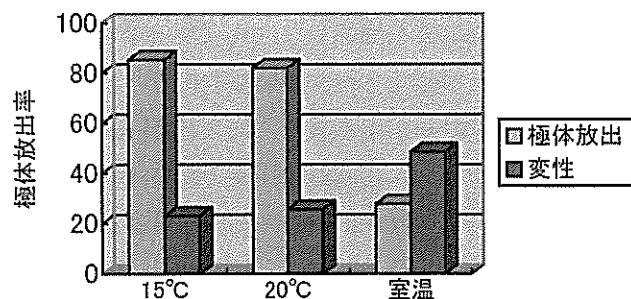


図-2 極体放出率及び変性卵率の比較

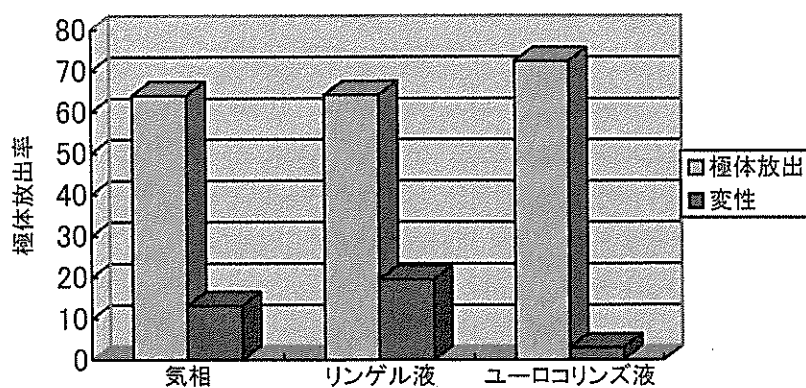


図-3 保存液

と報告<sup>2)3)4)</sup>している。

細胞には細胞外液と細胞内液があり、常にナトリウムポンプが働き、細胞外液は高ナトリウムに、内液は高カリウムな状態に保たれている。しかし、温度低下に伴い、ナトリウムポンプの働きが弱まり、細胞内液のナトリウム濃度が高まり細胞は死滅してしまう。これまで行なっていた卵巣の保存方法は、細胞外液に近い組成の生理食塩水やリンゲルを使用し保存しており、まさしくこのことが起こっていたと考えられる。

分離腎保存液であるユーロコリンズ液は、腎臓移植等に用いる臓器を、浸漬保存するために開発された保存液であり、その組成はリンゲル液に比べると、ナトリウムとカリウムの濃度が逆転している。このような低ナトリウム液に保存すると、細胞内に進入してくるナトリウム量が減少するため、温度低下によりナトリウムポンプの働きが低下しても細胞内のナトリウム濃度は上昇せず細胞は死滅しない。

本実験ではユーロコリンズ液浸漬保存が最も良好で、次いで気相保存が良好な成績であった。ユーロコリンズ液浸漬保存では、卵丘細胞の付着も良好で肉眼的には長時間保存していないものと変わらない状態であった。しかし、気相保存では培養成績が安定せず、保存容器の下部に貯留する浸出液や洗浄液が、悪影響を及ぼしたと考えられる。

今回の実験では、ユーロコリンズ液浸漬保存が最も良好であったが、発生率を向上させるためには、ユーロコリンズ液浸漬保存温度を再検討し、保存卵巣由来の未受精卵子を用いた発生培養試験を実施する必要がある。

#### 参考文献

- 1) 高野博、小山圭介、小財千明、(1990)、奈良県畜産試験場報告、17：1-6
- 2) 佐藤 隆 (1997)、農業関係試験場バイオテクノロジー等先端技術開発研究成果、2：79-83
- 3) 安部茂樹、岡崎尚之、長谷川清寿 (1996) 日本胚移植研究会雑誌、18 (2)：106-112
- 4) 上田修二、平嶋善典、北原利孝 (1995) 九州農業研究成果情報、10：151-152