

P-127 マウス卵細胞のvitrification法における凍結保護剤の至適平衡時間について

山形大

斉藤英和、河内谷敏、野原理、斉藤隆和
伊藤真理子、中原健次 広井正彦

〔目的〕 胚細胞を凍結保存するのにプログラムフリーザーを用いる方法は複雑で時間を要するために、近年vitrification法が臨床に導入されようとしている。そこで細胞毒性の低いtrehalose、Ficollを用いたvitrification法の至適条件を検討した。(方法) B6C3F1 マウスを過排卵させ8細胞期卵を採取し凍結保護剤に1, 2, 5, 10, 20, 40min.とそれぞれ平衡させた後液体窒素にて急速凍結した。融解は摂氏20度の浴槽に10秒つけた後段階的に希釈し培養液に移した。培養後blastocyst形成率を観測すると共に5-bromo-2-deoxyuridine(BrdU)を加えて姉妹染色分体交換(SCE)を計測した。これらにより決められた至適条件で凍結融解した卵としない卵(対照)についてhexokinase(HK), malate dehydrogenase(MDH)を酵素サイクリング法にて計測した。(成績) blastocystへの発育率は対照で74.1%、平衡時間1~40min.まで順に45.2%, 58.5%, 62.1%, 60.2%, 61.3%, 59.1%であった。SCEも順に 13.4 ± 0.7 (平均 \pm 平均標準誤差) 21.6 ± 1.2 , 17.8 ± 1.8 , 11.9 ± 1.0 , 17.8 ± 1.8 , 17.9 ± 0.8 , 20.4 ± 0.7 であり至適平衡時間は5分と考えられた。平衡時間を5分に設定し凍結融解した卵と対照卵のHK活性は 2.70 ± 0.23 p mol of NADPH formed/embryo/hour, 2.67 ± 0.23 p mol of NADPH formed/embryo/hourであり、MDH 64.0 ± 3.24 p mol of NAD formed/embryo/min., 60.1 ± 7.36 p mol of NAD formed/embryo/min.であり両者に糖代謝能の差を認めなかった。(結果) trehalose、Ficollを用いたvitrification法では至適平衡時間は5min.であり、これは卵細胞の発育に与える影響を最小限にする時間であると考えられた。

P-128 合成代用血清の体外受精、初期胚発育に及ぼす影響

山形大学

平山寿雄、木原香織、森亜紀子、広井正彦

〔目的〕 体外受精、初期胚発育に用いられる培養系への蛋白補充物質として、最近合成血清の開発がなされassisted reproductive technology(ART)に応用されつつある。Synthetic Serum Substitute (SSS)は albumin, α -, β -globulinを主成分とした合成代用血清である。SSS添加の培養環境が体外受精、初期胚発育に及ぼす影響を検討した。

〔方法〕 B6C3F1雌マウスをPMS(10IU)+hCG(10IU)にて過排卵処置後未受精卵を回収し、同系雄精巢上体精子と in vitroで受精させた。培養系はHuman tubal fluid(HTF) mediumを用いて、対照は bovine serum albumin(BSA) 5mg/ml添加群(BSA群)とし、SSS 10%(V/V)添加群(SSS群)の2群において、受精率、胚盤胞への発育率、hCG投与後72、96、120時間の胚の卵割球数を指標として評価した。胚卵割球数の測定は各培養時間後固定、Hoechst 33342にて染色し蛍光顕微鏡にて行った。〔成績〕 受精率はBSA群179/195(91.7%)、SSS群197/214(92.0%)であり良好な受精現象がみられた。受精卵の胚盤胞への発育率はBSA群170/179(94.9%)、SSS群188/197(95.4%)であり両群間に有意差はみられなかった。また、hCG投与後72, 96, 120時間後の胚卵割球数はBSA群で 11.2 ± 0.7 , 55.1 ± 0.8 , 131.8 ± 2.8 , SSS群で 14.5 ± 0.4 , 61.1 ± 0.9 , 132.0 ± 2.7 (M \pm SE)とSSS群で胚発育段階の初期において卵割促進効果がみられた($p < 0.05$)。〔結論〕 体外受精、初期胚発育環境において、SSSは受精環境に好影響を及ぼし、胚発育初期段階の発育促進効果を示すことが明かとなった。SSSは他の血清等に比して調整も極めて簡便であり、初期胚発育を促進することより、ATRへの応用も期待できることが示唆された。