Cryopreservation of Unfertilized Rat Oocytes by Ultrarapid Freezing

Naomi NAKAGATA

*Nippon Institute for Biological Science, 2221-1 Shinmachi, Ome-shi, Tokyo 198 and Central
Laboratory for Medical Sciences, Division of Pathology, School of Medicine,
Juntendo University, 2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan*

(Received 21 February 1992/Accepted 15 May 1992)

Unfertilized rat oocytes were placed in a highly concentrated solution of cryoprotectant (DAP 224 : 2 M dimethylsulphoxide, 2 M acetamide, 4 M propylene glycol in PBI) in 0.5ml sampling tubes and then immediately immersed into liquid nitrogen ; thawing was conducted in a 37°C waterbath. After thawing, 630 out of 968 oocytes (65.1%) were morphologically normal. After insemination in vitro of cryopreserved oocytes, the proportion of pronuclear oocytes with spermtail (s), male (s) and female pronuclei (8–10 h post insemination), and 2-cell embryos with two identical blastomeres (28–30 h post insemination) was 60.8% (152/250) and 29.8% (99/131), respectively. One hundred and fifty oocytes that were judged as pronuclear oocytes under the inverted microscope 8–10 h after insemination were transferred to the oviducts of pseudopregnant recipients ; 18.7% (28/150) of the oocytes developed to normal young. — KEY WORDS : ultrarapid freezing, unfertilized rat oocytes

超急速凍結法を用いたラット未受精卵の 凍結保存について

中 潟 直 己

財団法人日本生物科学研究所
順天堂大学医学部共同病理研究室

従来、実験動物の未受精卵の凍結保存に関し、マウス [1, 3, 5, 6, 8, 9, 13], ハムスター [8, 9, 12] ラット [7, 9] およびスナネズミ [9] において報告が成されているが、融解後の生存性および発生能は受精卵および胚に比べ、一般に低いのが現状である [2, 4]。また、融解した未受精卵を体外受精し、得られた胚を移植することにより産児が得られているのは、マウスのみであり [1, 3, 5, 6, 13], その他の動物種についてはまったく報告が成されていない。最近、著者は超急速的に凍結したマウス未受精卵において、融解後、良好な生存性および発生能が得られたことを報告した [5, 6]。そこで本実験では、ほぼ

同様な超急速凍結法を用いてラット未受精卵の凍結保存を試み、融解後の生存性、受精能および新生児への発生能について検討した。

材料および方法

供試卵：卵子は 10 iu PMSG と 10 iu hCG により、過排卵処理を施した Wistar-Imamichi 系幼若雌ラット（4 週齢）の卵管膨大部より、hCG 投与後 15～16 時間に採取し、0.1% hyaluronidase を含む HTF 培地内 [10] で卵丘細胞を除去した裸化卵子を凍結実験に供した。

Table 1. The survival rate of cryopreserved rat oocytes after thawing

No. frozen	No. recovered	No. morphologically normal
998	968 (97.0)	630 (65.1)

Fig. 1. Appearance of cryopreserved rat oocytes after thawing. About two thirds of the oocytes were morphologically normal.

凍結・融解：凍結・融解操作はほぼ前報 [5, 6] に従ったが、保存液および融解操作に若干の改良を加えた。即ち、卵子は直接サンプリングチューブ (volume: 0.5 ml, Sarstedt Co., Ltd) 内の20~30 μ l の DAP 224(dimethyl sulphoxide 2 M, acetamide 2 M, propyleneglycol 4 M in PB1) に移した後 (1 サンプリングチューブ当たり25~30個) 5~10秒以内に、直接、液体窒素中に浸漬することにより行なった。融解は凍結してから1~30週間後に液体窒素保管器よりサンプリングチューブを取り出し、37℃の温水中に移すと同時に、37℃の0.5 M sucrose 溶液を0.4ml サンプリングチューブ内に加え、DAP 224 を希釈、その内容液を時計皿に移し、5分間静置した後、卵子の回収を行なった。続いて、回収卵子を約20~30 μ l の内容液と共に、HTF 培地内 (0.2ml) に移した後5分間静置、さらに HTF 培地で3回、卵子を洗浄、それら卵子の形態的検査を行なった。

体外受精および得られた受精卵の移植：体外受精は Toyoda らの方法 [11] に従った。即ち、精子は Wistar-Imamichi 系成熟雄 (5~6カ月齢) の精巢上体尾部より採取し、HTF 培地に懸濁、さらにその一部を0.4ml の HTF 培地に導入し(精子濃度: 200 cells/ μ D), 5~6時間の前培養を行なった (37℃ 5% CO₂ in air)。続いて、

形態的に正常と判定された卵子を精子懸濁液に移し、媒精を行なった。卵子の受精能についての観察は媒精後8~10時間にホルマウント標本を作製することにより行なった。また、倒立顕微鏡下で第2極体、精子尾部および雌雄前核を確認した一部の前期受精卵を偽妊娠第1日目 (膈栓確認日) のレシピエント (Long-Evans 系雌ラット: 3~4カ月齢) の卵管内へ移植した。さらに、残りの卵子については引き続き20時間 (媒精後28~30時間) 体外培養し、2細胞期への発生について検討した。尚、卵丘細胞を除去した裸化卵子を単に体外受精したものを対照区とした。また、凍結卵子の体外受精成績および移植成績について、 χ^2 検定により、未凍結卵子の成績と比較検討した。

成 績

Table 1 に融解時において形態的に正常と判定された卵子の割合を示す。凍結卵998個の内、融解後、968個を回収、その内の65.1%に当たる630個が形態的に正常であった (Fig. 1)。

体外受精成績：媒精後8~10時間にホルマウント標本を作製することにより観察した受精成績を Table 2 に示す。第2極体、精子尾部および雌雄前核を有する正常な受精卵 (Fig. 2) の割合は、検査卵250個中152個 (60.6%) であり、その内の21個が多精子受精卵であった。また、媒精28~30時間後に2細胞期へ発生した卵子の割合は29.8% (39/131) と低値であった (Table 3 および Fig. 3)。一方、対照区における受精率および2細胞期へ発生率は、それぞれ88.0% (125/142) および86.2% (75/87) と、凍結卵のそれらと比較すると、有意に高値を示した ($p > 0.05$)。

移植成績：媒精後8~10時間に実体顕微鏡および倒立顕微鏡下で第2極体、精子尾部および雌雄前核の有無により判定した前期受精卵の割合は61.0% (152/249) であり、その内の150個をレシピエントへ移植した結果、28匹 (18.7%) の新生児が得られた (Table 4 および Fig. 4)。しかしながら凍結融解卵子より得られた前期受精卵の新生児への発生率は対照区 (53.6%, 44/82) と比較すると明らかに低い値であった ($p > 0.05$)。

考 察

本実験結果から、簡略な超急速凍結法によりラット未受精卵の凍結保存が可能となり、それら凍結・融解卵は体外受精により、受精し、少なくともその一部は新生児

Table 2. The fertilization rate of cryopreserved rat oocytes 8-10 h after insemination *in vitro*

Group	No. of oocytes examined	No. of oocytes fertilized*		
		Total(%)	Monospermic	Polyspermic
Frozen-thawed	250	152 (60.8)	131	21
Control(unfrozen)	142	125 (88.0)	107	18

* Pronuclear oocytes(oocyte with sperm tail(s), and male(s) and female pronuclei)

Fig. 2. Cryopreserved rat oocyte examined 8 h after insemination. A fertilized oocyte showing sperm tail (arrow), and male and female pronuclei.

Fig. 3. Appearance of cryopreserved and *in vitro* fertilized rat oocytes at the 2-cell stage 28 h after insemination. Only one third of the cryopreserved oocytes developed to normal 2-cell embryos.

Table 3. Development of 2-cell embryos from cryopreserved rat oocytes 28-30 h after insemination *in vitro*

Group	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes developed to 2-cell stage*
Frozen-thawed	131	39 (29.8)
Control(unfrozen)	87	75 (86.2)

* 2-cell embryos with two identical blastomeres

Table 4. Development to live young of pronuclear oocytes derived from cryopreserved rat oocytes after transfer to pseudopregnant recipients

Group	No. of recipients used	No. of 1-cell embryos transferred	No. of animals which delivered live young	No. of live young		
				♀	♂	Total(%)
Frozen-thawed	9	150	7	16	12	28 (18.7)
Control(unfrozen)	6	82	6	24	20	44 (53.6)

Fig. 4. Twenty-one-day-old young developed from cryopreserved oocytes fertilized in vitro, with their recipient mother

へ発生することが知られた。

Parkeningら [8] は、種々の冷却速度で幼若ラットより採取した未受精卵を緩慢凍結した結果、0.33℃/minの冷却速度で最も良好な値が得られたが、融解時の形態的正常卵の割合は18% (21/117) で、その内わずか38% (8/12) が受精したにすぎなかったことを報告している。Niwa らも [7] 幼若ラットの未受精卵を凍結し、融解後、その生存性について検討した結果、融解時の形態的正常卵の割合は、回収卵のわずか14~24%であり、正常な受精卵あるいは2細胞期へ発生した卵子の割合は、その内の28.6~48.3%であったと報告している。本実験における融解時の形態的正常卵の割合、受精率および2細胞期へ発生した卵子の割合は、これら報告に比べ、高い値であった。しかしながら、受精率が60.8%であったにもかかわらず、2細胞期へは29.8%しか発生せず、異常分割卵あるいは不等分割卵などの異常受精卵が高頻度に観察されたこと、さらに、移植卵に対する新生児への発生率はわずか、18.7%と極めて低く、発生が進むにつれて急激にその割合が低下することから、一見、形態的には正常でも、凍結-融解操作に起因した何らかの傷害が、卵子内に起こっている可能性が強く示唆された。

採卵時の雌ラットの週齢について、Parkeningら [8] は幼若および成熟ラットより得られた卵子を凍結し、融解後の生存性について比較検討した結果、成熟ラット卵子の方が幼若ラットのそれと比べ、有意に高い生存性が得られることを報告している。今回、本実験で用いたラットは4週齢の幼若ラットであり、必ずしも良好な生存性が得られなかったことから、今後、成熟ラット卵子の超急速凍結も検討する必要があると思われる。

要 約

室温にて卵子をサンプリングチューブ内の DAP 224 (dimethyl sulphoxide 2 M, acetamide 2 M, propylene glycol 4 M in PB1) に移した後、直ちに、液体窒素中に浸漬することにより、ラット未受精卵の超急速凍結を行なった。また、融解は37℃の温水中で行なった。融解後に、回収した卵子の中で、形態的に正常と判定された卵子数は、968個中630個 (65.1%) であった。これら卵子の体外受精成績、即ち、媒精8~10時間後にホルマウント標本を作製することにより観察した受精率 (前核期へ発生した卵子の割合) および媒精後28~30時間に2細胞期へ発生した卵子の割合はそれぞれ60.8% (152/250) および29.8% (39/131) であった。また、媒精後8~10時間に倒立顕微鏡下で前核期受精卵と判定した150個の凍結卵を偽妊娠雌卵管へ移植した結果、18.7% (28/150) が正常な新生児へ発生した。

本研究は、本文部省科学研究費重点領域研究 No. 01619005の一部として実施された。

文 献

- [1] Carroll, J., Warnes, G. M., and Matthews, C. D. (1989). Increase in digyny explains polyploidy after in-vitro fertilization of frozen-thawed mouse oocytes. *J. Reprod. Fert.*, **85**, 489-494.
- [2] Friedler, S. F., Giudice, L. C., and Lamb, E. J. (1988). Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil. Steril.*, **49**, 743-764.
- [3] Glenister, P. H., Wood, M. J., Kirby, C., and Whittingham, D. G. (1987). Incidence of chromosome anomalies in first-cleavage mouse embryos obtained from frozen-thawed oocytes fertilized in vitro. *Gamete Research*, **16**, 205-216.
- [4] Leibo, S. P. (1986). Cryobiology: preservation of mammalian embryos. *Basic Life Sci.*, **37**, 251-271.
- [5] Nakagata, N. (1989). High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. *J. Reprod. Fert.*, **87**, 479-483.
- [6] Nakagata, N. (1990). Cryopreservation of unfertilized oocytes from inbred strains by ultrarapid freezing. *Exp. Anim.*, **39**, 303-305.
- [7] Niwa, K., Kasai, M., and Iritani, A. (1979). Fertilization in vitro of rat eggs after freezing and thawing. *Jap. J. Zootech. Sci.*, **50**, 747-752.
- [8] Parkening, T. A., Tsunoda, Y., and Chang, M. C. (1976). Effects of various low temperature, cryoprotective agents and cooling rates on the survival, fertilizability and development of frozen-thawed mouse eggs. *J. Exp. Zool.*, **197**, 369-374.
- [9] Parkening, T. A. and Chang, M. C. (1977). Effect of cooling rates and maturity of the animal on the recovery and fertilization of frozen-thawed rodents

- eggs. *Biology of Reproduction*, **17**, 527-531.
- [10] Quinn, P. Q., Kerin, J. F., and Warnes, G. M. (1985). Improved pregnancy rate in human *in vitro* fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril*, **44**, 493-498.
- [11] Toyoda, Y. and Chang, M. C. (1974). Fertilization of rat eggs *in vitro* by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer. *J. Reprd Fert.*, **36**, 9-22.
- [12] Tsunoda, Y., Parkening, T. A., and Chang, M. C. (1976). *In vitro* fertilization of mouse and hamster eggs after freezing and thawing. *Experimentia*, **32**, 223-224.
- [13] whittingham, D. G. (1977). Fertilization *in vitro* and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at -196°C . *J. Reprod Fert.*, **49**, 89-94.