家兎卵子の凍結保存試験

発育ステージ別にみた凍結融解後の生存性

角田幸生・下洞義之*・和泉邦昭*・相馬 正・杉江 信

(農林水産省畜産試験場 *湧永薬品株式会社中央研究所)

BANK & MAURER¹⁾, WHITTINGHAM & ADAMS²⁾ は、マウス受精卵の凍結保存に用いられた方法³⁾ を家兎受精卵の凍結保存に応用し、凍結融解卵を移植して受胎例を得た。その後、家兎受精卵の凍結保存で多くの生存胎児あるいは産子が得られている⁴⁻⁹⁾。マウスでは 1 細胞期から胚盤胞期に至るいずれの発育ステージの凍結保存卵を用いても、それらの産子生産率には、ほとんど差異がないと報告¹⁰⁾ されている。これに対して家兎では 2 細胞卵の凍結融解後の生存率が低く⁷⁾、8 細胞～桑実期の受精卵が凍結保存に用いられている。しかし、家兎受精卵では発育ステージ別に凍結融解後の生存性を詳細に検討した報告は少ない^{7,11)}。本実験は -196°C の液体窒素中に保存された家兎卵子の生存性について卵子の発育ステージによる差異を検討したものである。

実験材料及び方法

供試家兎は、New Zealand White 種で、生体重 3.0～4.0 kg の成雌である。これらの家兎はいずれも供試前 1 カ月以上予備的に飼育して健康状態や妊娠の有無を確かめた後実験に用いた。

供試した受精卵は、FSH と HCG の組み合わせによる過排卵処置¹²⁾ を施した後、あるいは HCG のみ投与後に交尾させた家兎の生殖器官から、所要のステージによって交尾後種々の時間に採取したものである。すなわち 1 細胞期は交尾後 20 時間目、2 細胞期は 25 時間、8～16 細胞期は 45 時間、桑実期は 65 時間、胚盤胞期は 96 時間または 120 時間目にそれぞれ採卵を実施した。4 日齢胚盤胞の約半数は過排卵処置家兎から、残り半数及び 5 日齢胚盤胞は、過排卵処置を施さず HCG だけを投与

後交尾させた家兎から採取した。未受精卵は HCG 投与後 18～20 時間目に卵管から採取し、卵丘細胞が付着している場合は毛細ガラスピペットで吸引操作をくり返すことによって卵丘細胞を除去した。なお採取した卵子は凍結開始まで 1～2 時間 37°C 中に保管した。

凍結は既法⁷⁻⁹⁾ に従って卵子を 1 ml のプラスチックストローに入れて行った。すなわち耐凍剤に DMSO を用い、最終濃度が 1.5 M になるように 37°C で 3 回に分けて添加した後、毎分 1°C の速度で -76°C まで冷却し、ついで -100°C の液体窒素蒸気中に 5 分間静置後、最終的に -196°C の液体窒素中に浸漬して 1～49 日間保存した。融解は既法⁷⁻⁹⁾ に従って毎分 $3\sim 4^{\circ}\text{C}$ の割合で温度を上昇させて行い、 37°C で DMSO を段階的に除去した後、家兎血清を 20% 加えた Ringer 液に卵子を移してその形態を観察した。

形態的に正常と認められた受精卵のうち一部のものは既法⁹⁾ に従って 3～7 日間体外培養し、その後の発育の有無を検査した。なお 1 細胞期及び 2 細胞期を用いた場合は 4 細胞期以上に発育した卵子を、また 8～16 細胞期及び桑実期を用いた場合は胚盤胞期以上に発育した卵子を、さらに胚盤胞を用いた場合は胚腔が培養前に比べて顕著に増大した卵子を、それぞれ培養によって発育したものと判定した。さらに一部の受精卵は排卵時期を同期化させた偽妊娠家兎の生殖器官に移植して卵子の生存性を判定した。これらの受精卵移植においては 1 細胞、2 細胞及び 8～16 細胞期のものはいずれも卵管に、桑実胚は卵管または子宮に、胚盤胞は子宮に移植を行った。受精卵を移植した recipient は移植後 12～20 日に腹部の触診を行い、妊娠の成否を判定し、さらに分娩の有無を観察した。

卵子の生存性の指標として融解後正常形態に回復した卵子の割合、培養により発育した卵子の割合、移植による受胎率及び産子生産率について検討したが、これらの結果に関しては χ^2 検定により有意差の有無を判定した。

The survival of rabbit eggs stored in liquid nitrogen at different developing stages.

TSUNODA, Yukio, Yoshiyuki SHIMOHARA*, Kuniaki IZUMI*, Tadashi SOMA & Tadashi SUGIE (National Institute of Animal Industry, Chiba-shi 280 and *Laboratory of Wakunaga Pharm. Co., Hiroshima 729-64)

Japan. J. Anim. Reprod. 25 (4), 1979.

Table 1. Effect of developing stages of eggs on the morphology and *in vitro* development of frozen-thawed rabbit eggs

Developing stage of eggs frozen and thawed	No. of eggs frozen	No. of normal eggs after thawing (%)	No. of eggs cultured	No. of eggs developed (%)
Unfertilized	21	5 (23.8)	—	—
1-cell	141	47 (33.3)	26	11 (42.3)
2-cell	166	50 (30.1)	17	12 (70.6)
8~16-cell	143	102 (71.3)	67	53 (79.1)
Morula	99	88 (88.9)	38	27 (71.1)
Day 4-blastocyst	46	3 (6.5)	3	2 (66.7)
Day 5-blastocyst	44	6 (13.6)	17	0 (0)

Table 2. Development to term after transfer to recipients of frozen-thawed rabbit eggs at various developing stages

Developing stage of eggs frozen and thawed	No. of recipients	No. pregnant (%)	No. of eggs transferred	No. of live young (%)
1-cell	3	0	18	0
2-cell	5	2 (40.0)	26	4 (15.4)
8~16-cell	4	3 (75.0)	32	7 (21.9)
Morula	6	5 (83.3)	36	12 (33.3)
Day 4-blastocyst	2	0	19*	0
Day 4-blastocyst	3	0	18*	0

* Including degenerated eggs.

実験成績

凍結融解後正常な形態を有する卵子及び体外培養後発育した受精卵の割合を発育ステージ別に表 1 に示す。表示のごとく、融解後正常な形態を有する卵子の割合は桑実期卵で最も高く (88.9%), ついで 8~16 細胞期卵で (71.3%), 両者の間には統計的に有意な差がみられた ($p < 0.001$)。発育ステージの若い受精卵と発育の進んだ胚盤胞及び未受精卵では、凍結融解後正常な形態を示す卵子 (写真 1, 2) の割合が著しく低く (6.5~33.3%), いずれも上記 2 区に比べて有意な差がみられた。 ($p < 0.001$)。また正常な形態を有していた受精卵を用いての体外培養試験成績では、2 細胞~4 日齢の胚盤胞の 67~79% が発育を継続した。2 細胞期の大部分のものが桑実期に発育し、一部のものは胚盤胞 (写真 3) にまで達した。8~16 細胞期から 4 日齢の胚盤胞期までの各期の卵の培養では、大部分のものがさらに増大した胚盤胞に発育し、一部のものは透明帯から胚胞が完全に脱出した “hatched blastocyst” (写真 4) まで発育した。1 細胞期を用いた場合は、2 細胞期~4 日齢の胚盤胞で得られた成績に比べて発育した卵子の割合が有意に低かった

($p < 0.001$)。この 1 細胞期の培養で最も発育の進んだステージは桑実期であった。5 日齢胚盤胞は、凍結融解後大部分のものに胚胞の極端な萎縮が観察された (写真 5)。これらの卵子は培養により、形態的に復元したものの (写真 6) もみられたが、発育を継続して凍結前の状態よりも大きく発育したものはなかった。

凍結保存後融解した受精卵を recipient に移植することによって得られた妊娠率及び産子生産率を表 2 に示す。すなわち 2 細胞, 8~16 細胞及び桑実期の受精卵の移植によりそれぞれ受胎例が得られたが、1 細胞期あるいは胚盤胞の移植では受胎例は得られなかった。また受胎率ならびに産子生産率は桑実期の凍結保存卵の移植で最も高く (83.3% 及び 33.3%), ついで 8~16 細胞期卵の移植で (75.0% 及び 21.9%), 2 細胞期卵の移植 (40.0% 及び 15.4%) の順序で低くなった。しかしながらこれらの差異はいずれも統計的に有意ではなかった。なお桑実胚の移植では 18 個を 3 頭の recipient の卵管に、残り 18 個を 3 頭の recipient の子宮にそれぞれ移植したが、受胎例はそれぞれ 2 例と 3 例、産子生産率は両方とも 6/18, 33.3% で、移植の部位によって受胎率ならびに産子生産率に顕著な差異は認められなかった。

考 察

著者らは前報⁷⁾において凍結保存した家兎 2 細胞、8～16 細胞及び桑実期卵の移植試験で、桑実胚を用いた場合に最も高い産子生産率を得たことを報告したが、本実験ではさらに 1 細胞期に至る各发育ステージの家兎受精卵について、凍結保存試験を実施し、融解後の生存性について検討した。本実験で得られた成績は前報⁷⁾とほぼ一致した傾向を示した。すなわち融解後の卵子の形態、体外培養試験及び移植試験の成績はいずれも桑実期の受精卵を用いた場合に最も好い結果が得られた。しかしながら今回実施した移植試験では、2 細胞～桑実期の各ステージ間の産子生産率の差はいずれも統計的に有意ではなく、前報⁷⁾とは異なる結果になった。これは桑実期を用いた移植試験の産子生産率が前報⁷⁾の 64% に比べて極端に低かったことによるものと考えられる。

尾川・友田¹¹⁾は家兎受精卵について、アルブミン層を有するものと有しない各ステージの卵をそれぞれ -80°C に凍結保存した。彼ら¹¹⁾は、融解後の卵子の形態検査及び培養試験で生存性を検討した結果、アルブミン層を有する卵は融解後全く生存しなかったが、アルブミン層を有しないものは 1 細胞期を除いていずれのステージでも生存率に大差が認められないことを観察している。本実験では、実験条件が異なるためか、これとは異なる結果が得られた。

本実験では、凍結融解された家兎 1 細胞期の受精卵移植によって産子が得られなかった。なお現在まで家兎 1 細胞期受精卵の凍結保存後の移植で産子が得られたとの報告はみあたらない。また 2 細胞期の凍結保存卵移植で得られた産子の生産例は、著者らの前報⁷⁾と本実験における例だけであり、家兎の初期ステージの受精卵凍結で好結果が得られない要因については、まだ明らかにされていない。

マウス¹³⁾、ラット^{14,15)}、山羊¹⁶⁾、綿羊^{17,18)}及び牛¹⁹⁻²²⁾ 卵子の凍結保存で胚盤胞がきわめて有効に用いられているが、本実験では凍結保存した家兎胚盤胞の移植によって受胎例は全く得られなかった。家兎卵は他の動物のものに比べて胚盤胞になってからの増大が著しく、交配後 96 時間目の胚盤胞では直径が 273 μ 、120 時間目では 1,066 μ に達する²³⁾ことが知られている。本実験で用いた凍結融解の方法は、この様に増大した胚盤胞の凍結条件に適合しておらず生存性に悪影響を及ぼしたのではないかと考えられる。家兎胚盤胞の凍結保存では、初期の分割卵の場合と同様に、今後さらに凍結融解の条件を検

討する必要があるものと考えられる。

マウス、²⁴⁻²⁵⁾、ハムスター²⁴⁾、ラット^{27,25)}、ジャービル^{27,25)}及び家兎¹¹⁾では、未受精卵を凍結融解後、体外受精を行うことによってそれぞれ受精卵が得られている。本実験で凍結融解後得られた形態的に正常な家兎未受精卵の受精能に関する検討もまた今後に残された問題の 1 つになると考えられる。

8～16 細胞卵及び桑実胚の凍結保存後の生存性は、融解後の形態ならびに培養による発達に関する限りでは、ほぼ同じ凍結融解法を用いて得られた前報^{7,8)}の成績に比べて大差はなかった。しかしながら凍結融解した受精卵移植による産子の生産率 (21.9% 及び 33.3%) は前報^{7,8)} (49% 及び 64%) に比べて明らかに低かった。この原因は凍結保存技術あるいは移植技術の微妙な失敗によったものか、または donor 及び recipient の生理的あるいは遺伝的相違によるかは明らかではなく、今後に残された問題と考えられる。

要 約

FSH 及び HCG を用いて過排卵処置を施した New Zealand White 種の成雌兎から、HCG 注射後 18～20 時間目に採取した未受精卵、发育ステージを考慮して交尾後 20～96 時間の各時期にそれぞれ採取した 1 細胞～胚盤胞期の受精卵、及び過排卵処置を施さず HCG のみを注射して交尾後 96 ならびに 120 時間目に採取した胚盤胞を、-196°C の液体窒素中に 1～49 日間凍結保存し、各发育ステージ別に融解後の生存性を比較検討した。なお耐凍剤として 1.5 M DMSO を用い、凍結時の冷却速度は -76°C までは 1°C/分 にし、ついで -100°C の液体窒素ガス中に移し、さらに液体窒素中に浸漬して保存した。また融解は 3～4°C/分 の速度で温度を上昇させて行った。結果の概要は次のようである。

1. 凍結融解後正常な形態を示す卵子の割合は用いた卵子のステージによって相違し、桑実期で最も高く (88.9%)、ついで 8～16 細胞期であり (71.3%)、他の发育ステージならびに未受精卵では低く (6.5～33.3%)、これらの差異はいずれも統計的に有意であった。

2. 凍結融解後正常な形態を示した受精卵を体外培養した結果では、5 日齢の胚盤胞を除くと、いずれのステージの受精卵でも培養中に发育することが認められた。しかし 1 細胞期の受精卵は培養中发育したものの割合が統計的に有意に低かった (42.3%)。しかし他のステージの受精卵ではステージ別にみて生存性に差異はなく、培養した卵子のそれぞれ 67～79% のものが发育した。

3. 凍結融解後正常な形態を示した受精卵の移植試験では、2細胞期、8~16細胞期及び桑実期を用いた場合に受胎例が得られ、子が生産された。また妊娠率及び産子生産率では、桑実期を用いた場合に最も高い傾向がみられ(88.3%及び33.3%), ついで8~16細胞期で(75%及び21.9%), 2細胞期(40%及び15.4%)の順に低くなる傾向がみられたが、これらの差異はいずれも統計的に有意ではなかった。1細胞期及び胚盤胞期の受精卵を移植した場合には受胎例は得られなかった。

なお本研究の一部は、昭和53年度春季家畜繁殖研究会シンポジウム「受精卵の保存と移植」において報告した。

終わりに、御校閲いただいた当繁殖部長渋谷佑彦博士に深謝する。

(1979. 5. 2 受付)

文 献

- 1) BANK, H. & R. R. MAURER: *Exp. Cell Res.* **89**, 188, 1974.
- 2) WHITTINGHAM, D. G. & C. E. ADAMS: *Cryobiology* **11**, 560, Abstr. 1974.
- 3) WHITTINGHAM, D. G., S. P. LEIBO & P. MAZUR: *Science* **178**, 411, 1972.
- 4) MAURER, R. R. & J. K. HASEMAN: *Biol. Reprod.* **14**, 256, 1976.
- 5) WHITTINGHAM, D. G. & C. E. ADAMS: *J. Reprod. Fert.* **47**, 269, 1976.
- 6) OGAWA, S. & S. TOMODA: *Exp. Anim.* **25**, 273, 1976.
- 7) TSUNODA, Y. & T. SUGIE: *J. Reprod. Fert.* **49**, 173, 1977.
- 8) TSUNODA, Y. & T. SUGIE: *J. Reprod. Fert.* **50**, 123, 1977.
- 9) 角田(幸)・相馬(正)・杉江(信): 家畜繁殖誌 **24**, 157, 1978.
- 10) WHITTINGHAM, D. G.: Proceedings of the workshop on Basic Aspects of Freeze Preservation of Mouse strains, p. 45, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1975.
- 11) 尾川(昭)・友田(仁): 明大農研報 **32**, 27, 1974.
- 12) 角田(幸)・入谷(明)・西川(義): 日畜会報 **49**, 89, 1978.
- 13) WHITTINGHAM, D. G.: *J. Reprod. Fert.* **37**, 159, 1974.
- 14) 内海(恭)・湯原(正): 岡大農学報 **42**, 24, 1974.
- 15) 内海(恭): 家畜繁殖誌 **24**, xxx, 1978.
- 16) BILTON, R. J. & N. W. MOORE: *Aust. J. biol. Sci.* **29**, 125, 1976.
- 17) WILLADSEN, S. M., C. POLGE, L. E. A. ROWSON, & R. M. MOOR: *J. Reprod. Fert.* **46**, 151, 1976.
- 18) WILLADSEN, S. M., C. POLGE, A. O. TROUNSON & L. E. A. ROWSON: In the Freezing of Mammalian Embryos, Ciba Foundation Symposium **52** (New series), p. 192, Excerpta Medica, Amsterdam, 1977.
- 19) WILMUT, I. & L. E. A. ROWSON: *Vet. Rec.* **92**, 686, 1973.
- 20) BILTON, R. J. & N. W. MOORE: *J. Reprod. Fert.* **50**, 363, 1977.
- 21) WILLADSEN, S. M., C. POLGE, A. O. TROUNSON & L. E. A. ROWSON: In The Freezing of Mammalian Embryos, Ciba Foundation Symposium **52** (New series), p. 190, Excerpta Medica, Amsterdam, 1977.
- 22) WILLADSEN, S. M., C. POLGE & L. E. A. ROWSON: *J. Reprod. Fert.* **52**, 391, 1978.
- 23) ADAMS, C. E.: *J. Endocr.* **16**, 283, 1958.
- 24) TSUNODA, Y., T. A. PARKENING & M. C. CHANG: *Experientia* **32**, 223, 1976.
- 25) PARKENING, T. A., Y. TSUNODA & M. C. CHANG: *J. Exp. Zool.* **197**, 369, 1976.
- 26) WHITTINGHAM, D. G.: *J. Reprod. Fert.* **49**, 89, 1977.
- 27) PARKENING, T. A. & Y. TSUNODA: *Anat. Rec.* **184**, 497, Abstr. 1976.
- 28) PARKENING, T. A. & M. C. CHANG: *Biol. Reprod.* **17**, 527, 1977.

Summary

The present study was undertaken to examine the effect of developing stages on the viability of rabbit eggs stored in liquid nitrogen.

One cell, 2-cell, 8~16-cell, morula and blastocysts were recovered respectively at 20, 25, 45, 65 and 96 or 120 h post coitum from mature New Zealand White rabbits induced to superovulate with FSH and HCG or rabbits injected with HCG (for the recovery of blastocysts). Unfertilized eggs were recovered 18 to 20 h after the injection of HCG from superovulated rabbits. The methods for freezing and thawing of eggs were conducted with the procedures reported previously.⁷⁻⁹⁾ The samples were cooled to -76°C at $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and transferred to liquid nitrogen vapor at -100°C for 5 min. The samples were finally transferred to liquid nitrogen at -196°C and preserved for 1 to 49 days. At thawing, the samples were warmed at 3 to $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$. The eggs were washed with Ringer's solution containing 20% rabbit serum and cultured for 3 to 7 days to determine the number of developed eggs *in vitro*. In some experiments, the frozen-thawed eggs were transferred to the oviducts (for 1-cell, 2-cell, 8~16-cell and morula) or the uteri (for morula and blastocysts) of synchronous pseudopregnant does which allowed to go to term.

1. The proportion of eggs which appeared morphologically normal after thawing was significantly higher when morula was used for freezing (88.9%) than when 8~16-cell eggs were used (71.3%). When unfertilized and fertilized 1-cell, 2-cell or blastocysts were used for freezing, the proportions of normal eggs were clearly low (6.5 to 33.3%).

2. The frozen-thawed eggs of various developing stages developed in culture except Day 5-blastocyst. The proportion of 1-cell eggs developed in culture was significantly low (42.3%) compared with those obtained by using other stages of eggs (66.7 to 79.1%).

3. The live young were obtained after transfer of frozen-thawed 2-cell, 8~16-cell and morula but not after transfer of eggs at 1-cell and blastocysts. Although the proportions of pregnant and live young obtained after transfer of frozen-thawed morula were slightly high (88.3 and 33.3%) compared with those obtained after transfer of 2-cell (40.0 and 15.4%) and 8~16-cell (75.0 and 21.9%), these difference were not significant.