耐凍剤および凍結融解法が -196°C に保存された 家兎桑実胚の生存性に及ぼす影響

南 直治郎・細井美彦・葛西孫三郎
丹羽皓二・入谷 明

(京都大学農学部)

1972 年、マウス胚の凍結保存の成功が報告され¹⁾、まもなく家兎胚も同様に凍結保存しうることが見出された²⁾。以来現在までに凍結融解家兎胚の生存性に及ぼす品種²⁻⁵⁾、発育ステージ^{2,4,6,7)}、保存液⁸⁾、 0°C までの冷却速度⁴⁾、耐凍剤の濃度^{2,3)}、その添加温度^{2,6)}、平衡時間^{2,3)}、植氷⁴⁾、凍結融解速度^{2,3,9-12)}、保存期間¹³⁾、耐凍剤の除去方法^{2,6,9)}、受卵個体との同期性¹⁴⁾などの影響が知られてきた。しかし、すべての研究で耐凍剤として DMSO が用いられており、他の耐凍剤が家兎胚の凍結保存に有効か否かを比較した研究は、2 細胞期胚について融解後の形態をしらべた 1 例¹²⁾以外ほとんどみられない。さらに、従来の報告では基本的に緩慢凍結—緩慢融解法が用いられているが、マウス¹⁵⁾およびラット¹⁶⁾では耐凍剤によっては緩慢凍結—急速融解法や急速凍結—急速融解法でも高い生存率の得られることが明らかにされている。そこで本実験では、家兎で最も耐凍性が高いと思われている桑実胚⁷⁾について、DMSO と同等ないしはすぐれた耐凍剤を探索し、同時に耐凍剤と凍結融解法との相互関係を、従来報告されているマウスやラット胚における成績と比較検討した。

材料と方法

成熟雌家兎を FSH および hCG を用いて、角田らの方法¹⁷⁾に従って過排卵処理後雄と交配させ、交配の 60～65 時間後に 20% 家兎不活化血清を加えた修正リン酸緩衝生理食塩水¹⁸⁾ (血清加 PBS)、あるいは 20% 同血清添加修正 Tyrode 液¹⁹⁾ (血清加 Tyrode) を用いて卵管を灌

流して桑実期の受精卵を採取した。血清加 PBS で胚を洗浄後、形態的に正常な桑実胚を 5～15 個ずつ 0.2 ml の保存液 (室温) を入れたガラス試験管に移した。保存液には血清加 PBS に耐凍剤として DMSO, Ethylene glycol, Glycerol あるいは Erythritol を 1.5 M 加えたものを用いた。5～15 分後、試験管を室温のエチルアルコールの入った容器に移し、ドライアイス小片をアルコールに加えることにより $1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の速度で -4°C まで冷却し、同温度で植氷後、約 5 分間放置した。緩慢凍結するサンプルは、 $1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の速度で -76°C まで冷却した後、 -196°C の液体窒素中に保存した。また急速凍結するサンプルは、植氷後 -20°C のエチルアルコールの入った容器に移して、10 分間放置し、さらに -100°C の液体窒素ガス中に 10 分間静置後 -196°C の液体窒素中に浸漬した²⁰⁾。液体窒素中に 10～150 日間保存後、緩慢凍結したサンプルは、緩慢あるいは急速に、急速凍結したサンプルは急速に融解した。緩慢融解法では、 -196°C に保存されたサンプルを室温に放置したまま融解させ、急速融解法では、サンプルを 30°C ～ 35°C の水槽中で軽く振って融解させた。 -75°C ～ -10°C の間の融解速度はそれぞれ、毎分約 25°C および約 360°C であった。

融解された胚は、用いた耐凍剤 (1.5 M) および 0.5 M-sucrose を含む室温の PBS に移して収縮させ、約 2 分後 0.5 M-sucrose を含む PBS (室温) に移して耐凍剤を除去した²⁰⁾。2～4 分後胚を PBS で 2 回洗浄したのち、上部をパラフィンオイルで覆った血清加 Tyrode (0.4 ml) に浮遊させ、 37°C の炭酸ガス培養器内 (5% CO_2 , 95% 空気) で培養した。48 時間後に expanded blastocyst に発育した胚を生存胚と判定した。

結 果

表 1 に示すように、緩慢凍結—緩慢融解法を用いた場合、DMSO 区では、耐凍剤除去後形態的に正常と思わ

Effects of cryoprotectants and freeze-thawing procedures on the survival of rabbit morulae stored at -196°C .

MINAMI, Naojiro, Yoshihiko HOSOI, Magosaburo KASAI, Koji NIWA & Akira IRITANI (Department of Animal Science, College of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 606)

Japan. J. Anim. Reprod., 30(1), 1984.

Table 1. Effects of various cryoprotectants and freeze-thawing procedures on *in vitro* development of rabbit morulae after storage at -196°C

Freezing rates*	Thawing rates (C/min)	Cryoprotectant	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	No. of embryos morphologically normal after removal of cryoprotectants (%)**	No. of embryos developed to expanded blastocysts after 48 h in culture (%)**
Slow	25	DMSO	34	33	32 (97)	23 (70)
		Ethylene glycol	34	34	25 (74)	13 (38)
		Glycerol	33	29	15 (52)	7 (24)
		Erythritol	32	26	0 (0)	0 (0)
	360	DMSO	32	31	27 (87)	16 (52)
		Ethylene glycol	35	24	22 (92)	9 (38)
		Glycerol	34	33	18 (55)	4 (12)
		Erythritol	34	32	0 (0)	0 (0)
Rapid	360	DMSO	31	26	22 (85)	9 (35)
		Ethylene glycol	30	25	22 (88)	4 (16)
		Glycerol	31	27	22 (81)	1 (4)
		Erythritol	31	24	12 (50)	0 (0)

* See texts of the detailed freezing procedures.

** Percentage of the number of embryos recovered.

れる胚の割合は 97%, 培養後 expanded blastocyst まで発育した胚の割合は 70% でいずれも最も高く, ついで Ethylene glycol 区 (それぞれ 74% および 38%), Glycerol 区 (52%, 24%) の順であった。Erythritol 区では, 耐凍剤除去直後すでに正常な形態を有するものがなく, 胚の発育は全くみられなかった。緩慢凍結—急速融解法においては, 形態的に正常な胚の割合は緩慢凍結—緩慢融解法の場合に劣らず高い値であり, 培養後発育した胚の割合においても同様な傾向がみられたが, DMSO 区および Glycerol 区の発育率は低下した (52% および 12%)。一方, 急速凍結—急速融解法でも, 発育胚の割合は同様に, DMSO 区 (35%), Ethylene glycol 区 (16%), Glycerol 区 (4%) の順に低下したが, いずれも緩慢凍結—急速融解法の場合よりさらに低い値であった。Erythritol 区では, 形態的に正常な胚が回収されたが (50%) 胚の発育はみられなかった。

考 察

マウス¹⁵⁾およびラット¹⁶⁾の桑実胚では, 緩慢凍結後に緩慢および急速のいずれの方法で融解しても DMSO, Ethylene glycol あるいは Glycerol を用いた場合に比較的高い生存率が, また急速凍結—急速融解法でも DMSO (マウス) や Erythritol (ラット) で良好な成績が得られている。これに対して本実験における家兎胚で

は, DMSO を用いて緩慢に凍結融解した場合に胚の発育率が最も高く (70%), それに匹敵するか, あるいは上回る方法は見出されなかった。またいずれの凍結融解法でも発育率は DMSO 区で最も高くついで Ethylene glycol 区, Glycerol 区の順であった。この傾向は, 同じ 3 種の耐凍剤を用いて家兎 2 細胞期胚を緩慢に凍結融解した Tsunoda ら¹²⁾の結果ともほぼ一致することから, 家兎胚では発育ステージにかかわらず DMSO が適しており, Glycerol は不適當のように思われる。一方 Erythritol は, マウスおよびラット胚では急速融解した場合に, 胚の発育がみられたが, 家兎胚を用いた本実験では全く発育胚が得られなかった。しかし, 内海ら¹⁰⁾は 16% Erythritol を用いて家兎 early blastocyst を急速に凍結融解して, DMSO に匹敵する生存率が得られることを報告していることから, 諸条件を改善することにより桑実胚もうまく凍結保存しうるのかもしれない。

本実験では, いずれの区においても形態的に正常と思われる回収胚の割合に比べて発育胚の割合はかなり低かった。これは, 凍結融解過程や耐凍剤除去過程に胚が何らかの傷害を受けたものの, 実体顕微鏡下で形態的にそれらの傷害を的確に観察し得なかったためと思われる。この傷害の原因については明らかではないが, 分子量の比較的大きい Glycerol や, Erythritol 区での成績が悪

文 献

かったことから、大型胚で、しかも細胞数の多い家兎桑実胚への耐凍剤の侵入が不十分であったか、あるいは耐凍剤の除去過程で細胞内の耐凍剤が、完全に細胞外へ出ないうちに水分が流入したことなどが考えられる。耐凍剤の除去は、一般に等張液を徐々に添加して希釈する方法¹⁾が用いられているが、本実験ではマウス胚でその有効性が証明された²⁰⁾ sucrose を添加した高張液を用いて行った。その結果、最高 70% の発育率が得られたことから、やはり有効な方法であると思われるが、形態的にも異なる家兎胚では、さらに十分時間をかけて耐凍剤をゆっくり除去する必要があるかもしれない。

要 約

家兎桑実胚を DMSO, Ethylene glycol, Glycerol あるいは Erythritol (いずれも 1.5 M) を含んだ PBS に浮遊させ緩慢あるいは急速に凍結して、液体窒素中に保存した。緩慢凍結したサンプルは緩慢あるいは急速に、急速凍結したサンプルは急速に融解した。融解後 0.5 M-sucrose を含む PBS 中で耐凍剤を除去した後、血清加 Tyrode 液で約 48 時間培養して expanded blastocyst まで発育した胚を生存胚とした。その結果、緩慢凍結-緩慢融解法を用いた場合の生存率は DMSO 区で最も高く (70%)、ついで Ethylene glycol 区 (38%)、Glycerol 区 (24%) の順であった。緩慢凍結胚を急速融解した場合も同様の傾向がみられたが、DMSO 区 (52%) および Glycerol 区 (12%) の生存率は低下した。一方急速に凍結融解した場合の胚の生存率も DMSO 区 (27%)、Ethylene glycol 区 (16%)、Glycerol 区 (4%) の順に低下したが、いずれも 3 つの凍結融解法の中では最も低い値であった。Erythritol 区では、急速凍結を用いた場合を除いて、形態的に正常な胚さえも回収されず、いずれの凍結融解法でも、発育胚は得られなかった。以上の結果から、家兎桑実胚は DMSO を用いて、緩慢に凍結融解するのが最も適していると思われる。

(1983. 11. 28 受付)

- 1) WHITTINGHAM, D. G., S. P. LEIBO & P. MAZUR: *Science*, **178**, 411, 1972.
- 2) BANK, H. & R. R. MAURER: *Exp. Cell Res.*, **89**, 188, 1974.
- 3) MAURER, R. R. & J. K. HASEMAN: *Biol. Reprod.*, **14**, 256, 1976.
- 4) OGAWA, S. & S. TOMODA: *Exp. Anim.*, **25**, 273, 1976.
- 5) YUHARA, M., K. NISHIMURA & K. UTSUMI: *Cryobiology*, **15**, 689, 1978.
- 6) TSUNODA, Y. & T. SUGIE: *J. Reprod. Fert.*, **49**, 173, 1977.
- 7) 角田 (幸)・下洞 (義)・和泉 (邦)・相馬 (正)・杉江 (信): 本誌, **25**, 189, 1979.
- 8) TSUNODA, Y. & T. SUGIE: *J. Reprod. Fert.*, **50**, 123, 1977.
- 9) WHITTINGHAM, D. G. & C. E. ADAMS: *J. Reprod. Fert.*, **47**, 269, 1976.
- 10) 内海 (恭)・藤井 (好)・西村 (和)・湯原 (正): 本誌, **25**, 53, 1979.
- 11) 角田 (幸)・相馬 (正)・杉江 (信): 本誌, **27**, 157, 1981.
- 12) TSUNODA, Y., T. SOMA & T. SUGIE: Frozen storage of rabbit and hamster embryos. In: *Frozen Storage of Laboratory Animals* (ZEILMAKER, G. H. ed.), p. 129, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1981.
- 13) 角田 (幸)・相馬 (正)・杉江 (信): 本誌, **24**, 157, 1978.
- 14) TSUNODA, Y., T. SOMA & T. SUGIE: *J. Reprod. Fert.*, **65**, 483, 1982.
- 15) KASAI, M., K. NIWA & A. IRITANI: *J. Reprod. Fert.*, **63**, 175, 1981.
- 16) KASAI, M., K. NIWA & A. IRITANI: *J. Reprod. Fert.*, **66**, 367, 1982.
- 17) 角田 (幸)・入谷 (明)・西川 (義): 日畜会報, **49**, 89, 1978.
- 18) WHITTINGHAM, D. G.: *Nature*, **233**, 125, 1971.
- 19) HOSOI, Y., K. NIWA, S. HATANAKA & A. IRITANI: *Biol. Reprod.*, **24**, 637, 1981.
- 20) KASAI, M., K. NIWA & A. IRITANI: *J. Reprod. Fert.*, **59**, 51, 1980.

Summary

Various cryoprotectants and freeze-thawing procedures were examined for the preservation of rabbit embryos. Rabbit morulae were recovered 60-65 h after mating from females which had been induced to superovulate by injections of FSH and hCG. The morulae were suspended in 0.2 ml PBS (supplemented with 20% rabbit serum) containing 1.5 M-DMSO, -ethylene glycol, -glycerol or -erythritol in a glass test-tube at room temperature. The samples were cooled at 1 C/min to -4 C and were seeded. Tubes were then cooled either (a) slowly to -75 C at 1 C/min and then plunged into liquid nitrogen, or (b) rapidly by transfer into -20 C ethanol, kept for 10 min, suspended in nitrogen vapor (-100 C) for 10 min, and then plunged into liquid nitrogen. After storage for 10-150 days, these samples were thawed either slowly at room temperature or rapidly in warm water at 30-35 C. The cryoprotectants were removed by transferring the embryos into PBS containing the cryoprotectant and 0.5 M-sucrose, PBS with 0.5 M-sucrose, and finally into fresh PBS. The embryos were cultured for 48 h in a modified Tyrode solution containing 20% rabbit serum to determine their survival rate, which was assessed by the ability to develop to expanded blastocysts. The results obtained are as follows.

In the freeze-thawing procedures examined, the highest survival rates were obtained when embryos were frozen in the presence of DMSO, followed by ethylene glycol, and the third glycerol. Slow thawing of slowly frozen samples gave good survival rates of 70% in DMSO, 38% in ethylene glycol and 24% in glycerol. When slowly frozen samples were thawed rapidly, survival rates of embryos stored with DMSO and glycerol decreased. Survival rates of embryos frozen-thawed rapidly were lower than those of slowly frozen embryos.

When erythritol was used as a cryoprotectant, morphologically normal embryos were not obtained after freeze-thawing except for the case of rapid freezing, and no embryos developed in culture.