Frozen Storage of Mouse Embryos by Vitrification

Tomohiro KONO* and Yukio TSUNODA

National Institute of Animal Industry, Tsukuba Norindanchi,
P.O. Box 5, Ibaraki 305

*NODAI Research Institute, Tokyo University of Agriculture,
Setagaya-ku, Tokyo 156

(Accepted for publication April 22, 1987)

Summary. In vitro and in vivo survival of the mouse embryos from one-cell to blastocyst stage frozen by vitrification method (Rall and Fahy, 1985) was investigated in the present study. The embryos were plunged into LN₂ directly after exposure to the vitrification solution (VS1). The results were obtained as follows.

- 1) The viability of embryos after freezing and thawing was high in 8-cell embryos (86%) and morulae (77%), and the lowest in one-cell eggs (0%) frozen by procedure A.
- 2) The live young were obtained after transfer of frozen-thawed embryos at all stages to recipients.
- 3) Although the viability of blastocysts diluted gradually by VS1 solution was low (29%–44%), it was enhanced remarkably (75%) when they were diluted with 2.0 M glycerol-0.5 M sucrose and then 0.5 M sucrose-PBI solution at room temperature. **KEY WORDS:** VITRIFICATION, RAPID FREEZING, MOUSE EMBRYO, TRANSFER TEST.

Jpn J Anim Reprod 33, 77–81, 1987

ガラス化超急速凍結法によるマウス初期胚の生存性および移植試験

河野 友宏*・角田 幸生

農林水産省畜産試験場・*東京農業大学総合研究所
305 筑波農林研究団地内局, 私書箱 5 号 *156 世田谷区桜丘1-1-1

哺乳動物初期胚の凍結保存技術は, Whittingham (1972) 並びに Wilmot (1972) によって独自に成功例が報告されて以来, その操作技術の簡略化のために多方面から膨大な研究がなされ短期間に目覚ましい進歩を遂げた。最近, 凍害保護物質を胚内部に浸透させた後, 胚を液体窒素中あるいはガス中に直接投入する超急速凍結法に関する研究報告がなされている (Rall and Fahy, 1985; Massip *et al.*, 1986; Miyamoto and Ishibashi, 1986; Scheffen *et al.*, 1986; Széll and Shelton, 1986; Williams and Johnson, 1986)。Fahy *et al.* (1984) は, 常圧下にて容易にガラス化状態で凍結する DMSO, acetamide, propylen glycol および polyethylene glycol (PEG) から成る凍結液 (vitrification solution 1, VS1

液)を開発した。Rall and Fahy (1985) は, この VS1 液の胚に対する毒性を低温下 (0–4°C) で操作することにより弱め, ガラス化超急速凍結したマウス 8 細胞期胚において融解後高い生存性を得ることに成功した。本実験は, 1 細胞期から胚盤期までのマウス初期胚をガラス化超急速凍結し, 融解後の生存性並びに移植試験による産子への発生能について調べ, VS1 液を用いた当該法の有効性を明らかにしようとした。

材料と方法

供試胚 CD-1 系成熟雌マウスを用い, 5 iu の PMSG と hCG を48時間間隔で腹腔内注射して過排卵誘起させた後, 同系統の雄と交配した。hCG 投与後 18–20 時間

目に1細胞期卵、42-44時間目に2細胞期胚、64-66時間目に8細胞期胚、76-78時間目に桑実胚および90-92時間目に胚盤胞をそれぞれM2液 (Fulton and Whittingham, 1978) を用い常法に従い採取した。なお、1細胞期卵は卵管膨大部より採取後、hyaluronidase (300 IU/ml) を含むM2液で処理し、卵丘細胞を除去した後供試した。

VS1液 ガラス化凍結液 (VS1液) は、Rall and Fahy (1985) に従い調整した。0.4% BAS を含むPBI液 (Whittingham, 1971a) を基本液として用い、20.0 w/v% DMSO, 15.5 w/v% acetamide, 10.0 w/v% propylene glycol および 6.0 w/v% PEG 8000 を含む混合液を作製して100% VS1液とした。

脱水・凍結法 PBI液にて2回洗浄した供試胚は、先ず室温下の25% VS1液に移し10分間静置 (A法) あるいは12.5% 並びに25% VS1液にそれぞれ5分間 (B法) ずつ浸漬した。次いで、氷片にて冷却されている培養用ディッシュ (Falcon, ϕ 35 mm) 中の50% VS1液に移し、10分間 (A法) あるいは15分間 (B法) 静置した後、1.2 ml セラムチューブ (ϕ 12 mm, ポリプロピレン製、住友ベークライト社) 内の100% VS1液 20 μ l 液中に10-20個ずつ移し、さらに、氷水中で10分間 (A法) あるいは15分間 (B法) 平衡させた後、直接液体窒素中に投入して融解まで保存した。また、胚盤胞の一部は0.25 ml のプラスチックストローを用いて同様に凍結保存したが、両者間の成績には差異が認められなかったもので、結果はとりまとめて表した。

融解・除去法 凍結胚は1-7日間液体窒素中に保存した後、氷水中で融解した。融解胚は直ちに冷50% VS1液に移して10分間静置し、次いで冷25% VS1液に10分間浸漬した。その後、直接 (A法) あるいは12.5% VS1液に5分間浸漬 (B法) 後、回収胚を室温下のPBI液に移して3分間静置し、さらに新鮮PBI液にて2回洗浄した。また、胚盤胞では融解後直ちに室温下の2.0 M glycerol-0.5 M sucrose-PBI液に、次いで0.5 M sucrose-PBI液にそれぞれ3分間浸漬した後、新鮮PBI液に移す希釈法 (C法) についても合わせて検討した。

生存胚の判定 融解胚は、M16液 (Whittingham, 1971b) を用いて、37°C、5% CO₂、95% 空気の炭酸ガス培養器内で1-5日間培養し、胚盤胞あるいは増大胚盤胞に発生したものを生存胚と判定した。なお、1および2細胞期胚は100 μ l/ml EDTA を添加したM16液にて培養した。

移植 受卵雌には、精管結紮雄マウス (CD-1 系) と

交配し偽妊娠雌マウス (CD-1 系) を用い、胚盤胞に発生した生存胚を偽妊娠3日目の子宮あるいは1日目の卵管内に移植した。

冷却・融解速度の測定 氷水中より直接液体窒素中に投入したセラムチューブおよびプラスチックストロー内VS1液の冷却並びに融解速度を、自動温度記録計 (CHINO, EB22005) に微小電極を接続して測定した。

結 果

VS1液によって超急速凍結されたマウス初期胚の融解後の形態、培養および移植成績をTable 1に示す。

Rall and Fahy (1985) の方法に準じたA法で凍結・融解および凍害保護物質の除去を行った場合、1細胞期卵では融解後の回収胚の46% (25/54) が正常な形態を示していたが、体外培養の結果わずか3.7% (2/54) が4細胞期胚に発生したに過ぎなかった。2細胞期胚の生存性は、細胞期卵と比較して明らかに高く、回収胚の46% (62/135) が胚盤胞に発生した。これらの内54胚を6匹の受卵雌に移植した結果、4匹が妊娠し12匹 (22%) の産子を得た。8細胞期および桑実胚では最も良い成績が得られ、融解胚培養後の生存性はそれぞれ86% (81/94) および77% (54/70) であった。また、それらを移植後の産子への発生率は、それぞれ44% (23/52) 並びに31% (16/51) であった。これに対し胚盤胞では、融解時に正常な形態と認められたものは36% (26/72)、1日培養後の増大胚盤胞への発生率は29% (21/72) に過ぎなかった。これらを受卵雌に移植した結果、4% (9/21) が産子に発生した。

一方、25% VS1液による処理前に、12.5% VS1液による処理を加え、さらに50% と100% VS1液への浸漬時間を5分間延長したB法の場合、融解後正常な形態を有していた卵の割合および培養後の生存率は、1細胞期卵および胚盤胞ともにA法に比べ高い傾向がみられた。すなわち、1細胞期卵では融解後62% (16/26) が正常な形態を示し、回収卵の19% (5/26) が体外培養により胚盤胞に発育した。これらの胚盤胞を2匹の受卵雌に移植したところ、1匹の産子を得た。胚盤胞では融解後の正常胚率および増大胚盤胞への発生率は、それぞれ60% (27/45) 並びに44% (20/45) に向上し、また移植試験の結果70% (14/20) が産子に発生した。

さらに、B法で凍結された胚盤胞を用いて融解後の凍害物質の希釈を、室温下において2.0 M glycerol-0.5 M sucrose-PBI液および0.5 M sucrose-PBI液を用いて試みた結果、85% (44/52) が正常な形態を有しており、

Table 1. In vitro and in vivo development of mouse embryos frozen by vitrification method

Stage of embryos	Treat-ments ¹⁾	No. of embryos recovered	No. of morphologically normal embryos (%)	No. of embryos developed to blastocyst after culture (%)	No. of embryos trans-ferred	No. preg-nant/ recipients	No. of live young (%)
1 Cell	A	54	25 (46)	0 (0)	0	0/0	0 (0)
	B	26	16 (62)	5 (19)	5	2/2	1 (20)
2 Cell	A	135	91 (67)	62 (46)	54	4/6	12 (22)
8 Cell	A	94	85 (90)	81 (86)	52	5/6	23 (44)
Morula	A	70	59 (84)	54 (77)	51	3/5	16 (31)
Blastocyst	A	72	26 (36) ←	21 (29) ←**	21	3/3	9 (43)
	B	45	27 (60) ←**	20 (44) ←**	20	2/2	14 (70)
	C	52	44 (85) ←	39 (75) ←	39	4/4	23 (59)

1) A: Embryos were processed according to Rall and Fahy (1985).

B: Embryos were exposed to 12.5% and 25% VS1 for 5 min, 50% and 100% VS1 for 15 min, respectively.

C: Embryos frozen by procedure B were diluted with 2.0 M glycerol-0.5 M sucrose-PBI and then 0.5 M sucrose-PBI solution.

** Significantly different by X²-test at p<0.01.

Table 2. Cooling and warming rates (°C/min) of VS1 solution in the polypropylen tube or plastic straw plunged into LN₂ or ice water

Temperature (°C)	Polypropylen tube	Plastic straw
Cooling		
0~ -20	350	630
-20~ -40	320	1500
-40~ -60	250	2000
-60~ -80	210	2000
-80~ -100	140	2000
-100~ -120	100	1800
Warming		
-120~ -100	270	3700
-100~ -80	200	2100
-80~ -60	140	1400
-60~ -40	80	1100
-40~ -20	50	530
-20~ 0	20	180

A区に比べ有意差 (p<0.01) を認めた。また、胚盤胞への発生率 (75%) はA区 (29%) および B区 (44%) に比べ有意 (p<0.01) に高く、受精卵に移植後 59% (23/39) が産子に発生した。

セラムチューブおよびプラスチックストローを用いた場合の VS1 液の冷却並びに融解速度は、Table 2 示す。冷却および融解速度ともにセラムチューブで実施した時には比較的遅いのに対し、プラスチックストローでは極めて速い値であった。0~120°C の範囲における平均冷却

および融解速度は、前者では 270°C/min 並びに 130°C/min であったのに対し、後者では 1600°C/min 並びに 1500°C/min と著しく速く、前者の値と比較するとそれぞれ 7 倍および12倍の速度であった。

考 察

本実験は、Rall and Fahy (1985) が報告したガラス化状態に固相化する VS1 を凍結液として用いたマウス胚の超急速凍結法が、8細胞期胚のみならず1細胞期から胚盤胞期までのマウス初期発生胚の凍結保存に適用可能なこと、さらに融解後の凍害保護物質の希釈・除去を、glycerol-sucrose 溶液を用いて室温下にて行うことにより融解胚 (胚盤胞) の生存性が著しく向上できることを明らかにした。

哺乳動物卵子の耐凍能は、発生段階により異なることが知られており、マウスでは8細胞期胚および桑実胚で凍結・融解後の生存性が最も高く、胚盤胞、2細胞期胚の順に低下し、1細胞期卵の生存性は最も低いことが知られている (Whittingham, 1972; Leibo *et al.*, 1974; 宮本・石橋, 1984; Miyamoto *et al.*, 1986)。Rall and Fahy (1985) に従ってガラス化超急速凍結法でマウス初期胚を凍結した本実験においても、1, 2細胞期胚および胚盤胞に比べて8細胞期胚並びに桑実胚で高い生存性が得られた。Hsu *et al.* (1986) の当法を用いた実験結果においても、8-16細胞期胚が胚盤胞に比べて高い生存性が得られている。VS1 液を用いたガラス化超急速凍

結法による今回の成績は、DMSOを使用した緩慢凍結法の結果（宮本・石橋，1984）と類似していた。初期胚の耐凍能は凍害保護物質の細胞内への浸透が増加するに従い高まること（Mazur，1970），並びに胚細胞内への凍害保護物質の浸透は，細胞容積に対する表面積の比が増加するに従い，すなわち胚の分割が進むにつれ増加すること（Mazur *et al.*，1976）が知られている。したがって，初期胚の発生段階と耐凍能との関係には，使用する凍害保護物質によっても異なることが指摘されているが（浦野ら，1986），一般に胚の発生が進につれて耐凍能が向上する傾向が認められる。また，胚盤胞における耐凍能の低下は胞腔内の水の脱水がされづらいことや，融解時における浸透圧障害が生じやすいことなどが考えられる。胚の発生に伴う割球の膜の物質透過性，浸透圧に対する抵抗性あるいは細胞質の脱水性の変化も推察されている（宮本・石橋，1984）。

一方，凍結・融解後培養によって发育した生存胚 242 個を，28匹の受卵雌に移植した結果，23匹が妊娠し全ての発生段階の凍結・融解胚から総数98匹の正常な産子が得られた。これは妊娠が成立した受卵雌に移植された胚 198 個の 49% に当たり，本実験における凍結・融解胚は産子への発生能を十分有していることが確認された。

Fahy *et al.* (1984) の開発した VS1 液は，常圧の条件下で容易にガラス化状態で凍結して細胞内外の氷晶形成を防ぎ胚が受ける障害を回避できることから，マウス初期胚の超急速凍結を可能とした。しかしながら，VS1 液は高濃度の凍害保護物質を含有しているため室温下では強い毒性が認められることから，凍害保護物質の添加並びに希釈を 0-4°C の条件下で実施しなければならず操作が繁雑である。また，今回の実験成績では，8 細胞期および桑実胚以外の発生段階のマウス胚では，必ずしも高い生存率が得られたとはいえない。その原因の 1 つとして，融解後胚を 50% VS1 液から 25% VS1 液へ移した際に胚細胞質の膨張が生じ，この傾向は 12.5% VS1 液あるいは PBI 液に移すとさらに顕著な現象として観察されたことから，凍害保護物質の希釈時における浸透圧変化による障害が考えられた。

融解胚からの DMSO の除去に対して sucrose が有効であることが，マウス胚（Kasai *et al.*，1980；Merry *et al.*，1983）および牛胚（Niemann *et al.*，1982）で知られている。そこで，VS1 液でガラス化凍結した胚盤胞を氷水中で融解後，直ちに室温下の 2.0 M glycerol-0.5 M sucrose-PBI 液に浸漬して凍害保護物質の希釈を試みた（C 法）。その結果，融解胚の生存性は 75% と

A 法および B 法に比べて著しく向上し，sucrose を用いた希釈法が VS1 液による凍結胚に対しても優れた効果を有することが判明した。また，室温下での凍害保護物質の希釈が可能となり，その操作がかなり簡略化されたと考えられる。

Scheffen *et al.* (1986) は，10% glycerol-20% 1,2-propanediol から成るガラス化凍結液を用いてマウス胚を凍結し，融解後の希釈を 1 M sucrose により実施して良好な成績を得たと報告している。Massip *et al.* (1986) は，同じ凍結方法を用いて牛胚をガラス化凍結し，融解後約 40% の生存胚が得られたと報告している。また，sucrose-glycerol-PBI 液による超急速凍結法がマウス胚（Willams and Jonson，1986；Széll and Shelton，1986）および牛胚（Bui-Xuan-Nguyen *et al.*，1984）において試みられており，融解後の比較的高い生存性を得ることに成功している。さらに，VS1 液を用いてガラス化凍結した人の単核白血球は，融解後 92% の細胞が正常な機能を有していることが明らかにされている（Takahashi *et al.*，1986）。

今後，ガラス化凍結法のさらに広範な対象への利用，並びに信頼度が高くしかも簡略な凍結法の開発に向けて研究が進展するものと考えられる。

謝 辞

謝辞本論文を作成するにあたり有益な御助言並びに御校閲を頂いた東京農業大学総合研究所教授中原達夫博士，当場繁殖部長花田 章博士並びに家畜改良事業団家畜改良センター杉江 信博士に感謝致します。

References

- Bui-Xuan-Nguyen N, Heyman Y, Renard JP (1984) Direct freezing of cattle embryos after partial dehydration at room temperature. *Theriogenology* 22: 389-399.
- Fahy GM, Macfarlane DR, Angell CA, Meryman HT (1984) Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 21: 407-426.
- Fulton BP, Whittingham DG (1978) Activation of mammalian oocytes by intracellular injection of calcium. *Nature* 273: 149-151.
- Hsu TT, Yamakawa H, Yamanoi J, Ogawa S (1986) Survival and transfer test of mouse early embryos frozed by vitrification method. *Jpn J Anim Reprod* 32: 106-109.
- Kasai M, Niwa K, Iritani A (1980) Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. *J Reprod Fert* 59: 51-56.

- Leibo SP, Mazur P, Jackowski SC (1974) Factors affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Expl Cell Res* 89: 79-88.
- Mazur P (1970) Cryobiology: The freezing of biological systems. *Science* 168: 939-949.
- Mazur P, Rigopoulos N, Jackowski SC, Leibo SP (1976) Preliminary estimates of the permeability of mouse ova and early embryos to glycerol. *Biophys J* 16: 223a, Abstr.
- Massip A, Van Der Zwahlen P, Scheffen B, Ectors F (1986) Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryo-Letters* 7: 270-273.
- Merry DA, Allen RL, Krag K, Wright RW, Jr (1983) Sucrose dilution of frozen mouse embryos: interaction of glycerol and sucrose concentrations. *Theriogenology* 20: 325-332.
- Miyamoto H, Ishibashi T (1984) Effects of embryonic stages on survival of frozen-thawed mouse embryos. *J Mamm Ova Res* 1: 95-98 (in Japanese).
- Miyamoto H, Ishibashi T (1986) Liquid nitrogen vapour freezing of mouse embryos. *J Reprod Fert* 78: 471-478.
- Miyamoto H, Miyamoto Y, Ishibashi T (1986) The importance of equilibration time to glycerol prior to freezing in the cryopreservation of mouse embryos. *Jpn J Zootech Sci* 57: 250-256.
- Niemann H, Sacher B, Schilling E, Smith D (1982) Improvement of survival rates of bovine blastocysts with sucrose for glycerol dilution after a fast freezing and thawing method. *Theriogenology* 17: 159-166.
- Rall WF, Fahy GM (1985) Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 313: 573-575.
- Sheffen B, Van Der Zwahlen P, Massip A (1986) A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification. *Cryo-Letters* 7: 260-269.
- Széll A, Shelton JN (1986) Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour. *J Reprod Fert* 76: 401-408.
- Takahashi T, Hirsh A, Erbe EF, Bross JB, Steere RL, Williams RJ (1986) Vitrification of human monocytes. *Cryobiology* 23: 103-115.
- Urano K, Takahashi Y, Kanekawa H (1986) Effect of various cryoprotectants on the survival of frozen-thawed mouse embryos. *Jpn J Anim Reprod* 32: 130-133 (in Japanese).
- Whittingham DG (1971 a) Survival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature* 233: 125-126.
- Whittingham DG (1971 b) Culture of mouse ova. *J Reprod Fert, Supple* 14: 7-21.
- Whittingham DG (1972) Survival of mouse embryos to -196 and -269°C . *Science* 178: 411-414.
- Williams TJ, Johnson SE (1986) A method for one-step freezing of mouse embryos. *Theriogenology* 26: 125-133.
- Wilmot I (1972) The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Sci* 11: 1071-1079.

要 約

1 細胞期から胚盤胞までのマウス初期胚を VS1 液を用いたガラス化超急速凍結法により凍結し、融解後の生存性並びに移植後の産子への発生能について検討した。

1. 融解後の生存性は、8 細胞期胚 (86%) 並びに桑実胚 (77%) で高く、A 法で凍結された 1 細胞期卵 (0%) で最も低かった。
2. 移植試験の結果、1 細胞期から胚盤胞までの全ての発生段階の融解胚から産子を得ることができた。
3. 胚盤胞において融解後の凍害保護物質の希釈を、2.0 M glycerol-0.5 M sucrose-PBI 液次いで 0.5 M sucrose-PBI 液で行い、生存性を著しく向上 (75%) させることができた。