

哺乳動物卵子の凍結保存に関する研究

1979

葛西 孫三郎

哺乳動物卵子の凍結保存に関する研究



1979

葛西 孫三郎

目 次

第1章	緒論	1
第2章	研究の歴史	6
第3章	マウス受精卵の凍結保存	14
第1節	緒言	14
第2節	低温保存が胚の生存性に 及ぼす影響	16
I	実験材料および方法	16
II	実験結果	19
III	考察	25
IV	摘要	28
第3節	植氷温度が胚の生存性に 及ぼす影響	30
I	実験材料および方法	30
II	実験結果	33
III	考察	35

IV	摘要-----	37
第4節	凍結速度および保存温度が 緩慢融解された胚の生存性 に及ぼす影響-----	39
I	実験材料および方法-----	40
II	実験結果-----	43
III	考察-----	53
IV	摘要-----	57
第5節	凍結液中のタンパク質成分 が胚の生存性に及ぼす影響-----	60
I	実験材料および方法-----	61
II	実験結果-----	63
III	考察-----	65
IV	摘要-----	66
第6節	融解速度が緩慢凍結された 胚の生存性に及ぼす影響-----	68
I	実験材料および方法-----	68
II	実験結果-----	69
III	考察-----	71
IV	摘要-----	72

第7節	三段凍結法により急速凍結	
	された胚の生存性-----	74
I	実験材料および方法-----	74
II	実験結果-----	78
III	考察-----	84
IV	摘要-----	89
第8節	小括-----	91
第4章	マウスおよびラット未受精卵 の凍結保存-----	95
第1節	緒言-----	95
第2節	マウス未受精卵への各種耐 凍剤の透過性-----	97
I	実験材料および方法-----	97
II	実験結果-----	99
III	考察-----	105
IV	摘要-----	108
第3節	ラット未受精卵の凍結保存-----	110
I	実験材料および方法-----	110
II	実験結果-----	112

	Ⅲ	考察	-----	116
	Ⅳ	摘要	-----	118
第4節		マウス卵胞卵の凍結保存	-----	120
	Ⅰ	実験材料および方法	-----	120
	Ⅱ	実験結果	-----	123
	Ⅲ	考察	-----	128
	Ⅳ	摘要	-----	129
第5節		ラット卵胞卵の凍結保存	-----	131
	Ⅰ	実験材料および方法	-----	131
	Ⅱ	実験結果	-----	134
	Ⅲ	考察	-----	140
	Ⅳ	摘要	-----	144
第6節		小括	-----	146
第5章		ハムスター受精卵の凍結保存	-----	149
第1節		緒言	-----	149
第2節		受精卵の体外培養	-----	151
	Ⅰ	実験材料および方法	-----	151
	Ⅱ	実験結果	-----	152
	Ⅲ	考察	-----	157

IV	摘要-----	158
第3節	低温および凍結保存-----	160
I	実験材料および方法-----	160
II	実験結果-----	162
III	考察-----	165
IV	摘要-----	167
第4節	小括-----	169
第6章	家畜卵胞卵の低温保存-----	170
第1節	緒言-----	170
第2節	ウシ卵胞卵の低温保存-----	172
I	実験材料および方法-----	172
II	実験結果-----	174
III	考察-----	177
IV	摘要-----	179
第3節	フタ卵胞卵の低温保存-----	181
I	実験材料および方法-----	181
II	実験結果-----	183
III	考察-----	184
IV	摘要-----	186

第4節 小括	188
第7章 總括	190
謝辭	198
引用文獻	199
英文要旨	206

第1章 緒論

Glycerolが、凍結状態で保存された精子を保護する効果をもつというPolge, Smith & Parkes(1949)¹⁾の発見は、人工授精技術にとり入れられることにより、家畜、特に牛の改良および増殖に大きく貢献してきた。

人工授精に対して、雌側の生殖細胞を有効に利用する技術は、受精卵の移植による人工妊娠である。卵子の移植においては、DonorとRecipientの間にかなり厳密な性周期の同期化が必要であり、ひいては受精卵の体外保存技術の確立が重要な課題になってきた。すでに1940年代から、家兎の移植実験のために卵子を保存しようという試みがなされている^{2)~9)}。その後1970年代の初めまでは、主として0°C以上の温度域における低温保存が試みられた^{10)~29)}ものの、おのずと生存期間に限界があり、大きな進展はみられなかった。

しかしながら、1972年、Whittingham, Leibo & Mazur³⁰⁾が、超低温下において保存されたマウス胚の生存を報告して以来、哺乳動物卵子の凍結保存に関する研究が、にわかに活発にはじめられ、卵子移植のための同期化という当初の目的を越えて幅広い分野における利用が注目されはじめた。

卵子の保存技術が確立されることにより、まず畜産界では、優良な遺伝子をもつ受精卵を移植することによって、家畜の改良が促進され、また肉牛においては、人工的に双子を生産させることにより、増産が促進されるであろう。また、卵子を凍結状態で輸送することにより、家畜の遠距離輸送に要する費用や手間が著しく軽減される。

遺伝学の領域では、マウスやラットなどの実験動物ですでに確立されている系統を保存し、不慮の事故に備えるとともに、系統の対照として、交配による系統維持過程における遺伝的変異をチェックすることが可能となる。

また、まれにしか使用されない系統を保存することにより、維持経費および省力面で寄与するところが大きい。

発生生物学の分野では、移植実験に用いられる他、受精や初期発生の研究に用いられる卵子の必要数を確保したり、生化学的実験において一度に多量の卵子を必要とする場合などにも役立つと考えられる。

低温生物学の分野では、大型細胞、多細胞体の保存に関する格好の研究材料として、耐凍メカニズムの解明のために用いられるであろう。

このように、卵子の保存が果たす役割は、産業的にも学問的にも極めて大きいと考えられる。しかしそのためには、移植技術が確立されていることはもちろんであるが、耐凍剤、凍結-融解処理および移植によって卵子に変異の生じないことが前提となり、さらには、保存中半永久的に不変であることが望ましい。また卵子は精子と異なり得られる数が少ない

ために、極めて高い生存率が望まれる。

凍結保存卵子の生存性は、凍結液、耐凍剤、冷却速度、保存温度、保存期間、融解速度、耐凍剤の除去方法等、数多くの要因によって影響を受けるが、当初、哺乳動物卵子の耐凍性は、他種の細胞とは大きく異なっているものの、動物種間および卵子の発育段階の間には、特異的差異はないと考えられていた。しかしこの考えとは逆に、卵子の耐凍メカニズムは他種細胞のそれと同じであり、また耐凍性は、動物種および発育段階によって異なることが明らかとなるに至り、それぞれについて最適条件を設定することが必要であると考えられるようになった。

まだ本分野の研究は開始されたばかりで、各種卵子の凍結保存技術の確立および耐凍メカニズムの解明までには、さらに多くの研究が必要と思われる。

本研究は、哺乳動物卵子の凍結保存技術を開発すると同時に、卵子の耐凍メカニズムに

関する知見をも得る目的でおこなわれた。

第2章 研究の歴史

1952年、牛凍結精子による受胎例が報告されたが、³¹⁾ 卵子についてもすでに同年、家兎1細胞期受精卵の凍結保存が試みられている。

Smith(1952)³²⁾ は、Glycerol存在下で556個の卵子を $-79 \sim -196^{\circ}\text{C}$ に保存し、融解-培養後6個が2~6細胞期まで卵割したことを報告したが、彼女はすでに、急速凍結よりも緩慢凍結が適していることおよびGlycerol除去過程に傷害を受けることなどを指摘している。

1958年には、Ferdows, Moore & Dracy³³⁾ が -79°C に保存された家兎受精卵を、Sherman & Lin(1958)³⁴⁾ は氷晶形成下の -10°C に3.5時間保存されたマウス未受精卵をそれぞれ移植することにより胎児を得、1960年、Parrott³⁵⁾ は、 -79°C に凍結されたマウス卵巣組織をもとの場所へ自家移植したのち新生児を得たと報告した。

1963年、Sherman³⁶⁾ は -20°C に凍結されたマウ

ス未受精卵を移植することにより産子を得たが、 -20°C 以下で保存された卵子からは、産子は得られなかった。これらの実験はいずれも比較的緩慢な速度で凍結をおこなっているものの、植氷操作がおこなわれなかったものと思われる。さらに急速融解をしたために生存率が低く、再現性に欠けたものと思われる。その後1970年代初めまで、彼らの報告を確認あるいは発展させる実験は全くなされず、 0°C 以上の温度域における、家兎、めん羊、マウスおよびウシ卵^{27), 28)}子の保存に関する研究がおこなわれた。1971年、Whittingham²⁹⁾は、Polyvinylpyrrolidone(PVP)の存在下で -79°C に30分間保存したマウス胚より新生児を得たと報告したが、その後の追試験で確認されず、³⁷⁾現在ではPVPの有効性は疑問視されている。^{38)~40)}

しかし、翌1972年、Whittingham, Leibo & Mazur³⁰⁾は、マウス胚をDimethyl sulfoxide(DMSO)存在下で緩慢冷却して -196°C および -269°C に保存し、緩慢融解後多くの胚が生存

してあり、移植後新生児を得たと報告し、同年 Wilmut³⁸⁾ は、同様の方法で凍結-融解させたマウス胚を培養した結果、高率に発生することを認めた。彼らの用いた方法はただちに再現性をもつことが確認され、卵子の凍結保存技術は急速な進展をみるに至った。以後、基本的に彼らの方法を応用することにより実験動物および家畜の卵子の凍結保存の試みがなされ、かなりの成果をあげるに至った。

1973年、Wilmut & Rowson³⁹⁾ は 2M-DMSO の存在下でウシの後期胚盤胞を -196°C まで凍結し、融解-培養後移植することにより1頭の新生児を得た。わが国1頭ではあったが、この成功は家畜における卵子の凍結保存の可能性を示した点で大きく評価されている。

同年、Bank & Maurer⁴¹⁾ は、家兎胚を凍結-融解後移植して正常な胎児を得、翌1974年、Whittingham & Adams⁴²⁾ は、凍結-融解された家兎胚を移植後、8頭の正常産子を得た。

1974年、Whittingham & Whitten⁴³⁾ は、222

日間液体窒素中に保存したマウス胚を米国から英国へ空輸し、移植後産子を得、実用的な長期保存および遠隔地輸送の可能性を示した。さらに Whittingham (1974)⁴⁴⁾ は、マウス胚盤胞を用いて、DMSOの添加および除去温度を比較し、添加温度にかかわらず、37°Cにおける除去が適当なことを示し、また Leibo, Mazur & Jackowski (1974)⁴⁵⁾ は、マウス 2-および 8細胞期胚を用いて、最適凍結速度と最適融解速度の間に相関関係があることを示した。

ラット胚においては、尾川・佐藤・橋本・根岸・宇賀 (1973)⁴⁶⁾、尾川・友田 (1974)⁴⁷⁾ および内海・湯原 (1974)⁴⁸⁾ が、-79°C に保存した胚を移植して正常胎児を得、その後、液体窒素中に凍結保存されたラット胚を用いて新生児を得た。^{49)~51)} 一方 Whittingham (1975)⁵²⁾ も、凍結ラット胚を移植して 5頭の正常胎児を得た。

1976年、Willadsen, Polge, Rowson & Moor⁵³⁾ は、めん羊胚の凍結保存の成功を報告した。彼らは、-196°C に保存された桑実胚および胚

盤胞を移植することにより、8頭の新生児を得た。

1976年、山羊においても胚の凍結保存の成功例がBilton & Moore⁵⁴⁾により報告された。彼らは、1M-Glycerol存在下で -196°C に凍結保存された後期胚盤胞より3頭の新生児を得た。

Tsunoda, Parkening & Chang⁵⁵⁾(1976)は、未受精卵の凍結(-79°C)を試み、マウス卵子の生存性は比較的低率であったものの、ハムスター一卵子では融解後の体外受精により高率に精子侵入が見られることを観察した。さらにParkening, Tsunoda & Chang⁵⁶⁾(1976)は、 -79°C に凍結されたマウス未受精卵を、Whittingham⁵⁷⁾(1977)は、 -196°C に凍結されたマウス未受精卵をそれぞれ融解後、体外受精をおこない、さらに移植することにより産子を得た。

一方、1973年の一例以来成功例が得られなかったウシにおいても、1976年³⁹⁾に1頭、1977年⁵⁸⁾には、主としてGlycerolを用いて凍結-融解⁵⁹⁾された胚より5頭の産子が報告され、以後

70%を越える高い妊娠率⁶⁰⁾を得るに至っている。

大部分の卵子凍結実験には、耐凍剤としてDMSOあるいはGlycerolが用いられてきたが、1977年、Miyamoto & Ishibashi⁶¹⁾はEthylene glycol (EG)が高い保護効果をもつことを報告し、その後、他のGlycol類もある程度の保護効果をもつことを明らかにした⁶²⁾。尾川・井上・友田⁶³⁾(1977)は、*N,N*-Dimethyl formamide (DMFA)の有効性についても示唆したが、現在のところ生存産子は得られていない。

近年、Whittingham⁶⁴⁾(1977)は、凍結保存された、突然変異系統など5系統のマウス受精卵を移植することにより再び系統が確立されることを示し、凍結による系統保存の可能性を実証した。さらにWhittingham⁶⁵⁾(1977)は、放射線投与下で29カ月間凍結保存されたマウス胚の生存性を示し、 -196°C における卵子の長期保存の可能性も、実証されつつある。

以上に述べた報告は、卵細胞内に氷晶が形成されることを避けるため、毎分 $0.1\sim 1.0^{\circ}\text{C}$

程度の緩慢な凍結法、および毎分4~25°C程度の緩慢な融解法を用いておこなわれている。これに対して、近年、Willadsen⁽⁶⁶⁾(1977)およびPolge & Willadsen⁽⁶⁷⁾(1978)は、めん羊胚および牛胚を-30~-45°Cまで緩慢凍結したのを液体窒素中で急速凍結し、ついで急速融解(360°C/分)することにより、高い生存率を得ることを報告した。その後、Whittingham,⁽⁶⁸⁾ Wood, Farrant, Lee & Halsey(1979)は、この方法をマウス胚の凍結に用いて同様の好結果を得、-30~-45°Cから急速冷却された卵細胞内には、氷晶が形成されたものと結論した。これは、細胞内凍結がおこることにより胚が死滅すると考えられていた従来の概念を大きく変えるものである。緩慢凍結法は時間と手間がかかるとため、今後は、より急速な方法が開発されることと思われる。

なお、哺乳動物卵子の凍結保存に関しては、菅原⁽⁶⁹⁾(1972, 1976), Whittingham⁽⁷¹⁾(1973, 1974,⁽⁷²⁾ 1975,⁽⁷³⁾ 1976,⁽⁷⁴⁾ 1977,⁽⁷⁵⁾ 1978), Maurer⁽⁷⁶⁾(1976), Wilmut⁽⁷⁷⁾

(1976)⁷⁸⁾, Moor & Bilton⁷⁹⁾ (1977), Polge⁸⁰⁾ (1977),
尾川⁸¹⁾ (1977, 1978)^{82)~84)}, Polge & Willadsen⁶⁷⁾ (1978),
宮本⁸⁵⁾ (1978), 角田⁸⁶⁾ (1978) などによる総説がみ
られる。

第3章 マウス受精卵の凍結保存

第1節 緒言

哺乳動物卵子の凍結保存技術が急速に発展する引き金となったWhittinghamら(1972)³⁰⁾の実験は、マウス受精卵を用いておこなわれた。マウスでは、比較的簡単に多数の卵子を得ることができ、卵子の耐凍性も高く、さらに卵子の体外培養や移植技術がすでに確立されているために、卵子の凍結保存に関して最も多くの研究がなされてきた動物種である。

マウス受精卵の凍結条件を検討することは、直接種々の系統を保存するために役立つほか、家畜をはじめ他種の哺乳動物卵子の凍結のための基礎的知見を得るためにも有用であると考えられる。このように、卵子の凍結保存の分野でマウス受精卵の果たす役割は、極めて大きいものと思われるが、本実験では、マウス受精卵のより優れた凍結方法を開発し、さ

らには卵子の耐凍メカニズムに関する知見をも得る目的で、まず 0°C 以上の温度域における保存期間の限界をしらべ、ついで、植氷温度、冷却速度、保存温度、保存期間、凍結液、融解速度、耐凍剤とその除去方法など種々の要因が、凍結-融解されたマウス受精卵の生存性に及ぼす影響について検討した。

第2節 低温保存が胚の生存性に及ぼす影響

凍結処理をおこなう際には、必然的に胚を室温 $\sim 0^{\circ}\text{C}$ にさらし、耐凍剤を添加しなければならないが、これらの温度および耐凍剤存在下における胚の生存限界を明らかにすることは、体外で卵子を扱う上で、また耐凍剤の毒性を知る上で必要である。また精子においては、 0°C への急激な冷却による傷害、いわゆる寒冷衝撃がみられるが、卵子においては 0°C への冷却速度については、ほとんど考慮されていない。本実験では、凍結保存実験に先立って、室温と 0°C 間の冷却ないし加温速度、および各種耐凍剤の存在下における20および 0°C 保存が、マウス桑実胚の生存性に及ぼす影響について検討した。

I 実験材料および方法

4~10週令のICR系雌マウスに5~7.5 i. u. のPMSGおよびHCGを48時間間隔で腹腔内注射し

て過排卵誘起後、同系の雄と同居させた。翌朝臙栓の見られた雌マウスを、HCG注射後75～77時間目に屠殺し、室温にて子宮を灌流することにより桑実期の受精卵を採取した。灌流液および保存液には、Dulbecco's phosphate buffered saline⁸⁷⁾に、0.33mM-sodium pyruvate, 5.56mM-Glucose, 100 i.u./ml Penicilline, 50μg/ml Streptomycin および 3mg/ml Bovine serum albumin (BSA)³⁷⁾を添加した液 (PBS) を用いた。採取された胚は、同液で2回洗浄後、形態的に正常と思われるものを実験に供した。

室温と0°C間の冷却速度および加温速度がその後の胚の生存性に及ぼす影響を検討する実験では、あらかじめ0.2mlのPBSを入れたガラス試験管(10×100mm)中に胚を5～15個ずつ移したのち、試験管を室温のアルコール中に浸し、アルコールにドライアイスの小片を加えることによるか(毎分0.25, 0.5 および2.0°C) あるいは試験管を直接氷水中に浸すことにより(毎分40°C) 0°Cまで冷却した。

氷水中に60分間保ったのち、室温に放置するか(12°C/分)室温水中に浸すことにより(210°C/分)、室温にもどしたのち胚を回収して培養をおこなった。

20および0°Cに保存された胚の生存性をしらべる実験では、あらかじめ20あるいは0°Cに保った、0.2mlのPBSあるいは1.5MのDMSO, EG, GlycerolあるいはDMFAを添加したPBSを含む試験管中に直接胚を移し、同温度に保存した。一定時間(3~72hr)後、PBS中に保存したものはただちに胚をとり出し、耐凍剤を含むものは、室温にて0.2, 0.4および0.4mlのPBSを5分間隔で加えることにより耐凍剤を希釈したのち胚を回収し、それぞれ新鮮なPBSで洗淨後、培養した。

培養液には、5.56mM-Glucose, 0.5mM-Sodium pyruvate, 25mM-Sodium lactate, 100 i.u./ml Penicilline, 50 μ g/ml Streptomycin および4mg/ml BSAを添加した修正 Krebs-Ringer Bicarbonate(KRB)⁸⁸⁾液を用いた。淨過

滅菌(0.3 μ)した培養液約0.4mlをシャーレ(48mm ϕ)にとり、あらかじめ5%CO₂を含む空気で飽和され、37°Cに加温された流動パラフィンでおおい、37°C、95%空気、5%CO₂の炭酸ガス培養装置内に静置し、温度および気相を平衡させたのち卵子を浮遊させて培養した。2~3日後に Expanded blastocyst まで発育したものを正常な生存胚とした。

II 実験結果

室温と0°C間の冷却速度および加温速度が0°Cに60分間保存されたマウス桑実胚の生存性に及ぼす影響をしらべた実験結果を Table 1 に示した。いずれの冷却速度および加温速度による処理後も、胚は高率(85~100%)に Expanded blastocyst まで発育し、速度による差は全く見られなかった。

20°Cにて、耐凍剤を含まないPBS、あるいは種々の耐凍剤を添加したPBS中で保存された胚の生存率をしらべた実験結果を Table 2

およびFig. 1 に示した。耐凍剤を含まないPBS中に保存された胚は、24時間後も高い生存率(95%)を保ったが、48時間後には29%に、72時間後にはわずか7%まで低下した。1.5M-EGあるいは1.5M-Glycerolを含むPBS中に保存された胚の生存率は、PBS区に比べて若干低い値であったが、同様の傾向を示した。これに対して、1.5M-DMSOを含むPBSを用いた場合、

Table 1. Effect of the rate of cooling and warming between room temperature and 0°C on the development of mouse embryos stored at 0°C for 60 min.

Cooling rate (°C/min)	Warming rate (°C/min)	No. of embryos		
		Cooled	Recovered	Developed to expanded blastocyst (%)*
0.25	12	25	25	24 (96)
	210	25	25	25 (100)
0.5	12	20	20	19 (95)
	210	20	18	17 (94)
2.0	12	30	29	26 (90)
	210	30	27	23 (85)
40	12	30	29	26 (90)
	210	32	30	30 (100)

* Percentage of recovered embryos.

Table 2. Survival of mouse embryos stored for various periods at 20°C in PBS with and without cryoprotective agents.

Medium	Duration of storage (hr)	No. of embryos			
		Stored	Recovered	Morphologically normal (%)*	Developed to expanded blastocyst (%)*
PBS	6	15	14	14 (100)	14 (100)
	12	20	20	20 (100)	20 (100)
	24	20	20	20 (100)	19 (95)
	48	30	28	28 (100)	8 (29)
	72	30	30	28 (93)	2 (7)
PBS+1.5M-DMSO	6	15	15	15 (100)	14 (93)
	12	28	25	25 (100)	15 (60)
	24	28	22	21 (95)	0 (0)
PBS+1.5M-EG	6	15	15	15 (100)	15 (100)
	12	20	19	19 (100)	18 (95)
	24	20	20	20 (100)	14 (70)
	48	20	19	19 (100)	1 (5)
	72	20	20	20 (100)	1 (5)
PBS+1.5M-Glycerol	6	15	15	15 (100)	14 (93)
	12	20	19	19 (100)	17 (89)
	24	20	20	20 (100)	15 (75)
	48	20	20	19 (95)	1 (5)
	72	27	26	26 (100)	1 (4)
PBS+1.5M-DMFA	1	25	25	25 (100)	19 (76)
	3	19	18	18 (100)	0 (0)
	6	20	20	20 (100)	0 (0)
	12	20	20	11 (55)	0 (0)

* Percentage of recovered embryos.

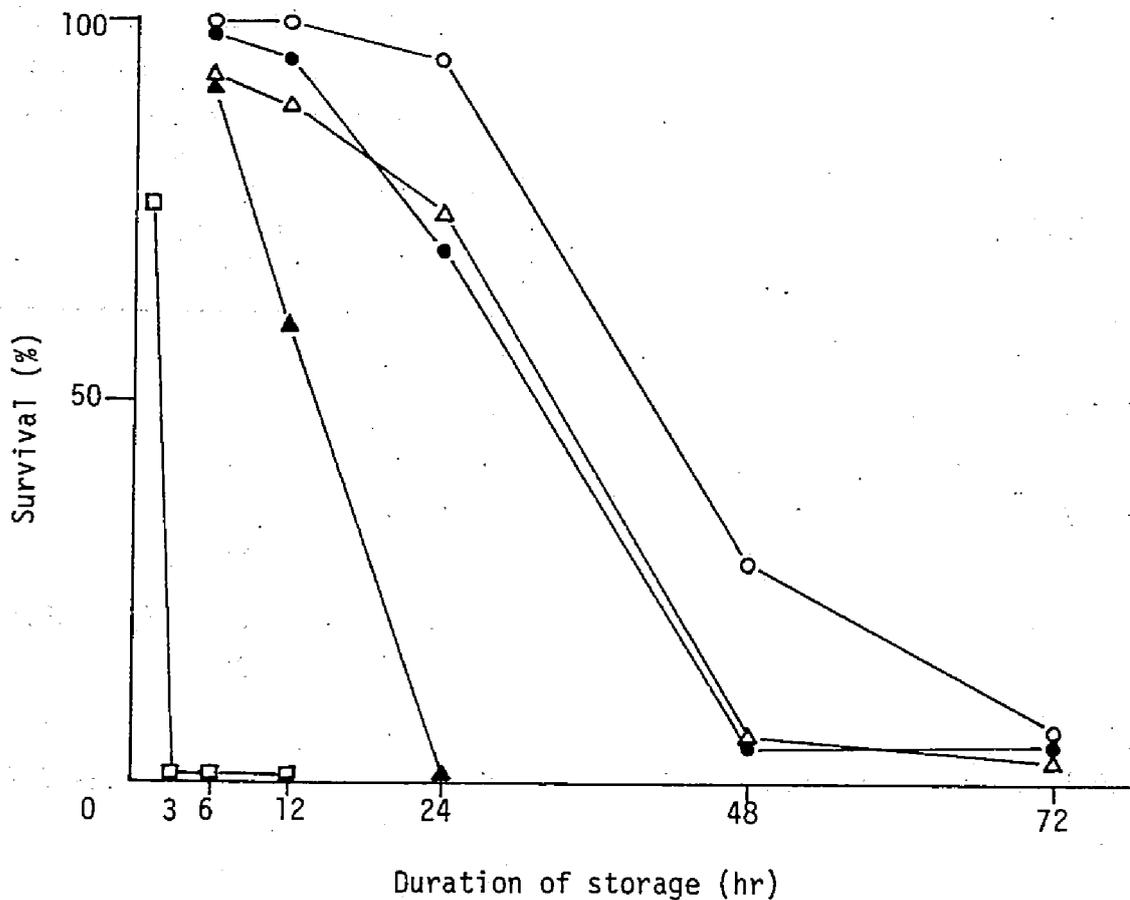


Fig. 1. Survival of mouse embryos stored for various periods at 20°C in PBS(○) and PBS containing 1.5 M-DMSO(▲), EG(●), Glycerol(△) or DMFA (□).

胚の生存率は、12時間後60%、24時間後0%と急激に低下した。さらに、1.5M-DMFAを含むPBSでは3時間保存後の生存率はすでに0%であり、極めて強い毒性を示した。

マウス胚を同様の保存液中に浮遊させ、0°Cに保存した実験の結果をTable 3 および

Table 3. Survival of mouse embryos stored for various periods at 0°C in PBS with and without cryoprotective agents.

Medium	Duration of storage (hr)	No. of embryos			
		Stored	Recovered	Morphologically normal (%)*	Developed to expanded blastocyst (%)*
PBS	6	30	28	26 (93)	26 (93)
	12	25	24	24 (100)	17 (71)
	24	25	25	25 (100)	11 (44)
	48	35	33	32 (97)	3 (9)
	72	25	25	13 (52)	2 (8)
PBS + 1.5M-DMSO	6	15	14	14 (100)	14 (100)
	12	20	20	20 (100)	11 (55)
	24	26	26	25 (96)	0 (0)
PBS + 1.5M-EG	6	15	15	15 (100)	14 (93)
	12	20	20	20 (100)	19 (95)
	24	33	32	31 (97)	8 (25)
	48	28	27	27 (100)	7 (26)
	72	20	19	18 (95)	1 (5)
PBS + 1.5M-Glycerol	6	15	15	15 (100)	15 (100)
	12	25	24	24 (100)	9 (38)
	24	33	31	30 (97)	15 (48)
	48	30	29	20 (69)	10 (34)
	72	20	18	12 (67)	0 (0)
PBS + 1.5M-DMFA	1	20	20	20 (100)	15 (75)
	3	20	20	20 (100)	4 (20)
	6	21	19	19 (100)	0 (0)
	12	22	22	21 (95)	0 (0)
	24	22	22	7 (32)	0 (0)

* Percentage of recovered embryos.

Fig. 2 に示した。耐凍剤を含まない PBS 中に保存された胚の生存率は、 20°C に保存された場合に比べて急激に低下した。1.5M-EG および 1.5M-Glycerol 添加区では、24時間保存後の生存率は 20°C 保存に比べて低い値であったが、48時間保存後はむしろ高い値であった。これに対し、1.5M-DMSO および 1.5M-DMFA

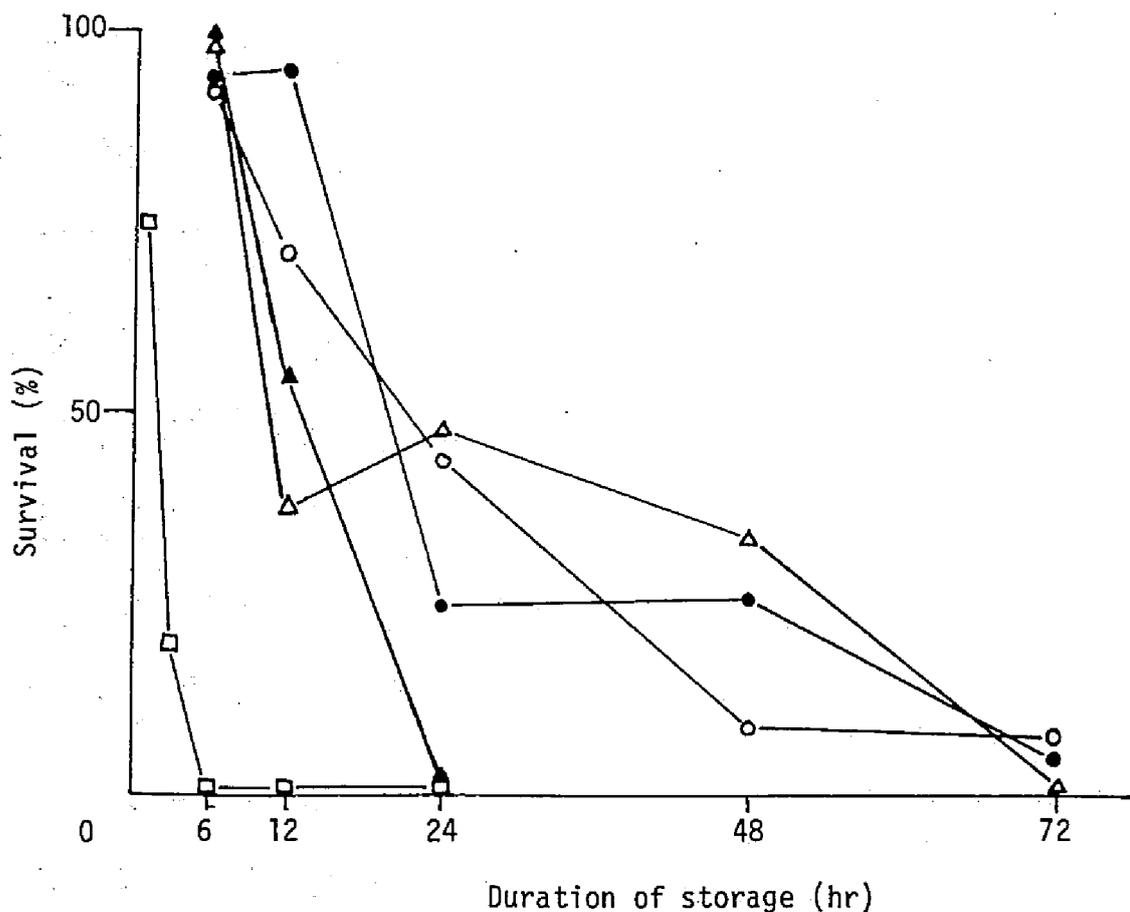


Fig. 2. Survival of mouse embryos stored for various periods at 0°C in PBS(○) and PBS containing 1.5 M-DMSO(▲), EG(●), Glycerol(Δ) or DMFA (□).

添加区では、 20°C 保存の場合とほぼ同様に、それぞれ 24 および 6 時間後の生存率は 0% を示した。

III 考察

室温から 0°C までの冷却速度および 0°C から室温に戻す速度が 0°C に 60 分間保存したマウス胚の生存性に及ぼす影響についてしらべた結果 (Table 1)、両速度に関係なく高い生存率²⁸⁾が得られた。Whittingham & Wales (1969) は、マウス 2 細胞期胚を毎分 4.5 および 0.1°C の速度で 5°C まで冷却して保存する実験をおこない、冷却速度は胚の生存性に影響しないことを報告している。また、マウス 8 細胞期⁷²⁾胚およびマウス未受精卵¹⁰⁾においても、 0°C への冷却速度は生存性に影響しないとされている。これらのことから、マウス卵子では、精子にみられるようないわゆる寒冷衝撃はみられないと考えられる。これに対して、Chang²⁾ (1947, 1948)³⁾ は、 $5\sim 0^{\circ}\text{C}$ へ急冷された家兎 2

細胞期胚は、緩慢冷却された卵子に比べて生存率が低下することを観察し、卵子においても寒冷衝撃が存在すると考えた。近年の報告では、マウスのみならず、家兎およびウシ受精卵においても 0°C まで急冷した実験が多く、一般には卵子の寒冷衝撃は認められていないものの、めん羊胚では、 -7°C (過冷却)まで急冷することにより生存率が低下したという報告もみられ、マウス未受精卵、家兎、山羊およびウシ胚の凍結保存の際、 0°C までを毎分 1°C 程度の緩慢冷却をおこなった実験がみられる。このように、室温から 0°C までの速度については、必ずしも一致した結果が得られておらず、動物種および卵子の発育段階ごとに検討する必要があると思われる。

マウス胚の保存期間と生存性の関係をしらべた実験の結果、耐凍剤を含まないPBS中に保存された胚の24時間後の生存率は、 20°C では95%であったのに対し、 0°C では44%であった。すなわち、マウス桑実胚の保存は 0°C

に比べて 20°C の方がやや適していると思われる。Whittinghamら(1969)²⁸⁾は、マウス2細胞期胚をPBSに浮遊させて $0, 5$ および 10°C に保存した結果、生存率は時間と共に低下するが、温度による差はないと報告している。また、Whittingham(1974)⁷²⁾は、 0°C でPBS中にマウス桑実胚～初期胚盤胞を保存した場合、72～120時間後も高い生存率(68～93%)を示すとしているが、本実験で得られた値は、これより低い値(8%)であり、一致しなかった。耐凍剤を含む液で胚を長時間保存した実験はほとんどなされていないが、耐凍剤の卵子に対する毒性を知る上で興味深い。本実験の結果、EGあるいはGlycerolを添加したPBS中で保存された胚の生存率は、PBSを用いた場合に近い値を示し、両耐凍剤は極めて毒性が少ないと推測される。これらに比べて、DMSOはやや毒性が強く、DMFAに至っては、わずか3時間保存後に大部分の胚が傷害を受けたことから、胚にとっては極めて毒性が強いと考え

られる。

IV 摘要

室温と 0°C 間の冷却-加温速度 および PBS 中あるいは各種耐凍剤存在下における保存期間 (0°C , 20°C) が、マウス桑実胚の生存性に及ぼす影響について検討した。得られた主な結果は以下の通りである。

1. 0°C に60分間保存された胚は、室温と 0°C 間の冷却および加温速度に関係なく、高い生存率を示した。
2. 耐凍剤を含まない PBS 中に保存された胚の生存率は、 0°C に比べて 20°C の方が高かった。
3. 20°C あるいは 0°C 下で、 1.5M の EG あるいは Glycerol を添加した PBS 中に保存された胚は、無添加の PBS を用いた場合に近い生存性を示したのに対し、DMSO 添加区の生存率はやや急激に低下し、DMFA 添加区では、3時間後の生存率が $20\sim 0\%$ まで低下した。

このことから、EGおよびGlycerolのマウス胚に対する毒性は極めて低く、DMSOはいく分毒性をもち、DMFAは強力な毒性を持つと考えられた。

第3節 植氷温度が胚の生存性に及ぼす影響

精子の凍結の際には植氷はおこなわれていないが、卵子の凍結では、一般に大きな過冷却を避けるために凍結液の氷点下 $1\sim 2^{\circ}\text{C}$ の温度において植氷がおこなわれている^{30), 38)}。本実験では、凍結実験の第一段階として、凍結液の氷晶形成誘起(植氷)温度が -20°C まで凍結された胚の生存性に及ぼす影響についてしらべた。

I 実験材料および方法

実験方法は Whittinghamら(1972)³⁰⁾によるマウス受精卵の凍結法を多少修正して用いた。5~10週令のICR系雌マウスに過排卵誘起後交配させ、3日目の子宮をPBSで灌流することにより桑実胚を回収した。一部の胚は対照区としてただちに培養に供し、残りは10~20個おつ、あらかじめ 0.1ml のPBSを入れたガラス試験管中に移して 0°C 氷水中に浸して冷

却した ($40^{\circ}\text{C}/\text{分}$)。耐凍剤として、あらかじめ 0°C に冷却された 3.0M-DMSO 添加 PBS 0.1ml を 0.05ml ずつ 2 回に分けて添加し、それぞれ 5 分間の平衡をおこなった (最終濃度 1.5M-DMSO)。

植氷の有無が -20°C に凍結された胚の生存性に及ぼす影響をしらべる実験では、一部の試料は -20°C アルコール中に投入して急冷し、他の試料は -4°C アルコール中に浸して数分後、液体窒素で冷却された柄付針の先端を凍結液面にふれることにより植氷をおこない、5分後に -20°C アルコール中に投入した。

植氷温度が -20°C に凍結された胚の生存性に及ぼす影響をしらべる実験では、ドライアイス片をアルコールに添加することにより、 $1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の速度で -4 , -9 あるいは -12°C まで冷却したのうち植氷したか、 -12°C まで過冷却された試料は、わずかの物理的ショックにより自然に氷晶形成が誘起された。植氷温度に 5 分間保ったのうち、再び $1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の速度で -20°

Cまで冷却した。また一部の試料は、 -12°C にて氷晶形成後ただちに -4°C アルコール中に戻して5分間保ったのち、再び $1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の速度で -20°C まで冷却した。

冷却-保存の過程でアルコール温度が上昇するのを抑えるために、Fig. 3に示したよう

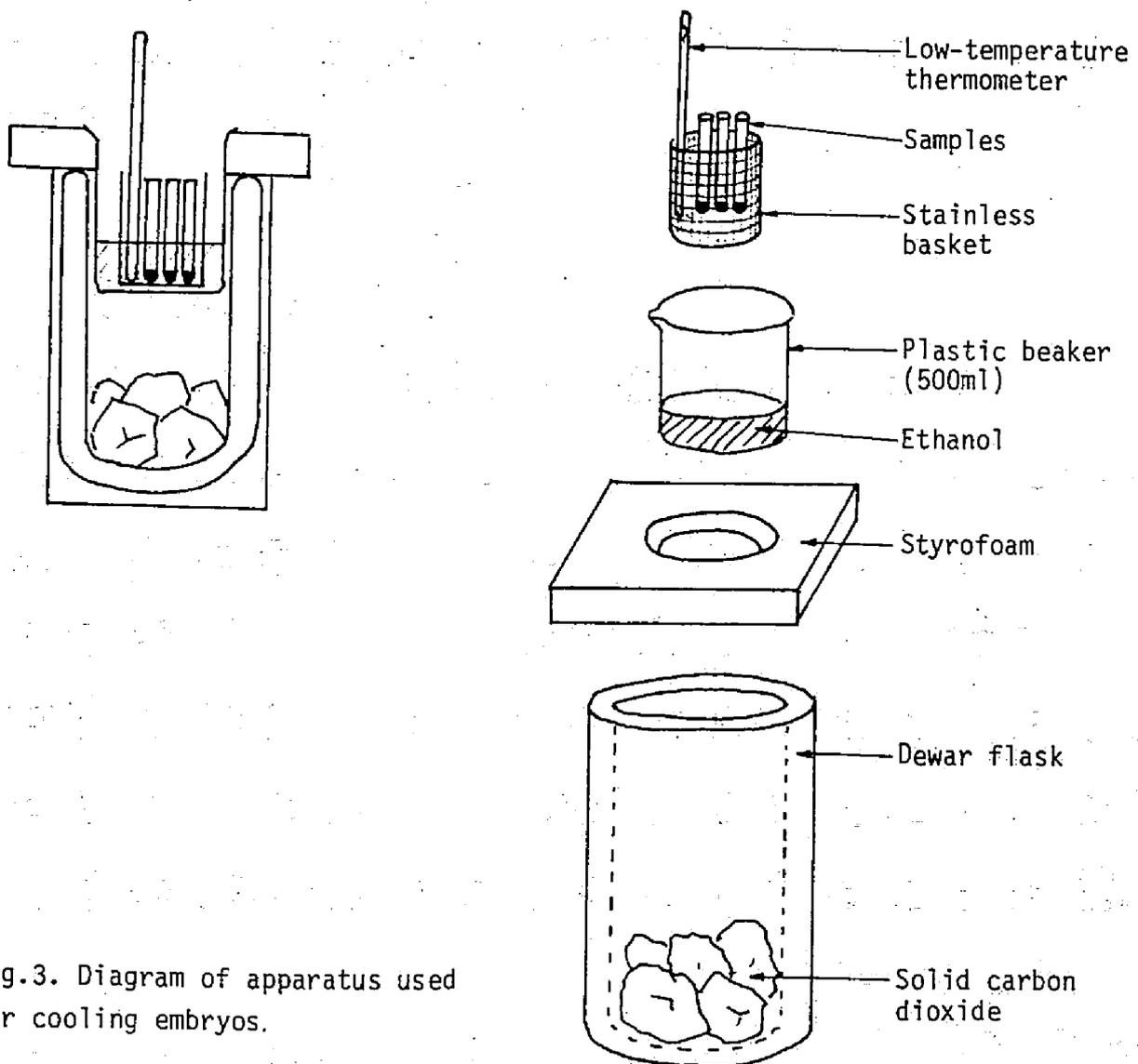


Fig.3. Diagram of apparatus used for cooling embryos.

な低温気相を用いた。試料は、 -20°C に30分間保存したのち室温空气中に放置することにより融解させ ($8.5^{\circ}\text{C}/\text{分}:-20\sim-5^{\circ}\text{C}$)、室温にて0.2, 0.4 および0.8 ml のPBSを3分間隔で加えてDMSOを段階的に希釈したのち胚を回収した。さらに新鮮なPBSに胚を移して2回洗浄したのち修正KRB液で2~3日間培養し、Expanded blastocyst まで発育したものを生存卵子とした。

II 実験結果

まず、植氷の有無が -20°C に急冷されたマウス胚の生存性に及ぼす影響をしらべた結果、Table 4 に示すように、 -4°C で植氷された胚の生存率(90%)が、採卵後ただちに培養された対照区(96%)に近い値であったのに対して、植氷をおこなわずに -20°C まで急冷された胚の生存率(24%)は大きく低下することが認められた。

つぎに、植氷温度が、毎分 1°C の速度で

Table 4. Effect of seeding on the development of mouse morula embryos after rapid freezing to -20°C .

Treatment	No. of embryos		
	Frozen	Recovered	Developed to expanded blastocyst (%)
Seeded at -4°C	75	63	57 (90)
Without seeding	55	54	13 (24)
Control ⁺	-	80	77 (96)

* Percentage of recovered embryos.

+ Embryos were cultured without cooling.

Table 5. Effect of the temperature at which ice formation was induced on the development of mouse morula embryos frozen to -20°C .

Seeding temperature ($^{\circ}\text{C}$)	No. of embryos		
	Frozen	Recovered	Developed to expanded blastocyst (%)
-4	74	70	62 (89)
-9	81	72	41 (57)
-12	77	68	20 (29)
-12 ⁺	48	48	24 (50)

* Percentage of recovered embryos.

+ As soon as ice formation was induced, samples were transferred to -4°C ethanol bath cooled to -20°C at $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

-20°Cまで凍結されたマウス胚の生存性に及ぼす影響について検討した。結果はTable 5に示すごとく、-4°Cにおいて植氷をおこなった場合、融解-培養後の胚の生存率は89%であったのに対し、-9°C植氷区では57%、さらに-12°Cにおいて氷晶形成が誘起された場合の生存率は29%にとどまり、明らかに植氷温度の低下とともに生存率が低下する傾向がみられた。一方、-12°Cにて氷晶形成後ただちに-4°Cアルコール中に戻したのち-20°Cまで冷却した場合の胚の生存率は50%であり、-12°C植氷区(29%)に比べていく分改善されたものの、なお低率にとどまった。

III 考察

凍結液の氷点は、添加される耐凍剤の濃度により異なり、1.5M-DMSOを含むPBSの場合約-3.0°Cである。本実験において、-4°Cで植氷をおこなった場合に比べて、植氷をおこなわなかった場合、あるいは-9~-12°Cにおい

て植氷した場合の方が、 -20°C に凍結された胚の生存性の低いことが観察された。Whittingham⁹³⁾(1977)は、1.5M-DMSOを含むPBSに浮遊させた8細胞期マウス胚を種々の温度で植氷後 -196°C まで凍結する実験をおこない、植氷温度が $-3\sim-6^{\circ}\text{C}$ では胚の生存率は低下しないが、 $-7\sim-10^{\circ}\text{C}$ での植氷では急激に低下し、 -12°C 以下では全く生存しないことを報告した。尾川・友田⁴⁷⁾(1974)および尾川・友田・薄井⁹⁴⁾(1975)は、マウス、ラットおよび家兎胚を -196°C まで凍結し、植氷をおこなわなかった場合は生存胚の得られないことを報告している。さらにめん羊胚⁶⁶⁾においても、 $-7\sim-10^{\circ}\text{C}$ で植氷した場合に比べて、 $-19\sim-20.5^{\circ}\text{C}$ で氷晶形成が誘起された場合、生存率が大きく低下することが報告されており、一般に、低温における氷晶形成は、胚の生存性にとって極めて有害であると考えられる。内海・沖増・湯原⁹⁵⁾(1976)は、ストローに入れたラット胚を植氷をおこなわずに約 -20°C で氷晶形成誘起

後ただちに加温し、再び冷却する方法を用いて生存胚を得ているが、本実験において、 -12°C にて氷晶形成後ただちに -4°C にもどしたのち再び冷却した場合、いく分傷害は緩和されたものの、すぐれた生存率は得られなかった。このことから、低温における氷晶形成そのものが何らかの傷害を胚に与えるのではないかと考えられるが、一方では -12°C における植氷自体は有害でないという報告⁹³⁾もみられる。低温における植氷による傷害の機作について Whittingham (1977)⁹³⁾は、細胞膜の構造が変化を受け、その後の脱水が順調にすすまないのではないかと推測しているが、詳細についてはいまだ不明である。いずれにしても、卵子の凍結においては、精子の凍結の際に生じるような大きな過冷却を避け、凍結液の氷点下数度の温度域で植氷をおこなうべきであろう。

IV 摘要

本節では、マウス桑実胚を1.5M-DMSOを含むPBSに浮遊させて -20°C まで冷却し、凍結液の氷晶形成温度が胚の生存性に及ぼす影響についてしらべ、つぎの結果を得た。

1. 植氷処理を施さずに胚を -20°C へ急冷することにより、生存率は著しく低下した。
2. 植氷温度が低下するに従って胚の生存率は低下した。
3. -12°C で氷晶形成された胚は、ただちに -4°C へ戻してから再び冷却することにより、いく分生存性が改善されたが、なお半数が傷害を受けた。
4. 以上の結果から、 -4°C 程度の高い温度域での植氷が好ましいと結論される。

第4節 凍結速度および保存温度が緩慢融解された胚の生存性に及ぼす影響

Whittinghamら(1972)³⁰⁾の報告以来、哺乳動物卵子の凍結に関する報告は数多く見られるが、その耐凍メカニズムに関する研究は比較的少ない。Mazur(1970)⁹⁶⁾は、細胞の凍結速度と凍害のメカニズムに関して二要因仮説(Two-factor hypothesis)を発表したが、これは、凍結速度が最適よりも速くなると細胞からの脱水が不十分なために細胞内凍結がおこりやすくなり、細胞の生存率は減少するが、これに対して最適速度よりも遅い速度で凍結された細胞は、細胞外凍結のために濃縮された細胞内外の溶液に長い間さらされることによるいわゆる“Solution effects”によって傷害を受けるというものである。マウス受精卵の凍結においては、 $0.2 \sim 1.0^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 程度の緩慢な冷却速度が必須と考えられているが、これは、Mazurの説によれば、マウス胚は Solution

effects によるよりは、細胞内凍結によってより傷害を受けやすいことを意味している。本実験は、二要因仮説に基づき、凍結速度のもつ意義について検討し、同時に凍結所要時間の短縮を試みたものである。

I 実験材料および方法

5~10週令のICR系雌マウスを常法に従って過排卵誘起後雄と交配させ、HCG注射後75~77時間目の子宮を灌流して桑実期の胚を得た。灌流液および凍結液にはPBSを用いた。形態的に正常と思われる胚を10~20個ずつ、0.1mlのPBSを入れたガラス試験管(10×100mm)か、あるいはスクリー・キャップ付のプラスチック試験管(12×90mm)に移し、直接氷水中に浸すことにより0°Cまで冷却した。同温度で、3.0M-DMSO添加PBS 0.1mlを0.05mlずつ2回に分けて加え、それぞれ5分間の平衡をおこなった(最終濃度1.5M-DMSO)。ついで試料を-4°Cアルコール中に浸し、3~5分後

に植氷して5分間保ったのち、アルコールにドライアイス片を添加することにより冷却した。

冷却速度が胚の生存性に及ぼす影響をしらべる実験では、毎分0.25, 1.0, 5および10°Cの速度で-10~-75°C間の種々の温度まで結結後、それぞれ5分間保ったのち融解した。-75°Cまで冷却した試料の一部は、液体窒素ガス中で-196°Cまで凍結した。

緩慢冷却後の急冷が胚の生存性に及ぼす影響につき検討した実験では、毎分1°Cの速度で-20~-60°C間の種々の温度まで試料を冷却後、ただちに-75°Cアルコール中に浸漬して急冷した。

脱水誘起時間をしらべた実験では、毎分5°Cの速度で-50°Cまで凍結後、同温度に一定時間保ったのち、-75°Cアルコール中に浸漬して急冷した。

保存温度と保存期間の関係についてしらべた実験では、毎分1°Cの速度で-25, -50お

よび -75°C まで冷却後、それぞれ -25°C ストッカー、 -50°C および -75°C アルコール中に保存した。 -50°C 保存区では、アルコールを同温度に長時間保持させるために Fig. 4 に示すような装置を考案し、約12時間ごとにドライアイス (300~350 g) を補充した。その結果、アルコールの温度は $50 \pm 2^{\circ}\text{C}$ の範囲内に保たれた。

融解は、すべて室温空气中に試料を放置することによりおこない ($25^{\circ}\text{C}/\text{分}$; $-75 \sim -10^{\circ}\text{C}$)。室温で 0.2, 0.4 および 0.8 ml の PBS を 5 分間隔で添加して

DMSO を希釈した。回収した胚は、PBS で洗浄後修正 KRB 液で 2~3 日間培養し、

Expanded

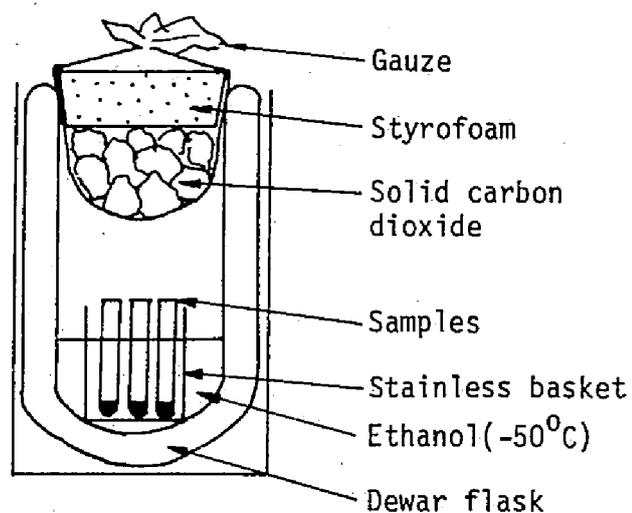


Fig. 4. Diagram of apparatus used for storage of samples at -50°C for prolonged period.

blastocystまで発育したものを生存胚と判定した。なお、 -79°C に90日間保存された胚の一部は、in vivoでの発育をしらべるために、融解後22時間培養したのち、偽妊娠4日目のIVCS系雌マウスの子宮に移植した。偽妊娠は精管結紮して不妊であることが確かめられた雄と交配させることにより誘起した。

II 実験結果

種々の冷却速度で凍結されたマウス桑実胚の各温度における生存性を Table 6 および Fig. 5 に示した。毎分 0.25 および 1.0°C の速度で冷却された胚は、 -75°C まで凍結後も極めて高い生存率 ($97\sim 98\%$) を示したが、 -196°C まで冷却すると生存率は $61\sim 66\%$ に低下した (Fig. 6-a, b)。これに対して、毎分 5°C の速度で冷却された胚の生存率は、 -20 および -30°C まで冷却後それぞれ 97 および 92% あったが、 -40 および -50°C では若干低下し (それぞれ 69 および 72%)、その後 -60 , -75°C

Table 6 Survival of mouse morula embryos after freezing to various temperatures at different cooling rates.

Cooling rate (°C/min)	Freezing temperature (°C)	No. of embryos		
		Frozen	Recovered	Developed to expanded blastocyst (%)*
0.25	-20	50	49	47 (96)
	-50	50	50	48 (96)
	-75	50	50	49 (98)
	-196	74	68	45 (66)
1.0	-20	64	61	55 (90)
	-50	52	51	43 (84)
	-75	63	61	59 (97)
	-196	54	52	32 (61)
5.0	-20	53	52	50 (96)
	-30	51	50	44 (88)
	-40	42	41	31 (76)
	-50	59	59	45 (76)
	-60	53	52	24 (46)
	-75	73	69	24 (35)
	-196	29	29	5 (17)
10.0	-10	52	51	48 (94)
	-20	58	56	48 (86)
	-30	70	68	34 (50)
	-40	71	70	33 (47)
	-50	55	51	16 (31)
	-60	55	51	1 (2)
	-75	53	50	0 (0)

* Percentage of recovered embryos.

と凍結温度が低下するに従って減少した(それぞれ 46 および 35%)。さらに冷却速度を毎分 10°C まで上げると、生存率は温度の低下と共にさらに急激な低下を示し、 -60 および -75°C まで凍結後の生存率はそれぞれ 4 および 0% で、ほとんどすべての胚が傷害を受けた。

これら比較的急速な凍結にみられる傷害は、脱水速度が冷却速度に追いつかず、細胞内に氷晶が形成された結果おこるのではないかと

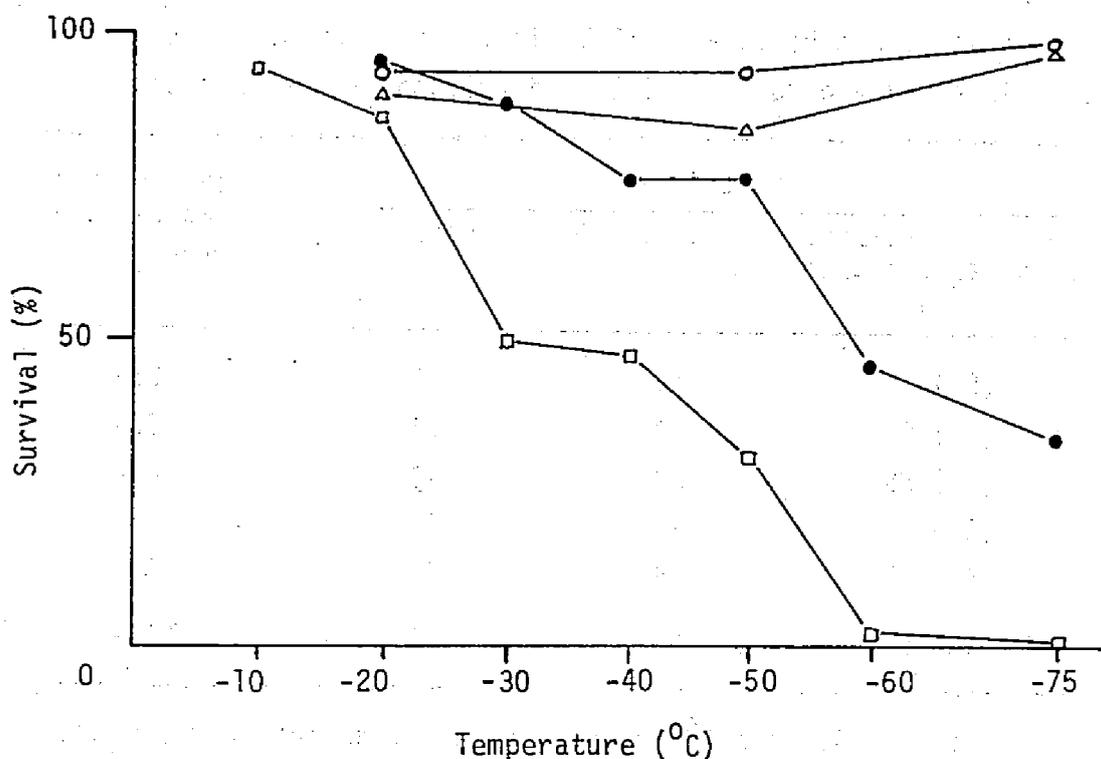


Fig. 5. Survival of mouse morula embryos after freezing to various temperatures at the rates of 0.25(○), 1.0(△), 5.0(●) and 10(□) $^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

推測し、十分脱水され、加えて急冷が可能な温度域をしらべるために、試料を毎分 1°C の速度で種々の温度まで冷却後、 -75°C アルコール中に投入して急冷する実験をおこなった。結果は Table 7 に示されている。 -20 および -30°C まで緩慢冷却後 -75°C へ急冷された胚の生存率はそれぞれ 2 および 3% であり、ほとんどすべての胚が傷害を受けた。しかし、 -40°C から急冷された胚では 38% が生存して

Table 7. In vitro survival of frozen-thawed mouse morula embryos after rapid cooling to -75°C from various temperatures.

Temperature from which cooled rapidly ($^{\circ}\text{C}$)	No. of embryos		
	Frozen	Recovered	Developed to expanded blastocyst (%)*
-20	54	51	1 (2)
-30	62	60	2 (3)
-40	59	58	22 (38)
-50	50	49	42 (86)
-60	52	52	43 (83)
-75^+	63	61	59 (97)

Embryos had been cooled at a rate of $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ before rapid cooling.

* Percentage of recovered embryos.

+ Embryos were cooled to -75°C at $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

おり、 -50 および -60°C からの急冷によって、さらに高い生存率(それぞれ 86 および 80%) が得られた。

上記の実験で、 -50°C まで緩慢冷却された胚を -75°C まで急冷することにより高い生存率が得られたのは、 -50°C においてすでに十分脱水がすすんでいたものと推測される。一方、すでに Table 6 に示したように、毎分 5°C の速度で凍結された胚の生存率は、 -50°C においては 76% であったが、 -75°C では 35% に低下した。そこで、毎分 5°C の速度で凍結された胚を -50°C に一定時間保つことにより、適切に脱水がすすみ、 -75°C への急冷に耐えることが考えられたので、次の実験をおこなった。その結果、Table 8 に示すように、毎分 5°C の速度で -50°C まで冷却された試料をただちに -75°C アルコール中に浸漬した場合、生存率は極めて低率(4%)であり、5分間 -50°C に保持後急冷したもののでは 14% であった (Fig. 6 - C, d)。これに対して、30分間同

Table 8. Effect of the time held at -50°C before rapid cooling to -75°C on the development of frozen-thawed mouse morula embryos in vitro.

Time held at -50°C + (min)	No. of embryos		
	Frozen	Recovered	Developed to ex- panded blastocyst (%)*
0	68	67	3 (4)
5	69	66	9 (14)
30	127	122	76 (62)
60	169	167	98 (59)
90	81	72	43 (60)
120	69	67	49 (73)
180	40	40	24 (60)

* Percentage of recovered embryos.

+ Embryos had been cooled to -50°C at $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

温度に保持したのちに急冷処理をおこなった場合、胚の生存率は62%まで上昇し、その後は -50°C での保持時間を180分間まで延長しても生存率はほぼ同じ値(60~73%)であった(Fig. 6-e, f)。

細胞内外の濃縮された溶液による Solution effects が凍結された胚に及ぼす影響をしらべるために、胚を毎分 1°C の速度で -25 , -50 および -75°C まで冷却して保存し、経時的に

融解して生存性をしらべた。Table 9 に示すように、 -25°C に 1, 6, 12 および 24 時間保存された胚の生存率は、それぞれ 98, 61, 4 および 0% であり、比較的短時間で傷害を受けることが観察された。 -50°C において 1, 3, 7, 14 および 30 日間保存された胚の生存率は、それぞれ 87, 73, 51, 5 および 0% であり、 -25°C に比べて長期間保存が可能であったが、この温度ではなお保存限界がみられた。これに対して、 -75°C に保存された胚の生存率は、1 時間後 98% であったのが 24 時間後に 75% まで低下したものの、その後は 3~90 日間保存してもほとんど低下しなかった (64~80%)。

-75°C で 90 日間保存された胚を融解後 22 時間培養し、正常な Blastocyst まで発育したもののうち 8 個を Recipient の片側子宮に移植した結果、妊娠 22 日目に 2 匹の正常な産子を分娩した。

Table 9. Survival of frozen-thawed mouse morula embryos after storage at -25, -50 and -75°C for various periods.

Storage temperature (°C)	Duration of storage	No. of embryos		
		Frozen	Recovered	Developed to expanded blastocyst (%)*
-25	1 h	50	47	46 (98)
	6 h	51	51	31 (61)
	12 h	58	51	2 (4)
	24 h	52	52	0 (0)
	7 days	40	32	0 (0)
-50	1 h	55	53	51 (96)
	24 h	56	55	48 (87)
	3 days	56	55	40 (73)
	7 days	48	47	24 (51)
	14 days	60	59	3 (5)
	30 days	60	58	0 (0)
-75	1 h	53	51	50 (98)
	24 h	74	69	52 (75)
	3 days	55	51	39 (76)
	7 days	60	56	45 (80)
	14 days	65	59	42 (71)
	30 days	45	41	30 (73)
	90 days	30	28	18 ⁺ (64)

* Percentage of recovered embryos.

+ Including early blastocysts developed after 20 hr in culture.

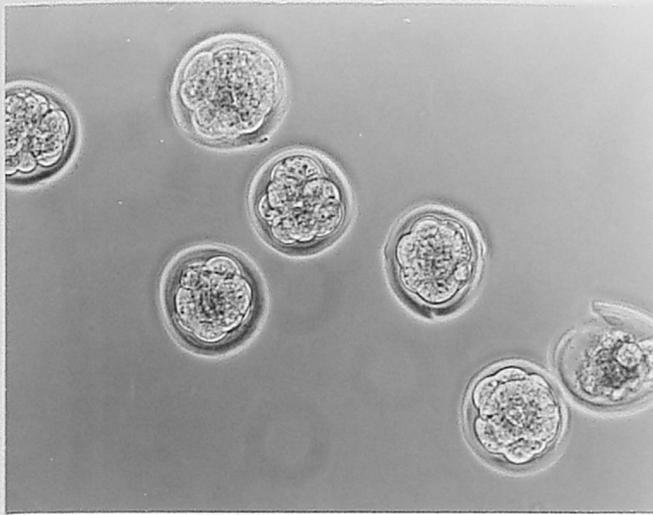
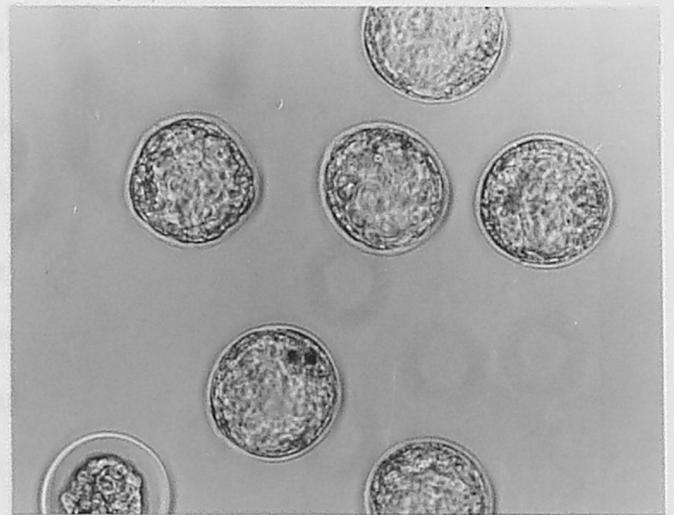
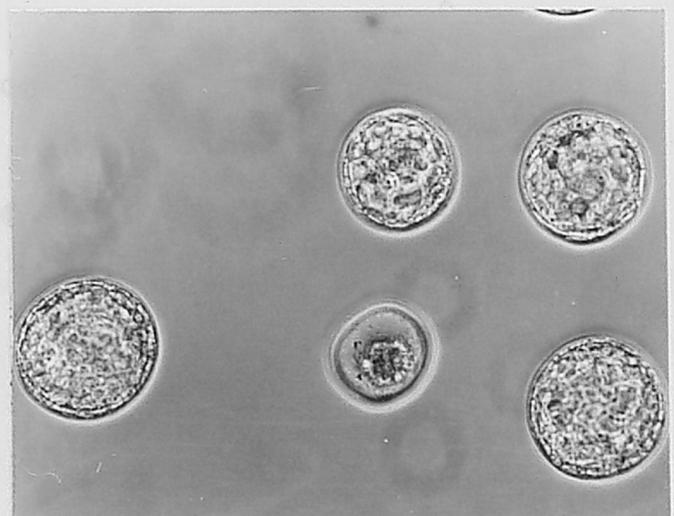
**a****b****c****d****e****f**

Fig. 6. Phase-contrast photomicrographs of frozen-thawed mouse embryos.

Explanation of Fig. 6.

All the mouse eggs were photographed under a phase-contrast microscope with a x10 ocular and x10 objective. All magnification x160:

- a. A group of morula embryos just after thawing. Embryos had been cooled to -75°C at $0.25^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and stored in liquid nitrogen. There are five morphologically normal embryos and one damaged embryo.
- b. A group of embryos cultured in vitro for 48 hr after thawing. Embryos had been cooled to -75°C at $0.25^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and stored in liquid nitrogen. There are six morphologically normal blastocysts and one shrunken embryo.
- c. Four embryos just after thawing. Embryos had been cooled to -50°C at $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and immediately cooled to -75°C rapidly. All the embryos look injured.
- d. A group of embryos cultured for 48 hr after thawing. Embryos had been cooled to -50°C at $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, held at -50°C for 5 min and then cooled to -75°C rapidly. All the embryos are atretic within the zona pellucida.
- e. A group of embryos just after thawing. Embryos had been cooled to -50°C at $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, held at -50°C for 60 min and then cooled to -75°C rapidly. There are five morphologically normal morula embryos and one damaged embryo.
- f. A group of embryos cultured for 48 hr after thawing. Embryos had been cooled to -50°C at $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, held at -50°C for 120 min and then cooled to -75°C rapidly. There are four expanded blastocysts and one degenerated embryo.

III 考察

冷却速度がマウス胚の生存性に及ぼす影響を検討した結果 (Table 6)、毎分 0.25 および 1°C の速度で -75°C まで胚を凍結後、生存率は全く低下しなかった。これに対して、毎分 5°C の速度で凍結された胚の生存率は、凍結温度の低下と共に低下し、毎分 10°C の速度で凍結された場合は、より急激な低下がみられた。Leibo (1976)⁹⁷⁾ は、毎分 15°C の速度でマウス 1 細胞期受精卵を凍結した場合、 $-35 \sim -45^{\circ}\text{C}$ 間で生存率が急激に低下することを観察した。さらに Leibo (1977)⁹⁸⁾ は、毎分 $3 \sim 30^{\circ}\text{C}$ の速度で凍結されたマウス未受精卵は、 $-30 \sim -60^{\circ}\text{C}$ 間において細胞内凍結がおこり死滅するが、毎分 0.5°C の速度で凍結された場合は細胞内凍結はおこらず、細胞の容積が凍結前の約 40% まで収縮することを観察した。これらのことから、本実験において緩慢冷却 ($0.25 \sim 1^{\circ}\text{C}/\text{分}$) された胚は十分脱水されるが、 $5 \sim 10^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の速度で凍結された胚は脱水が不十

分のまま低温にさらされるために細胞内に水
晶が形成され、傷害を受けたものと推測され
る。しかし、急速凍結された1細胞期の卵子
が $-30\sim-60^{\circ}\text{C}$ の温度域において細胞内凍結
により生存率が急激に低下した⁹⁸⁾のに対し、毎
分 10°C の速度で凍結された桑実胚の生存率は、
 -30°C においてすでに50%に低下しており、
 $-20\sim-30^{\circ}\text{C}$ の温度域においても細胞内凍結が
生じるのではないかと考えられる。

マウス桑実胚の最適冷却速度は $1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ ある
いはそれ以下と考えられるが、この値は、ヒ
ト赤血球や培養細胞の最適冷却速度と比較し
てかなり低いものである。^{96), 98)}これは、卵子の容
積に対する表面積の割合が小さく、細胞膜の
水に対する透過性が低く、さらに温度の下降
に伴って水の透過性が著しく減少するため、
脱水に長時間を要するためであると考えられ
ている。

一方、 -75°C まで緩慢冷却($0.25\sim 1^{\circ}\text{C}/\text{分}$)
された胚を -196°C まで冷却することにより生

存率が低下することが観察されたが、 -75°C 以下のような超低温での冷却速度の影響およびその意義についても今後検討の必要があろうと思われる。

毎分 1°C の速度で胚を種々の温度まで凍結した後 -75°C へ急冷した実験 (Table 7.) では、 -50 および -60°C からの急冷後は高い生存率を得たが、 -40°C 以上の温度域から急冷した場合、多くの胚が傷害を受けた。この結果は、Leibo, Mazur & Jackowski (1974)⁴⁵⁾ および宮本・石橋 (1976)⁹⁹⁾ の同様の実験結果と一致し、胚は -50°C まで緩慢冷却されることにより、以下の急冷に耐えうる程度にまで脱水されるものと推測される。

胚を毎分 5°C の速度で -50°C まで冷却後、同温度に一定時間保持したのち -75°C に急冷した実験 (Table 8.) では、0~5分間保持した場合の生存率は極めて低かった (4~14%) のに対し、30分間以上保持することにより 59~73% の生存率を得た。この結果は、 -50°C まで

毎分 5°C の速度で冷却されたため十分脱水されていなかった胚が30分間以上保持されている間に脱水され、以下の急冷に耐え得たことを強く示唆している。また、30分間以上保持後に得られた生存率(59~73%)は、毎分 5°C の速度で -50°C まで冷却後融解された胚の生存率がすでに76%(Table 6)であり、一方、 -50°C まで緩慢冷却後ただちに -75°C まで急冷された胚の生存率が86%(Table 7.)であることから考えて、十分高い値と思われる。

保存温度と保存期間が胚の生存性に及ぼす影響についてしらべた実験の結果(Table 9)、 -25°C および -50°C における保存可能期間は、それぞれ数時間および数日間であった。 -25°C に12時間以上保存された胚は、融解後形態的に正常と思われたものも培養によってほとんど発育しなかったことから、Solution effectsによって傷害を受けたものと考えられる。

Maurerら(1977)¹⁰⁰⁾は、マウス8細胞期胚を -44°C に保存した場合、3日後の生存率はすでに

10%であり、9日後には0%になることを報告している。これらは、本実験で -50°C に保存した場合に得られた値に比べて低いことから、保存温度の低下とともに保存可能期間が延長されるものと思われる。一方、 -79°C に保存された胚は、90日後も生存率は低下せず、Recipientに移植後生存産子が得られたが、Maurerら(1977)¹⁰⁰⁾は、 -88°C に保存されたマウス8細胞期胚は、200日後も生存率は低下せず、移植によって産子が得られたことを報告している。これに対して、宮本・勝浦・石橋(1976)¹⁰¹⁾は、 -79°C に保存されたマウス胚の生存率は7日後75%であるのが30日後48%に低下することを観察しており、本実験の結果とは一致しなかったが、 -79°C における保存期間と生存性の関係を明らかにするためには、さらに長期間の保存実験が必要と思われる。

IV 摘要

マウス胚の凍害メカニズムを、細胞内凍結

と Solution effects の二面から考察するために実験をおこない、以下に示したような結果を得た。

1. 毎分 0.25 および 1°C の速度で凍結された胚を緩慢融解させた結果、生存率は -75°C まで低下しなかったが、毎分 5 および 10°C の速度で凍結された場合は、検査時の温度の低下に従って生存率が低下した。
2. 種々の温度まで緩慢冷却 ($1^{\circ}\text{C}/\text{分}$) された胚を -75°C まで急冷したのち緩慢融解した結果、 -50°C 以下の温度から急冷した場合に高い生存率が得られた。このことから、 -50°C において、脱水がほぼ完了しているものと思われる。
3. 毎分 5°C の速度で -50°C まで冷却された胚をただちに -75°C へ急冷したのち緩慢融解した場合、生存率は 4% であったが、同温度 (-50°C) に 30 分間以上保持したのち急冷した場合の生存率は $59\sim 73\%$ まで高まった。これは、 -50°C に保持されている間に

十分脱水されたためと思われる。

4. -25 および -50°C における胚の保存可能期間は、それぞれ数時間および数日間であったのに対し、 -75°C では 90 日間保存しても生存性は低下しなかった。すなわち、温度の低下と共に保存期間が延長し、 -75°C で保存性がほぼ安定することが認められた。また、 -75°C に 90 日間保存された胚を Recipient に移植後、正常産子が得られた。

第5節 凍結液中のタンパク質成分が胚の生存性に及ぼす影響

1972年、Whittingham³⁰⁾らは、マウス受精卵の凍結液に、Dulbeccoのリン酸緩衝生理食塩水にピルビン酸、グルコース、抗生物質およびBSAを添加したchemically defined mediumを用いて再現性のある凍結方法を報告した。以来、哺乳動物卵子の凍結保存に関する大部分の研究は、このPBSを用いておこなわれている。これに対して内海・湯原⁴⁹⁾は、ラット受精卵の凍結液に血清を添加した生理食塩水を用いており、また、Tsunoda & Sugie¹⁰²⁾は、各種血清を添加した凍結液でウサギ胚を凍結した結果、耐凍性が改善されたことを報告しているが、凍結液中のタンパク質成分がマウス卵子の生存性に及ぼす影響について検討した報告は少ない。本実験では、マウス受精卵の凍結液中に種々の濃度のBSAあるいは精子の凍結に用いられる卵黄を添加し

て凍結し、それらが融解後の胚の生存性に及ぼす影響について検討した。

I 実験材料および方法

5~10週令のICR系雌マウスを常法に従って過排卵誘起後雄と交配させ、HCG注射後75~77時間目に子宮をPBS(3mg/ml BSAを含む)で灌流することにより桑実期の受精卵を得た。

凍結液中のBSA濃度が凍結-融解後の胚の生存性に及ぼす影響に関する実験では、あらかじめガラス試験管(10×100mm)に0, 0.6, 6.0および60mg/mlの濃度のBSAを含むPBS 0.1mlを入れ、10~15個の胚を浮遊させたのち0°C氷水中に浸した。0および0.6mg/ml BSAを含むPBS中に浮遊させる胚は、その前にBSAを含まないPBSで洗浄した。0°Cで、BSAを含まない3.0M-DMSO添加PBS 0.1mlを0.03, 0.03および0.04mlずつ5分間隔で3回に分けて加えることにより最終BSA濃度0, 0.3,

3.0 および 30 mg/ml を得た。

卵黄添加が凍結-融解後の胚の生存性に及ぼす影響に関する実験では、20% (V/V) 卵黄を溶解させた PBS を 1,500 g で 20 分間遠沈した上澄液を 20% 卵黄添加 PBS とし、さらにこの上澄液に 3.0M になるよう DMSO を加えて 1,500 g で 10 分間遠沈した上澄液を 3.0M-DMSO + 20% 卵黄添加 PBS とした。室温にて 0.1ml の 20% 卵黄添加 PBS あるいは無添加 PBS を入れたガラス試験管に 15~25 個の胚を移し、0°C まで急冷したのち、3.0M-DMSO + 20% 卵黄添加 PBS あるいは卵黄を含まない 3.0M-DMSO 添加 PBS を 0.05ml ずつ 2 回添加することにより、最終卵黄濃度 0, 5, 10 および 20% を得た。0% 区のみ 3mg/ml BSA を添加した。

試料は、-4°C のアルコール 200~450 ml を入れた魔法ビン中に移して植氷をおこなったのち、魔法ビンごと液体窒素ガス中につるして毎分約 0.33°C の速度で -80°C まで冷却後、液体窒素中に保存した。アルコール中に浸した

低温々度計により温度を監視し、アルコールの量および魔法ビンと液体窒素液面との距離を変えることにより冷却速度を制御した。試験管を室温空气中に放置することにより融解させ ($25^{\circ}\text{C}/\text{分}$)、0.1, 0.2, 0.3, 0.4 および 0.4 ml の PBS を 3 分間隔で添加することにより DMSO を希釈したのち胚を回収し、洗浄し、最後に修正 KRB 液で培養した。2~3 日間培養後 Expand blastocyst まで発育した卵子を正常な生存胚とした。

II 実験結果

凍結液中に添加した BSA が凍結-融解後のマウス胚の生存性に及ぼす影響についてしらべた結果を Table 10 に示した。凍結液中に含まれる BSA 濃度が 0, 0.3, 3.0 および 30 mg/ml のときの融解-培養後の生存率は、それぞれ 60, 70, 78 および 59% であったが、これら 4 つの値の間に統計的有意差はなかった (χ^2 検定)。

Table 10. Effect of BSA in the freezing medium on the survival of mouse embryos after freeze-thawing.

BSA concentration (mg/ml)	No. of embryos		
	Frozen	Recovered	Developed to expanded blastocyst (%)*
0	57	48	29 (60)
0.3	59	54	38 (70)
3.0	46	45	35 (78)
30.0	45	41	24 (59)

* Percentage of recovered embryos.

Table 11. Effect of egg yolk in the freezing medium on the survival of mouse embryos after freeze-thawing.

Concentration of egg yolk (v/v%)	No. of embryos		
	Frozen	Recovered	Developed to expanded blastocyst (%)*
0**	66	62	41 (66)
5	68	60	38 (63)
10	67	61	38 (62)
20	73	69	44 (64)

* Percentage of recovered embryos.

** 3mg/ml of BSA was added to the medium.

凍結液中に添加した卵黄が凍結—融解されたマウス胚の生存性に及ぼす影響についてしらべた結果を Table 11 に示した。凍結液中に 0, 5, 10 および 20% の卵黄を添加した場合の凍結—融解後の生存率は、それぞれ 66, 63, 62 および 64% であり、この場合も卵黄添加の影響は全くみられなかった。

Ⅲ 考察

本実験で得られた結果によれば、凍結液中に 0~30 mg/ml BSA あるいは 0~20% 卵黄を添加して凍結された胚の生存率の間に有意差はなかった。すなわち、マウス胚の凍結の際には、BSA や卵黄の添加は耐凍性を高める効果はないと結論される。凍結液中にタンパク質を全く含まずに胚を凍結した報告はみられないが、本実験において BSA を全く含まない区においても他区に匹敵する生存率が得られたことは注目する。通常、哺乳動物胚を *in vitro* で取扱う際には血清成分が添加される

が、卵子の凍結保存においては、凍結液中のタンパク質成分は、本質的な役割を果たすものではないと考えられる。

Fiser & Macpherson⁽¹⁹⁷⁷⁾は、50% 卵黄を添加した液でマウス胚を凍結した結果、無添加の場合に比べて若干生存率を高める効果があったことを報告している(72% vs 65%)。本実験に用いた卵黄濃度は最高20%であり、50%添加により生存率が改善される可能性については否定できないが、凍結精子におけるような効果はないものと思われる。

IV 摘要

本実験では、マウス桑実胚の凍結液中に、BSA あるいは卵黄を添加して -196°C まで凍結し、それらが生存性に及ぼす影響についてしらべた。得られた結果の概要は以下の通りである。

1. 凍結液中に0.3, 3.0および30mg/mlの濃度のBSAを添加して凍結した胚の生存率

は、それぞれ 70, 78 および 59% で有意差はなく、また BSA を全く含まない場合も同様の生存率 (60%) を得た。

2. 凍結液中に 5~20% の卵黄を添加して胚を凍結した結果、融解後の生存率は、無添加のものとは全く差がなかった。

第6節 融解速度が緩慢凍結された胚の生存性に及ぼす影響

1972年のWhittingham³⁰⁾らによるマウス胚凍結保存の成功は、緩慢な冷却および融解速度を用いたことによるといわれている⁷¹⁾。本節では、緩慢な融解速度を必要とする温度域を明らかにすることを目的としてマウス胚の凍結実験をおこなった。

I 実験材料および方法

5~10週令のICR系雌マウスを常法に従って過排卵誘起後雄と交配させ、HCG注射後75~77時間目の子宮を灌流して桑実胚を得た。形態的に正常と思われる胚を10~16個ずつ、あらかじめ0.1mlのPBSを入れたガラス試験管へ移して0°Cへ急冷したのち、耐凍剤として3.0M-DMSO添加PBS 0.1mlを5分間隔で3回に分けて添加した。試料は-4°Cのアルコールを含む魔法ビン中に移して植氷をおこなったの

ち、魔法ビンごと液体窒素ガス中につるして約 $0.33^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の速度で -80°C まで冷却後、液体窒素中に保存した。

対照区の試料は室温空气中に放置して融解したが、実験区では -196°C からの一定温度域を急速融解させるため、一部の試料は -75 、 -25 あるいは -10°C アルコール中に浸し約5分間保ったのち室温空气中に放置して融解し、残りは 0 あるいは 30°C 水中に直接浸して軽く振とうして融解した。融解後は室温で 1.4ml の PBS を5回に分けて添加して DMSO を希釈したのち胚を回収し、PBS で洗浄した。修正 KRB 液で 2~3 日間培養し、Expanded blastocyst まで発育した胚を生存胚とした。

II 実験結果

Table 12 に示したように、 -196°C に保存された試料を室温空气中で緩慢融解した場合（対照区）の胚の生存率は 67% であった。試料を -196°C から -75 、 -25 あるいは -10°C アル

コールに浸漬させたのうち緩慢融解させた場合の生存率はそれぞれ 68, 69 および 69% であって、対照区と差はみられなかった。これに対して 0 および 30°C 水中に浸して急速融解させた胚の生存率はそれぞれ 51 および 11% であり、0°C 区は統計的有意差はなかったものの対照区に比べて低い値であった。

Table 12. Effect of rapid warming to various temperatures from -196°C on the survival of frozen mouse embryos.

Temperature to which warmed rapidly ($^{\circ}\text{C}$)	No. of embryos		
	Frozen	Recovered	Developed to expanded blastocyst (%) [*]
Control ^{**}	54	52	35 (67)
-75	52	47	32 (68)
-25	48	45	31 (69)
-10	41	39	27 (69)
0	56	53	27 (51)
30	45	38	4 (11)

* Percentage of recovered embryos.

** Embryos were warmed slowly from -196°C .

Ⅲ 考察

本実験で、マウス胚を -196°C から -10°C まで急速に加温したのち 0°C まで緩慢融解させた場合の生存率は、 -196°C から 0°C までを緩慢融解させた場合とほぼ同じ生存性が得られた。このことから、 -196°C から -10°C までの融解速度は、胚の生存性に影響を及ぼさないと考えられる。Whittinghamら(1972)³⁰⁾は、 -78°C に凍結されたマウス胚を氷水中で融解させた場合の生存率は $0\sim 48\%$ に低下することを報告し、宮本・石橋(1976)⁴⁰⁾は、 -196°C 保存されたマウス胚を 5°C 水中で融解させることにより生存率が 0% になることを認めている。本実験で、マウス胚を 0°C まで急速融解させた場合の生存率は、有意差はなかったもののいく分低かった(51%)。さらに 30°C 水中で融解させた場合、生存率は大きく低下した(11%)³⁰⁾が、これはWhittinghamら(1972)³⁰⁾の実験結果($0\sim 10\%$)と一致する。これらの結果より、 0°C 以上まで急速融解すると生存率は確実に

低下するが、その原因や機構については明らかになっていない。Leiboら(1974)⁴⁵⁾は、急速融解した場合には浸透圧の急激な変化が生じ、そのために胚が傷害を受ける可能性を示唆したが、一方で最適融解速度は冷却速度によって異なることが知られており^{38), 45)}、真の傷害の機作は不明である。

IV 摘要

本節では、 -196°C に緩慢凍結されたマウス胚を種々の温度まで急速に加温融解し、その後の生存性に及ぼす影響について検討した。得られた結果の概要は以下の通りである。

1. -196°C から -75 、 -25 および -10°C まで急速融解したのち緩慢融解した場合の生存率はそれぞれ68、69および69%で、 -196°C から 0°C まで緩慢融解させた場合(67%)とはほぼ同じ値であった。
2. -196°C から 0 および 30°C 水中に浸して融解させた場合の生存率は、それぞれ51お

第7節 三段凍結法により急速凍結された胚の生存性

1972年、Whittingham³⁰⁾らが、毎分 $0.2 \sim 0.8^{\circ}\text{C}$ の緩慢な冷却速度および毎分 $4 \sim 25^{\circ}\text{C}$ の緩慢な融解速度を用いてマウス胚の超低温保存に成功して以来、緩慢な凍結-融解速度は、哺乳動物卵子の凍結保存に必須な条件と考えられてきた。⁷¹⁾

他種細胞の凍結保存では、二段凍結法による急速凍結が広くおこなわれているが、^{104), 105)}哺乳動物卵子においては試みられていない。本研究においては、試料を -20 および -100°C にそれぞれ10分間静置させたのち液体窒素中に急冷する三段凍結法を試み、DMSO濃度、融解速度およびDMSO除去方法がマウス胚の生存性に及ぼす影響について検討した。

I 実験材料および方法

4~6週令のICR系雌マウスを常法に従っ

て過排卵誘起後、雄と交配させ、HCG注射後約75時間目の子宮をPBSで灌流して桑実胚を回収した。PBSで1回洗浄したのち、形態的に正常と思われるものを実験に供した。

DMSO濃度および融解速度が急速凍結された胚の生存性に及ぼす影響を検討する実験では、あらかじめ 0°C 氷水中に浸しておいた、0.2 mlの凍結液を含むガラス試験管(10×100 mm)中に10~15個の胚を直接浮遊させた。凍結液には、PBSに1.0, 1.5, 2.0 あるいは2.5M-DMSOを添加したものをを用いた。5~10分後、DMSO濃度に応じて $-4\sim-8^{\circ}\text{C}$ のアルコール中に試料を浸し、冷却された柄付針により植氷した。約5分後、試験管を -20°C アルコールに浸して10分間保ち($10^{\circ}\text{C}/\text{分}$)、ついで試験管を -100°C の液体窒素ガス中に静置した。この際、熱電対温度計で温度を監視し、試験管の底から液体窒素の液面までの距離を調節することにより -100°C に保った。 -20°C から -75°C までの冷却速度は $17^{\circ}\text{C}/\text{分}$ であった。試料

は、 -100°C ガス中に10分間保ったのち、液体窒素中に投入して1~10日間保存した。融解は、試料を室温空气中に放置するか、あるいは 30°C 水中に浸して軽く振とうすることによりおこなった。このとき、 -75°C から -10°C までの融解速度はそれぞれ25および $360^{\circ}\text{C}/\text{分}$ であった。融解された胚は、凍結液と共に時計皿に移し、実体顕微鏡下で形態的に生存していると思われる胚の数をしらべたのち、室温の 0.125M -sucroseを含むPBS中に浮遊させた。3分後、胚を 0.063M -sucroseを含むPBS中に移し、さらに3分間保ったのち、sucroseを含まないPBSで2回洗浄した。

DMSO除去方法が急速凍結-融解された胚の生存性に及ぼす影響に関する実験では、耐凍剤として 2.0M -DMSOを含むPBS中に胚を浮遊させ、上記の方法により -196°C まで凍結後、試験管を 30°C 水中に浸して融解させた。DMSOの除去は、下記A)~F)のうち一つの方法によりおこなった。A). 0°C で0.2, 0.2 および

0.4 ml の PBS を 1 分間隔で試験管に添加する。
B). 30°C で 0.2, 0.2 および 0.4 ml の PBS を 1 分間隔で添加する。C). 室温で、2.0M-DMSO + 0.5M-sucrose を含む PBS、ついで 0.5M-sucrose を含む PBS 中に胚を 2 分間おつ浮遊させる。D). 室温で、2.0M-DMSO + 0.25M-NaCl を添加した PBS、ついで 0.25M-NaCl を添加した PBS 中に胚を 2 分間おつ浮遊させる。E). 室温で、0.5M-sucrose を含む PBS 中に胚を直接浮遊させる。F). 室温の PBS 中に胚を直接浮遊させる。上記の DMSO 希釈あるいは除去処理をして 2 分後、すべての胚は、室温 PBS 中に移して 2 回洗浄した。

回収された胚は修正 KRB 液で培養したが、DMSO 除去過程での傷害をしらべるために、培養 1~2 時間後に実体顕微鏡下で形態的に正常と思われる胚の数をしらべ、除去前と比較した。約 48 時間培養後に Full expanded blastocyst まで発育したものを、正常な生存卵子と判定した。

急速凍結—急速融解された胚の生存性をさらに確かめるために、一部の胚は DMSO を C) 法で除去し、ただちに、あるいは 20~24 時間培養後正常な Blastocyst まで発育したものを、偽妊娠 3~4 日目の ICR 系雌マウスの子宮に移植し (6~7 個 / 子宮角)、そのまま出産させた。偽妊娠は、精管結紮して不妊であることが確かめられた雄と交配させることにより誘起した。

II 実験結果

予備実験として、2.0M-DMSO を含む PBS 中にマウス胚を浮遊させた試料を、 -7°C で植氷後 -100°C 液体窒素ガス中に 10 分間保ったのち液体窒素中へ投入する二段凍結法を試みた。しかし、凍結された 23 個の胚を急速融解した結果、4 個 (17%) が形態的に正常であり、培養後わずか 2 個 (8%) が Expanded blastocyst まで発育したにとどまった。

第 1 の実験では、試料を -20 , -100 および

-196°Cに10分間隔で移すことにより凍結し、DMSO濃度および融解速度が胚の生存性に及ぼす影響について検討した。結果は Table 13 に示した。計496個の胚を凍結-融解後、466個(94%)が回収された。凍結-融解直後およびDMSO除去後の形態的に正常な卵子の割合は、すべてのDMSO濃度において、急速融解された

Table 13. Effects of DMSO concentration and thawing rate on survival of mouse morula embryos frozen rapidly.

Thawing rate (°C/min)	DMSO conc. (M)	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	No. of embryos morphologically normal		No. of embryos developed to full expanded blastocysts after 48 h in culture (%) ⁺
				Just after thawing (%) ⁺	After removal of DMSO* (%) ⁺	
25	1.0	62	61	0 (0)	-	-
	1.5	62	61	22 (36)	9 (15)	2 (3)
	2.0	62	56	43 (77)	25 (45)	9 (16)
	2.5	62	59	41 (69)	21 (36)	7 (12)
360	1.0	62	59	32 (54)	21 (36)	10 (17)
	1.5	62	58	51 (88)	35 (60)	21 (36)
	2.0	62	55	48 (87)	38 (69)	29 (53)
	2.5	62	57	52 (91)	28 (49)	18 (32)

* Embryos were examined 1-2 h after cultivation.

+ Percentage of the number of recovered embryos.

胚の方が緩慢融解されたものよりも高かった。さらに、48時間培養後 Full expanded blastocystまで発育した卵子の割合についても、急速融解区が緩慢融解区に比べて高かった (χ^2 検定)。最も高い生存率(53%)は、胚が2.0M-DMSOと共に凍結され急速融解された場合に得られたが、この値と急速融解された1.5M-DMSO区(36%)との間に統計的有意差はなかった (χ^2 検定)。

第2の実験では、2.0M-DMSOを用いて胚を急速凍結後急速融解させ、6種類の異なる方法でDMSOを除去してその後の生存性を比較した。結果は Table 14 に示した。計357個の胚が回収され、そのうち322個(90%)が融解直後形態的に正常であった。DMSO除去後の形態的に正常な胚の割合は、DMSO除去方法により異なり、0.2, 0.4 および 0.4ml PBS を添加することによる段階的希釈を30°Cでおこなった場合(B法:85%)の方が0°Cでおこなった場合(A法:63%)よりも有意に高かった。また

Table 14. Effects of different procedures of removing DMSO on survival of mouse morula embryos frozen and thawed rapidly in the presence of 2.0 M-DMSO.

Procedures of removing DMSO*	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	No. of embryos morphologically normal		No. of embryos developed to full expanded blastocysts after 48 h in culture (%) ⁺
			Just after thawing (%) ⁺	After removal of DMSO** (%) ⁺	
A	62	59	55†(93)	37 (63)	22 (37)
B	62	60	58†(97)	51 (85)	42 (70)
C	62	61	57 (93)	54 (89)	50 (82)
D	62	58	50 (86)	38 (66)	23 (40)
E	62	55	47 (85)	43 (78)	30 (55)
F	68	64	55 (86)	33 (52)	20 (31)

* See text for the detailed procedures.

** Embryos were examined 1-2 hr after starting of cultivation.

+ Percentage of recovered embryos.

† Morphological normalities were examined after dilution of DMSO and just before washing of the embryos.

胚を 2.0M-DMSO + 0.5M-sucrose 添加 PBS へおよび 0.5M-sucrose 添加 PBS へ順次移して除去した場合 (C法: 89%) の方が、同様の方法で 0.5M-sucrose のかわりに 0.25M-NaCl を用いた場合 (D法: 66%) よりも高く、さらに 0.5M-sucrose を含む PBS 中へ移して除去した場合 (E法: 78%) の方が sucrose を含まない PBS 中へ直接

移した場合 (F法: 52%) よりも高かった (χ^2 検定)。48時間培養後 Full expanded blastocyst まで発育した卵子の割合についても、全く同様の傾向がみられた。C法によって除去した場合に最も高い生存率 (82%) が得られたが、B法 (70%) との間には有意差はみられなかった (χ^2 検定)。

移植実験では、ICR 胚に加えて F₁ 雑種胚 (ICR ♀ × C₃H/He ♂) を急速凍結後急速融解させ、C法により DMSO を除去した。Table 15 に示したように、Recipient 1 および 2 には、20~24時間培養して Blastocyst まで発育した 6個

Table 15. In vivo development of mouse morula embryos frozen-thawed rapidly.

Recipient	Treatment	No. of embryos transferred	No. of live young (%)
1	Cultured for 20-24 h	13	2 (15)
2	Cultured for 20-24 h	13	9 (69)
3	Without culture	14	4 (29)
Total		40	15 (38)



a



b

Fig. 7.

- a. Litter of two F_1 hybrid and six ICR mice born from an ICR foster mother who received six F_1 hybrid and seven ICR blastocysts that had developed in vitro from morula embryos thawed after storage at -196°C .
- b. Litter of one F_1 hybrid and one ICR mice born from an ICR foster mother who received six F_1 hybrid and seven ICR blastocysts that had developed in vitro from morula embryos thawed after storage at -196°C

のF₁ 雑種胚および7個のICR胚をそれぞれ左右の子宮角に移植した結果、妊娠20~21日目に2匹(1F₁ + 1ICR) および9匹(3F₁ + 6ICR)の正常な産子を分娩した(Fig. 7)。Recipient 3には、融解直後形態的に正常と思われるICR胚を左右の子宮角にそれぞれ7個ずつ移植した結果、妊娠21日目に4匹の正常産子を出産した。わづか3例ではあるが、妊娠率100%、産子率38%であった。15匹の産子のうち、雄は3匹、雌は12匹であった。

III 考察

本実験の結果より、マウス桑実胚は、-20, -100 および -196°Cに10分間隔で静置させることによって急速凍結された後に生存しうることが明らかとなった。しかし、その生存性は、DMSO濃度、融解速度およびDMSO除去方法により影響を受けた。

融解-培養後、Full expanded blastocystまで発育した胚の割合は、急速融解(360°C/分)

された胚の方が、緩慢融解(25°C/分)された胚よりも有意に高かった。ごく最近、Whittingham⁶⁸⁾ら(1979)は、マウス胚(8細胞期およびblastocyst)を緩慢凍結後、比較的高い温度域(-10~-50°C)から-196°Cに急冷し、急速融解させることにより生存胚を得ることを報告したが、本実験の結果は、本質的に彼らの報告と一致するものと思われる。

急速凍結されたマウス卵子は、-45°C付近で細胞内凍結がおこり死滅することが観察されており、⁹⁸⁾一般に哺乳動物卵子の凍結においては、細胞内凍結による傷害を避けるために緩慢な凍結速度が必須条件と考えられていた。しかし、Whittingham⁶⁸⁾ら(1979)は、たとえある程度の氷晶が細胞内に形成されても、急速融解をおこなうことにより卵子が生存しうることを示唆した。従って、本実験において、-196°Cまで急速凍結されたマウス胚も、細胞内に氷晶を含むものと思われる。急速凍結され、細胞内に氷晶を含む胚が、急速融解によ

って高い生存率を得る理由については、現在のところ不明であるが、Polge & Willadsen (1978)⁶⁷⁾は、緩慢融解された場合、細胞内氷晶が成長して傷害を与えるのではないかと示唆している。Mazur (1970)⁹⁶⁾の二要因仮説は、急速に凍結された細胞は細胞内凍結により傷害を受け、緩慢に凍結された細胞は、solution effects によって傷害を受けるというものであるが、前者による傷害を避けうるならば、後者による傷害を避けるためのみならず、従来の時間と手間を要する凍結法を簡略化するためにも、急速な凍結法が好ましいと思われる。しかしながら、予備実験において、植氷後 -20°C に静置させずに -100°C まで急冷させた胚の生存率は極めて低いものであったことから、急速凍結をおこなう前に、ある程度脱水されている必要があると思われる。

従来の緩慢凍結法では、DMSOの最適濃度は $1.0 \sim 1.5 \text{ M}$ であることが報告³⁰⁾されている。しかし、本実験においては、 2.0 M -DMSO を用い

た場合に最も高い生存率(53%)を得た。このことから、急速凍結法では、高濃度のDMSOを必要とすることが推測される。

一般に、凍結された細胞は、融解後生理的等張液中に戻されることによって傷害を受けることが知られている。哺乳動物胚においても、DMSO除去過程に浸透圧的傷害を受けることが示唆¹⁰⁶⁾されているものの、DMSO除去方法が凍結-融解された胚の生存性に及ぼす影響についてしらべた報告は少ない。Bank & Maurer⁸⁹⁾(1974)は、凍結-融解された家兎胚を高張なPBSで希釈することにより高い生存率を得ている。第1の実験では、融解された胚を、0.125M-ついで0.063M-sucroseを添加した高張PBS中に移すことによりDMSOを除去した。しかし本法においては、融解直後形態的に正常であった胚の多く(21~59%)がDMSO除去過程に傷害を受けたことから、さらに高張なPBSを用いる必要があるのではないかと考え、第2の実験をおこなった。

6種類の異なるDMSO除去方法を比較した結果(Table 14)、Whittinghamら(1972)³⁰⁾の報告以来最も多く用いられている段階的希釈法は、0°Cで用いられた場合(A法:生存率37%)に比べて、30°Cで用いられた場合(B法:生存率70%)の方が明らかにすぐれていた。マウス胚盤胞においても、高温におけるDMSO希釈が有効であることが報告されている⁴⁴⁾。これは、高温下では、細胞内のDMSOが細胞膜を通過して急速に細胞外に拡散するのに対し、0°Cでは、DMSOの通過が極めて遅いため、流入した水分がもたらす膨圧によって細胞膜が傷害を受けるためであるかと推測されている。最近、緩慢法で凍結-融解されたマウス8細胞期胚のDMSOを20°Cで急激に希釈しても、段階的に除去した場合に比べて生存率に有意差がないという報告⁶⁸⁾がみられる。しかしながら、本実験で、融解された胚を直接PBSに浮遊させてDMSOを除去した場合、生存率は大きく減少した(F法:31%)。この際PBS中で卵細胞が膨張

あることが観察されており、やはり急激な水分の流入によるものと思われる。これに対して、融解された胚を、 $2.0M$ -DMSO + $0.5M$ -sucrose を含む PBS および $0.5M$ -sucrose のみを含む PBS 中に順次移して DMSO を除去した場合に最も高い生存率が得られた (C法: 82%)。この場合は、処理過程中、胚は収縮したままであり、洗浄のために新鮮な PBS 中に移してはじめてもとの体積を回復した。従って、DMSO 除去過程において、細胞が浸透圧的に膨張するのを防ぐことが、高い生存率を得るために最も重要な要因であろうと思われる。しかし、 $0.5M$ -sucrose のかわりに $0.25M$ -NaCl を用いた場合、胚は収縮したままであったにもかかわらず生存率は低かった (D法: 40%)。これは、イオン強度が強すぎたためであろうと思われる。

IV 摘要

マウス桑実胚を植氷後、 -20 、 -100 および

-196°Cに10分間隔で静置させることにより急速凍結した。DMSO濃度、融解速度およびDMSO除去方法がこれらの胚の生存性に及ぼす影響を検討した。得られた結果の概要は、以下の通りである。

1. 急速融解(360°C/分)された胚の生存率の方が、緩慢融解(25°C/分)されたものよりも有意に高かった。
2. この場合の最適DMSO濃度は、2.0Mであった。
3. 胚を、2.0M-DMSO + 0.5M-sucroseを含むPBSおよび0.5M-sucroseを含むPBS中に順次移してDMSOを除去した場合に、最も高い生存率(82%)が得られた。
4. 上記の条件により、凍結、融解およびDMSO除去された胚をRecipientに移植後、15匹(38%)の産子が得られた。
5. 以上のことから、急速法により凍結されたマウス桑実胚は、高率に生存しうることが明らかとなった。

第8節 小括

マウス受精卵の優れた凍結保存法を開発し、同時に、卵子の耐凍メカニズムに関する知見をも得る目的で、種々の要因が、冷却および凍結された桑実胚の生存性に及ぼす影響について検討した。得られた結果の概要は、以下の通りである。

1. 0°C と室温の間の冷却および加温速度は生存性に影響しなかった。
2. 胚を 20 および 0°C に保存した結果、生存性は、前者の方がやや優れていた。
3. 20 および 0°C で、 1.5M の EG あるいは Glycerol を添加した PBS 中に保存された胚は無添加の PBS を用いた場合に近い生存性を示したのに対し、DMSO 添加区の生存率はやや急激に低下し、DMFA 添加区では、極めて急激に低下した。このことから、EG および Glycerol のマウス胚に対する毒性は極めて低く、DMSO はいく分毒性をもち、DMFA は強

力な毒性をもつと考えられる。

4. 種々の温度で植氷後、胚を -20°C まで凍結した結果、植氷温度の低下と共に胚の生存率が低下した。このことから、 -4°C 程度の高い温度域で植氷することが必要と思われる。
5. 毎分 0.25 および 1.0°C の速度で凍結された胚を緩慢融解した結果、生存率は -75°C まで低下しなかったが、毎分 5 および 10°C の速度で凍結された場合は、温度の低下に従って生存率が低下した。
6. 種々の温度まで緩慢冷却 ($1^{\circ}\text{C}/\text{分}$) された胚を -75°C まで急冷したのち緩慢融解した結果、 -50°C 以下の温度から急冷した場合に高い生存率が得られた。このことから、 -50°C まで緩慢冷却することによって脱水がほぼ完了しているものと思われる。
7. 毎分 5°C の速度で -50°C まで冷却された胚をたんに -75°C へ急冷したのち緩慢融解した場合の生存率はわずかに 4% であっ

たが、同温度に30分間以上保持したのち急冷した場合の生存率は59~73%まで高まった。これは、 -50°C に保持されている間に十分脱水されたためと思われる。

8. -25 および -50°C における胚の保存可能期間は、それぞれ数時間および数日間であったのに対し、 -75°C では90日間保存しても生存性は低下せず、温度の低下と共に保存期間が延長し、 -75°C 保存でほぼ安定した保存性が認められた。また、 -75°C に90日間保存された胚を Recipient に移植後、正常産子が得られた。
9. 凍結液中に種々の濃度の BSA あるいは卵黄を添加して胚を -196°C まで凍結した結果、これらの添加は生存性に影響しなかった。
10. 緩慢凍結 ($0.33^{\circ}\text{C}/\text{分}$) された胚を -196°C から -10°C まで急速融解させた場合は、緩慢融解区と同様の高い生存率が得られたが、 0°C 以上まで急速融解させることにより、生存率が低下した。

11. 植米後、 -20°C アルコール、 -100°C 液体窒素ガス および -196°C 液体窒素中に、10分間隔で静置させることにより急速凍結された胚は、急速融解 ($360^{\circ}\text{C}/\text{分}$)、やや高濃度の DMSO (2.0M) および適切な DMSO 除去方法を用いることにより高率に生存しうることが明らかとなった。最も高い生存率が得られたのは、胚を、2.0M-DMSO + 0.5M-sucrose を含む PBS および 0.5M-sucrose を含む PBS 中に順次移して DMSO を除去した場合で、胚を Recipient に移植後 15匹 (38%) の産子が得られた。

第4章 マウスおよびラット未受精卵 の凍結保存

第1節 緒言

1950~1960年代においては、未受精卵^{10), 36)}や卵
 胞卵^{24), 35)}の凍結保存の試みがなされていたが、
 1972年のWhittingham³⁰⁾らの報告以来、哺乳動
 物卵子の凍結保存に関する研究は、主として
 実用的価値の高い受精卵を用いておこなわれ
 てきた。しかし、近年、体外受精技術の発達
 に伴い、マウス、ラット、ハムスターおよび
 スナネズミなどにおいて、体外受精実験のた
 めの未受精卵を随時準備しうることを目的と
 して、卵管から回収された未受精卵の凍結保
 存に関する研究^{55)~57), 107)}がなされてきている。

卵子を未受精卵の段階で保存することによ
 り、融解後の受精によって多くの遺伝的組み
 合わせが可能となり、体外受精などの実験材
 料を確保することができるとなどの利点が考え

られる。さらに、各種哺乳動物卵子の耐凍機序を明らかにし、凍結方法を確立していく上で、未受精卵と受精卵の耐凍性を比較することも実用的並びに生理学的に意義深い。本実験では、まず最初に、1細胞期の卵子は容積を定量的に求めやすいことから、マウス未受精卵を種々の耐凍剤中に浮遊させて耐凍剤の侵入速度を推定し、ついで、卵子の発育段階と耐凍性との関係を明らかにする目的で、ラット未受精卵、マウス卵胞卵および種々の成熟段階にあるラット卵胞卵の凍結実験をおこなった。

第2節 マウス未受精卵への各種耐凍剤の透過性

卵子の凍結の際には 1.0~2.0M の濃度の耐凍剤を用いるが、適切な添加および除去をおこなうために、耐凍剤の卵子への侵入速度を測定することは有意義と思われる。1細胞期の卵子は球形であるため浸透圧の変化に対する容積変化を定量的に測定するのに適している。本実験では、30あるいは0°Cで、種々の耐凍剤を含む保存液に浮遊させたマウス未受精卵の容積変化を経時的に測定することにより、耐凍剤の侵入速度を比較した。

I 実験材料および方法

6週令をこえた ICR系成熟雌マウスに 7.5 i. u. の PMSG および HCG を注射して過排卵を誘起させ、HCG 注射後 14~16時間目に屠殺した。卵管膨大部の卵子塊を流動パラフィン下で、0.1% ヒアルロニダーゼ添加 PBS (BSA を含mayan

い) 中に導入し、卵丘細胞を除去したのち、PBSで洗淨した。形態的に正常と思われる卵子(Fig. 11-a)を5~10個ずつ、30あるいは0°Cの1.5M-DMSO, EG, GlycerolあるいはDMFAを添加したPBS中に浮遊させ、経時的に実体顕微鏡下で写真撮影をおこなった。30°Cにおける実験は30°Cに加温した室内でおこない、0°Cにおける実験は、保存液を入れた時計皿を氷水上にのせることにより冷却したが(Fig. 8)、一部の卵子は長時間保存するため、ガラス試験管に移して氷水中に浸し、観察時に氷水上の時計皿に移した。写真により卵子の透明帯と卵細胞質の直径を測定して等張なPBS中の卵子の直径に対する比を求めることにより容積変化を計算した。

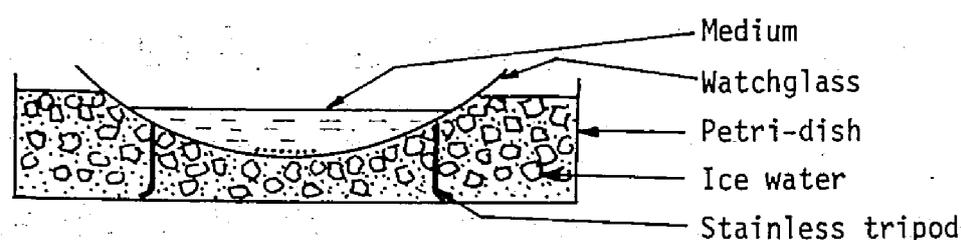


Fig. 8. Diagram of apparatus used to examine the morphology of ova at 0°C.

さらに、耐凍剤の除去過程におけるストレスをしらべるために、卵子を 30°C の耐凍剤を含むPBS中に60分間浮遊させたのち、直接、 0 あるいは 30°C のPBS中に移し、卵細胞質の破壊の有無を観察した。

II 実験結果

30°C で、種々の耐凍剤を含むPBS中に浮遊させた卵子の相対的な容積変化をFig. 9に示した。Glycerolを含むPBS中では、卵子はただちにもとの容積の41%まで収縮したのち徐々に容積を回復し、60分後には64%、120分後には82%まで回復した。DMSOあるいはEGを含むPBS中では、卵子はただちに収縮したが、5分後にはすでにもとの容積を回復した(Fig. 11-d, e)。これらに対して、DMFAを含むPBS中では卵子は全く収縮せず、むしろ膨張することが観察された(Fig. 11-i)。

同様の観察を 0°C でおこなった結果をFig. 10に示した。Glycerolを含むPBS中では、卵

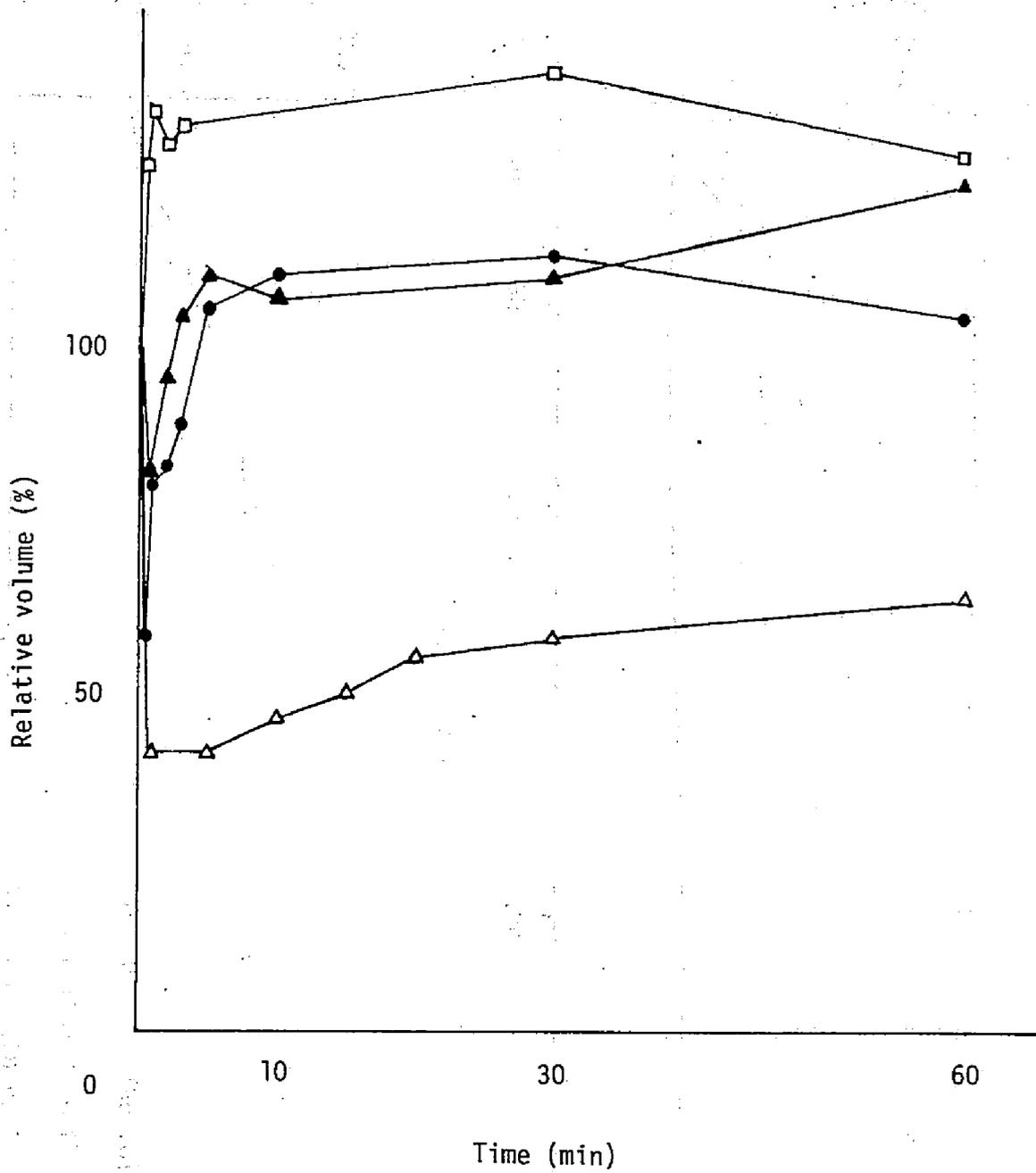


Fig. 9. The volume of unfertilized mouse ova, relative to their volumes in isotonic PBS as a function of time in PBS containing 1.5 M-DMSO(▲), EG(●), Glycerol(△) and DMFA(□) at 30°C.

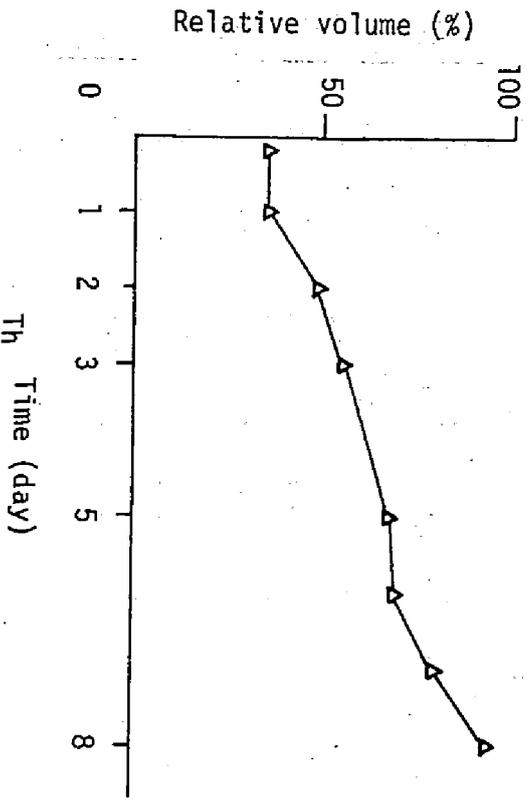
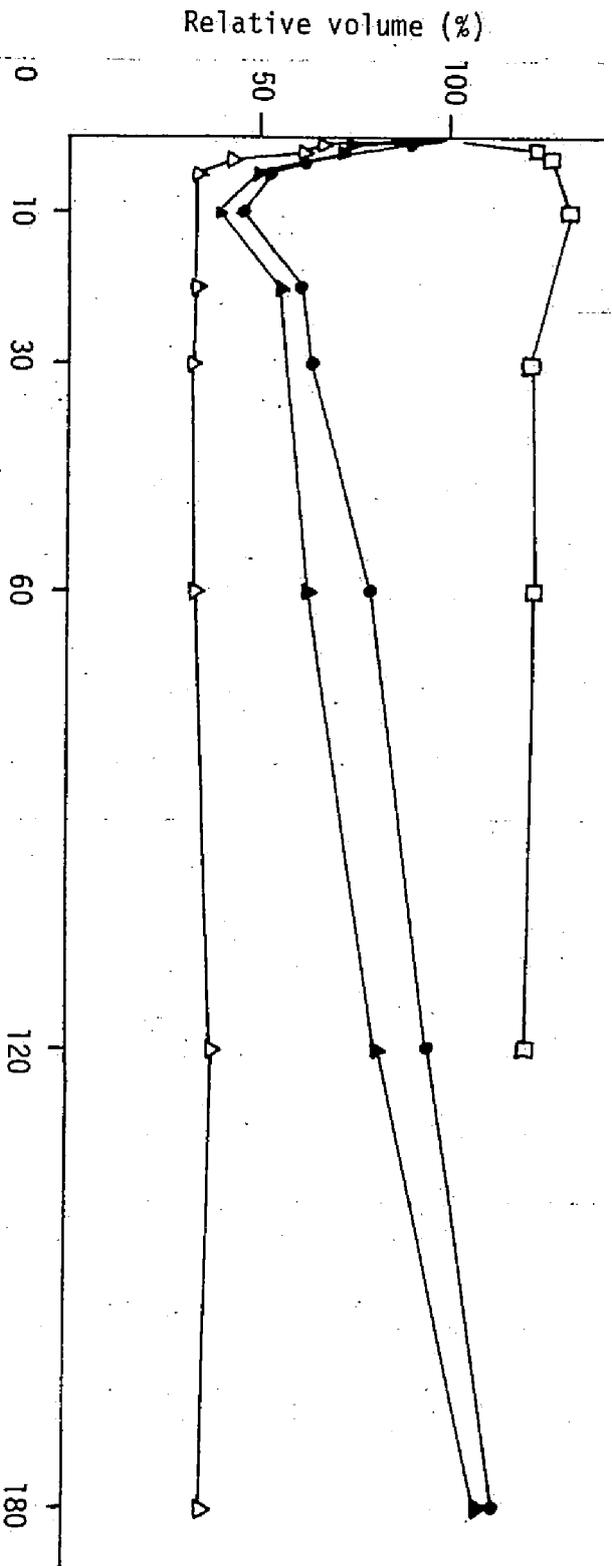


Fig. 10. The volume of unfertilized mouse ova, relative to their volumes in isotonic PBS as a function of time in PBS containing 1.5 M-DMSO(▲), Eg(●), glycerol(□) and DMFA(△) at 0°C.

子は5分後にもとの容積の33%まで収縮し、24時間後まで同じ状態を保った(Fig. 11-f, g)。しかし2日目以降徐々に容積の回復がみられ(Fig. 11-h)、8日後には93%まで回復した。DMSOあるいはEGを含むPBS中では、卵子は、10分後にそれぞれ40および45%まで収縮したが、120~180分後にもとの容積を回復した(Fig. 11-b, c)。一方、DMFAを含むPBS中に浮遊された卵子は、30°Cの場合と同様にやや膨張することが観察された。

最後に、卵子を30°Cで耐凍剤を含むPBS中に60分間浮遊させたのち、耐凍剤を含まないPBS中に移し、生存性をしらべた。結果はTable 16に示すように、0°Cで耐凍剤を除去した場合には、DMSO, EGあるいはGlycerolを含むPBS中に浮遊されていた卵子はすべて死滅し、DMFA中の卵子のみが生存した(100%)。これに対して30°Cにおいて耐凍剤を除去した場合には、GlycerolおよびDMFA区は0°Cの場合と同様であったが、DMSOおよびEG区で

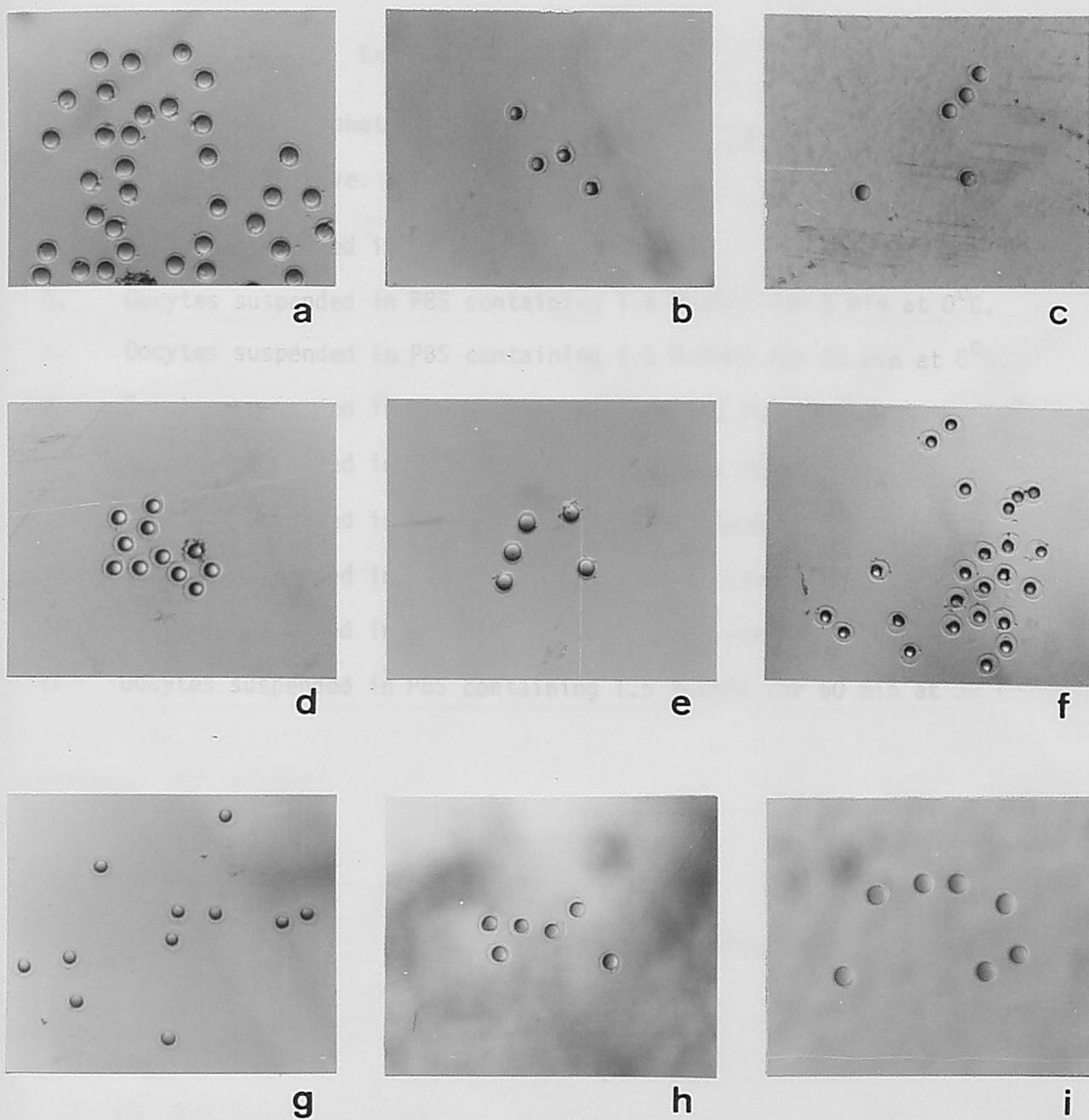


Fig. 11. Appearance of unfertilized mouse oocytes suspended in medium containing cryoprotective agents.

Explanation of Fig. 11.

All the oocytes were photographed under a dissecting microscope with a x20 ocular and x4 objective. All magnification X 31.

- a. Oocytes suspended in PBS before treatment.
- b. Oocytes suspended in PBS containing 1.5 M-DMSO for 5 min at 0°C.
- c. Oocytes suspended in PBS containing 1.5 M-DMSO for 30 min at 0°C.
- d. Oocytes suspended in PBS containing 1.5 M-EG for 30 seconds at 30°C.
- e. Oocytes suspended in PBS containing 1.5 M-EG for 5 min at 30°C.
- f. Oocytes suspended in PBS containing 1.5 M-Glycerol for 60 min at 0°C.
- g. Oocytes suspended in PBS containing 1.5 M-Glycerol for 25 hr at 0°C.
- h. Oocytes suspended in PBS containing 1.5 M-Glycerol for 6 days at 0°C.
- i. Oocytes suspended in PBS containing 1.5 M-DMFA for 60 min at 30°C.

Table 16. Survival of mouse unfertilized ova transferred to PBS at 30°C and 0°C after storage in PBS containing various cryoprotective agents for 60 min at 30°C.

Temperature	Cryoprotective agent (1.5 M)	No. of embryos	
		Treated	Morphologically normal (%)
0°C	DMSO	14	0 (0)
	EG	14	0 (0)
	Glycerol	14	0 (0)
	DMFA	14	14 (100)
30°C	DMSO	15	9 (60)
	EG	15	12 (80)
	Glycerol	14	0 (0)
	DMFA	14	14 (100)

はそれぞれ 80 および 60% の生存率が得られた。

III 考察

本実験において、1.5Mの DMSO, EG あるいは Glycerol を含む PBS 中に卵子を浮遊させた結果、間もなく卵子は収縮し、その後、時間の経過とともに容積を回復することが観察された。これは、高張な耐凍剤により脱水された卵細胞質内に耐凍剤が侵入したことを示し

ている。しかし、卵子の収縮および回復に要する時間は、耐凍剤の種類および温度により著しい差がみられた。すなわち、Glycerolでは、DMSOおよびEGに比べて収縮から回復までの時間が極めて長く、 0°C では8日間を要した。また、Glycerolを含む 30°C の液に60分間浮遊させた卵子を 30°C あるいは 0°C のPBSに戻した場合、すべての卵子が死滅したが、これは、過度の水分が細胞質内に流入したためと思われる。これらのことから、Glycerolは細胞内外への透過性が極めて低い物質であるといえる。DMSOおよびEGを含む液に浮遊させた卵子は、 30°C では5分以内にもとの容積を回復したが、 0°C では2時間以上を要した。Leibo⁹⁸⁾(1977)は、マウス未受精卵を1.0M-Glycerolに浮遊させた結果間もなく収縮し、 22°C では数時間後に容積を回復したが、 0°C では回復が遅いことを観察している。彼はまた、未受精卵を0.5M-NaClに浮遊させた場合、温度の低下と共に収縮速度が低下することを認

めたが、本実験の結果はこれと一致する。すなわち、温度の低下と共に耐凍剤および水分の透過性が減少するものと思われる。

Leibo⁴⁵⁾ら(1974)は、マウス8細胞期胚を 0°C の1.0M-DMSOを添加したPBS中に浮遊させて形態の変化を観察した結果、6分後まで収縮しつづけ、15分後まで収縮したままであり、35分後にやや容積を回復したものの、90分後でもなおもとの容積を回復しないことを認めた。これは、本実験の結果と一致することから、耐凍剤の卵子に対する透過性については卵子の発育段階による差がないのではないかと推測される。また異なった動物種間における卵子の透過性の差異についても、同様の傾向が予想される。

一方、DMFAは他の3種の耐凍剤と全く異なり、たとえ 0°C においても卵子を収縮させることはなく、むしろ膨張させた。これはDMFAが卵細胞膜の透過性を大きく変化した可能性も考えられるが、理由は不明である。

1.5M-DMSO, EG あるいは DMFA を含む 30°C の PBS 中に 60 分間保たれた卵子は、すでに体積を回復していることから、耐凍剤が完全に細胞質内に侵入したと考えられ、一方 Glycerol を含む液中の卵子は容積が 64% まで回復しており、Glycerol がいくらか侵入したものと思われる。これらの卵子を耐凍剤を含まない PBS 中に戻して耐凍剤の除去過程のストレスをしらべた実験結果 (Table 16) は、容積変化をしらべた実験結果と一致するものであった。すなわち、Glycerol は除去過程のストレスが最も大きく、DMFA では全くストレスがなかった。また、DMSO および EG では、高温 (30°C) で耐凍剤を除去することが必要と思われる。

IV 摘要

マウス未受精卵を種々の耐凍剤を含む PBS 中に浮遊させ、容積変化を経時的に測定することにより耐凍剤の侵入速度を比較した。得られた主な結果は以下の通りである。

1. DMSO, EG および Glycerol を含む PBS 中に浮遊された卵子は、間もなく収縮し、その後時間の経過とともに容積を回復した。しかし、収縮および回復に要した時間は 30°C に比べて 0°C の場合に長く、また Glycerol では、他の2種の耐凍剤より長時間を要した。
2. DMFA を含む PBS 中では卵子は全く収縮せず、むしろ膨張した。
3. 耐凍剤を細胞質中に含んだ卵子を PBS へ戻した結果、DMFA では全く傷害を受けず、Glycerol ではすべてが死滅し、また、DMSO および EG では 30°C で戻した場合にのみ生存卵子が得られた。
4. 結論として、Glycerol は卵細胞質の透過性が極めて低く、DMFA は極めて高く、DMSO および EG はその中間の透過性をもつ物質であるといえる。

第3節 ラット未受精卵の凍結保存

現在までラット未受精卵の凍結保存の試みは、わが国一例¹⁰⁷⁾(-79°C 保存)の報告をみるにすぎない。本節では、マウス桑実胚の凍結で用いた緩慢凍結法によりラット未受精卵を -196°C まで冷却し、6~180日間保存後融解し体外受精をおこなって生存性を検討した。

I 実験材料および方法

21~23日令のWistar系幼若雌ラットに、10 i.u.のPMSGを皮下注射し、約41時間後に、10 i.u.のHCGを腹腔内注射して過排卵を誘起させた。HCG注射後14時間目に屠殺し、卵管膨大部の卵子塊を流動パラフィン下で0.1%ヒアルロニダーゼ添加修正KRB液(BSAを含まない)中に導入し、卵丘細胞を除去したのちPBSで洗浄した。卵子は20~25個ずつ、0.1mlのPBSの入ったガラス試験管(10×100mm)に移して 0°C 氷水中に浸漬した。5分後、あらか

じめ 0°C に冷却された 3.0M-DMSO 添加 PBS 0.1 ml を 0.03 , 0.03 , および 0.04 ml ずつ 5 分間隔で添加した (最終濃度 1.5M-DMSO)。さらに 5 分後、魔法ビンに入れた -4.5°C のアルコール中に試料を浸してから植米をおこない、5 分間静置した。アルコール中の試料を魔法ビンに入れたまま液体窒素ガス中につるすことにより毎分約 0.33°C の速度で -80°C まで冷却し、ついで液体窒素中に浸漬して保存した。 -196°C に 6~180 日間保存後、試料を室温空气中に放置して融解させ ($25^{\circ}\text{C}/\text{分}$)、 1.4 ml の PBS を 5 回に分けて添加することにより DMSO を希釈し、胚を PBS 中に移した。

奥体顕微鏡下で形態的に生存していると思われる卵子を修正 KRB 液で洗浄後、流動パラフィン下であらかじめ 5 時間前培養された 0.4 ml の精巢上体精子浮遊液 ($0.4 \sim 0.9 \times 10^6$ 精子/ ml) 中に移して培養することにより体外受精をおこなった。5 または 26 時間培養後、卵子をスライドガラスにマウントし、 2.5% グルタ

ールアルデハイドを流したのち中性ホルマリ
ン液に浸漬して固定し、0.25% ラウモイドで
染色して位相差顕微鏡下で観察した。精子が
卵卵腔または細胞質内に存在する卵子を精子
侵入卵、卵細胞質中に精子尾部とともに膨化
精子頭部あるいは雄性前核を見出せるものを
受精途上卵、正常な卵割を示したものを受精
卵と判定した。

II 実験結果

Table 17 に示したように、240 個のラット
未受精卵を -196°C に凍結し 6~91 日間保存後
融解した結果、58 個 (24%) が形態的に正常で
あった。これらの卵子に体外授精をおこない
5 時間後に観察した結果、42 個 (72%) に精子
侵入が認められ、そのうち 28 個 (67%) が受精
途上卵であった (Fig. 12-a, b)。細胞質の異
常 (Fig. 12-c), 散乱した雌性前核 (Fig. 12-d)
および細胞質の異常な分裂などの異常侵入卵
の割合は 31% (13/42) であった。10.0 個の卵子

Table 17. Recovery and fertilization in vitro of frozen-thawed rat eggs.

Duration stored at -196°C (days)	No. of eggs frozen	No. of normal eggs after thawing (%)	Time of examination (hr after insemination)	No. of eggs			
				Penetrated (%)*	Undergoing fertilization (%)**	Fertilized (%)**	Penetrated with abnormality (%)**
6-91	240	58(24)	5	42(72)	28(67)	-	14(33)
180	100	14(14)	26	13(93)	1(8)	4(31)	8(62)

* Percentage of normal eggs after thawing.

** Percentage of total number of penetrated eggs.

Table 18. Polyspermic penetration in vitro of frozen-thawed rat eggs.

Duration stored at -196°C (days)	Total	With more than one sperm in perivitelline space (%)	With n sperm in viter- plus (polyspermic)			
			Total (%)	n=2	n=3	n=4
6-91	42	17(40)	26(62)	18	2	6
180	13	4(31)	11(85)	4	3	4

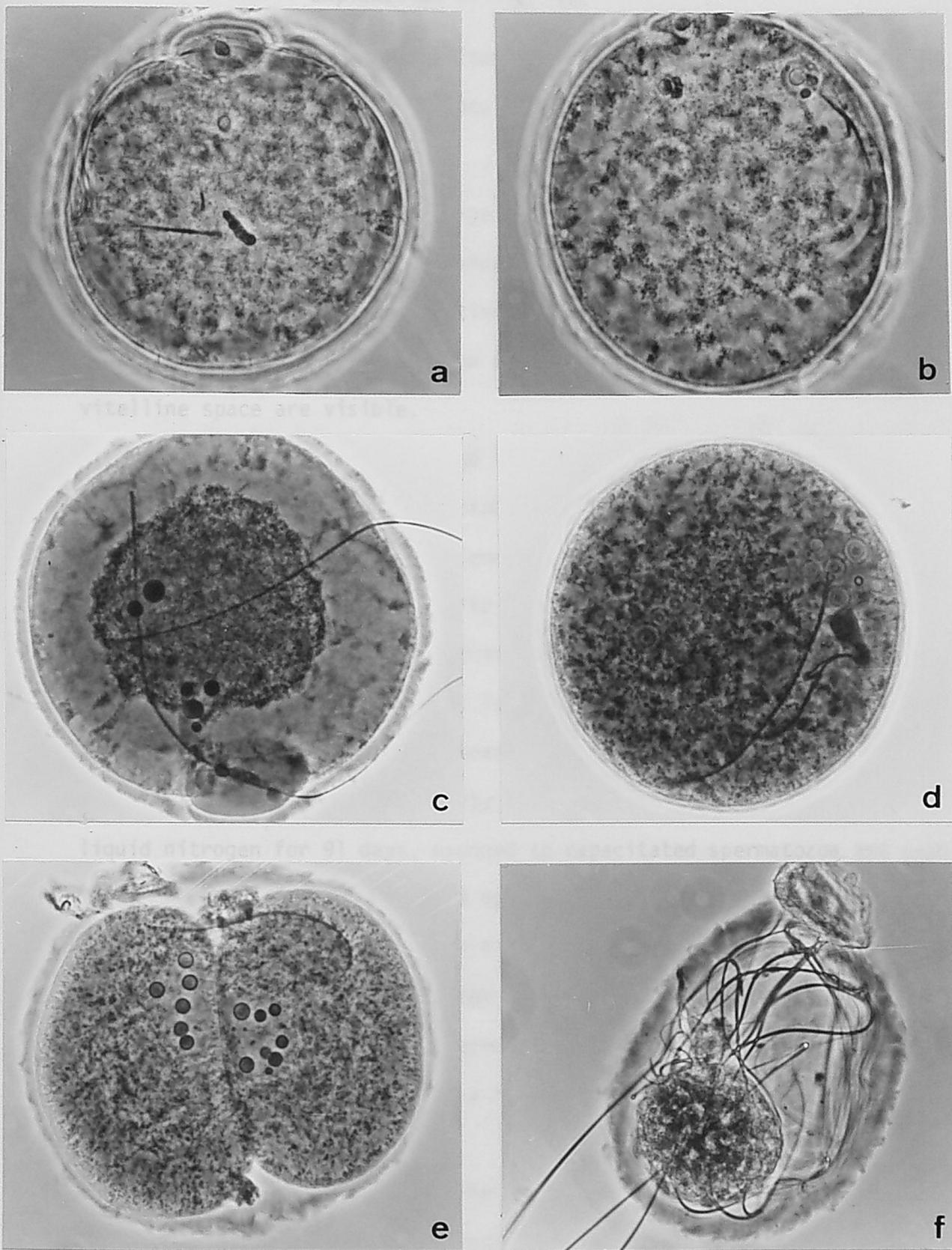


Fig. 12. Phase-contrast photomicrographs of frozen-thawed rat tubal oocytes inseminated in vitro with epididymal spermatozoa.

Explanation of Fig. 12.

All the eggs were photographed after being stained with lacmoid under a phase-contrast microscope with a x10 ocular and x40 objective. All magnification x 609.

- a. A normal egg thawed after storage in liquid nitrogen for 6 days, exposed to capacitated epididymal spermatozoa and examined 5 hr later. It had an enlarged sperm head, fertilizing sperm tail, the 2nd polar body and female condensed chromatin. A few spermatozoa penetrated into the perivitelline space are visible.
- b. A normal egg thawed after storage in liquid nitrogen for 91 days, exposed to capacitated spermatozoa and examined 5 hr later. It had male pronucleus with a fertilizing sperm tail, female pronucleus and the 2nd polar body.
- c. An egg penetrated with abnormality when it was thawed after storage in liquid nitrogen for 27 days, exposed to capacitated spermatozoa and examined 5 hr later. It had male and female pronuclei, and the 2nd polar body, but it is exhibiting a rough-appearing vitellus.
- d. An egg penetrated with abnormality when it was thawed after storage in liquid nitrogen for 91 days, exposed to capacitated spermatozoa and examined 5 hr later. It had enlarged sperm head and vitelline appearance is normal, but female pronuclei are dispersing.
- e. A normal 2-celled egg thawed after storage in liquid nitrogen for 180 days, exposed to capacitated spermatozoa and examined 26 hr later. It had nucleus in each blastomere, a fertilized sperm tail and the 2nd polar body.
- f. An egg penetrated with abnormality when it was thawed after storage in liquid nitrogen for 180 days, exposed to capacitated spermatozoa and examined 26 hr later. It is exhibiting a shrunken vitellus and many spermatozoa are penetrating into the perivitelline space.

を -196°C に180日間保存後融解した結果、14個(14%)が形態的に正常であった。これらの卵子に体外授精し、26時間後に観察した結果、93%(13/14)に精子侵入が認められたが、2細胞期まで卵割した卵子(Fig. 12-e)はわずか31%(4/13)にとどまり、62%(8/13)は、離散した雄性および雌性前核、細胞質の異常な分裂あるいは細胞質の収縮(Fig. 12-f)などの異常侵入卵であった。

侵入卵のうち多精子侵入卵の内訳をTable 18に示したが、高率(62~85%)に多精子受精が観察された。

III 考察

本実験の結果より、 -196°C に6~180日間保存されたラット未受精卵は、融解後体外授精により受精しうることが明らかとなった。凍結-融解後形態的に正常な卵子の割合は14~24%であったが、この値は、幼若ラットの未受精卵を -79°C に保存した Parkening & Chang

¹⁰⁷⁾
 (1977)の実験結果(18%)とほぼ一致する。彼ら
 らは、成熟雌ラットから得られた未受精卵は
 幼若のものに比べて耐凍性が高いことを報告
 しているが、その理由については明らかにさ
 れていない。マウス未受精卵では、 -5°C から
 -45°C までを毎分 0.33°C の速度で冷却後 -75°C
 -75°C までを毎分 1°C の速度で冷却した場合融解
 後の生存率は44~72%であったのに対し、 -5°C
 -75°C までを毎分 0.33°C の速度で冷却し
 た場合の生存率は17~18%に低下することが
 報告されている。⁵⁶⁾しかしラット未受精卵では、
 -45°C まで毎分 0.33°C の速度で凍結後 -75°C
 -75°C までを毎分 1°C の速度に切りかえたParkening
 & Chang¹⁰⁷⁾(1977)の実験結果と、 -80°C まで
 を毎分 0.33°C の速度で冷却した本実験の結果
 がほぼ同じであったことから、 -45°C ~ -75°C
 間の微妙な冷却速度の差は、融解後の正常卵
 子の回収に、マウス卵子の場合ほど重要でな
 いと思われる。

回収された卵子に体外授精した結果、高率

(72~93%)の卵子に精子侵入が認められたものの、26時間後に正常な2細胞期まで卵割した卵子は31%と低率であった。Parkening & Chang (1977)¹⁰⁷⁾も、凍結されない対照区に比べて、凍結-融解された卵子の受精率は有意に低下することを報告している。さらに本実験では、異常侵入卵の率が高く、しかも授精後5時間目(31%)に比べて26時間目(62%)の方が高かった。これらのことから、凍結-融解後形態的に正常と思われる卵子も多くのものが何らかの質的傷害を受けており、初期発生に影響を及ぼしたものと考えられる。しかし、正常な2細胞期胚も得られており、これらの卵子を移植することにより、ラットにおいても凍結された未受精卵由来の産子を得ることも可能であろうと思われる。

IV 摘要

本節の実験では、幼若ラットの卵管より得られた未受精を -196°C に保存後、融解して体

外受精をおこなった。得られた結果は、以下のようによ約しうる。

1. 6～91日間保存した卵子を融解した結果、24%の卵子が形態的に正常であり、体外授精後5時間で72%の卵子に精子侵入が認められたが、このうち正常な受精途上卵は67%であった。
2. 180日間凍結保存した卵子を融解した結果、74%が形態的に正常であり、体外授精後26時間培養した結果、93%の卵子に精子侵入が認められたが、正常な分割卵はそのうち31%であった。

第4節 マウス卵胞卵の凍結保存

卵胞卵の凍結保存に関する研究は極めて少なく、マウスにおいても、わざわざ Parrott (1960)³⁵⁾ が -79°C に凍結保存した卵巢組織を自家移植したのち新生児を得たと報告しているにすぎない。本実験では、卵核胞期 (Germinal vesicle stage: GV期) にあるマウス卵胞卵を -196°C まで凍結し、その耐凍性をしらべた。

I 実験材料および方法

4~6週令のICR系雌マウスに5~7.5 i. u. のPMSGを腹腔内注射し、約48時間後に屠殺して卵巢を切りとり、濾紙上で付着した血液などを取り除いたのち、PBS(1~2ml)を入れた時計皿へ移した。実体顕微鏡下で、鋭い柄付針を用いて発育した卵胞から卵胞卵を採り出しPBSで2回洗浄後、形態的に正常で、かつGVの確認できるものを実験に供した。

実験1および2では、一部の卵子は対照区

としてただちに培養し、残りは10~30個ずつ0.2あるいは0.1mlのPBSの入ったガラス試験管に移したのち、それぞれ冷却あるいは凍結実験をおこなうために0°C氷水中に浸した。0°C冷却処理区では、試料を氷水中に30~60分間保ったのち室温にもどして卵子を回収し培養した。凍結保存区では、0°Cで、耐凍剤として1.0, 2.0, 3.0, 4.0MのDMSOを添加したPBS 0.1mlを0.5Mずつ濃度が増加するよう1~4回に分けてそれぞれ5分間隔で添加し、最終DMSO濃度として0.5, 1.0, 1.5 および2.0Mを得た。DMSO濃度に応じて-2~-8°Cのアルコール中に浸して植氷をおこなったのち、試料を魔法ビンに入れたアルコール中に浸したまま液体窒素ガス中につるすことにより、毎分約0.33°Cの速度で-80~-110°Cまで冷却後、液体窒素中に保存した。試料を室温空气中に放置することにより融解(25°C/分)したのち、1.4mlのPBSを3分間隔で5回に分けて添加してDMSOを希釈した。回収された卵子はPBSで2

回洗浄後培養した。

実験3では、0.1mlのPBSの入った試験管に卵子を移したのち、37あるいは0°Cで、耐凍剤として、3.0M-DMSOあるいは2.75M-DMSO + 0.25M-sucroseを含むPBS 0.1mlを3回に分けて添加した(最終濃度1.5M-DMSO および1.375M-DMSO + 0.125M-sucrose)。凍結-融解および耐凍剤の除去は上記の方法によりおこない、回収卵子を培養した。

培養液には、15%家兔不活化血清を添加した修正KRB液を用いた。実験1では、卵子を18時間培養後に固定染色して成熟段階をしらべた。実験2および3では、14時間培養して体外成熟させたのち形態的に生存していると思われる卵子を、あらかじめ1時間の前培養をおこなったマウス精巢上体精子浮遊液中に移してさらに5~8時間培養することにより体外受精後、固定染色した。精子が卵細胞質または細胞質中に存在する卵子を精子侵入卵、卵細胞質中に精子尾部とともに膨化精子頭部あ

るいは雄性前核を見出せるものを受精途上卵とした。

II 実験結果

実験1においては、GV期のマウス卵胞卵を0°Cに冷却、あるいは耐凍剤として1.5M-DMSOを用いて-196°Cまで凍結したのち18時間培養し、成熟段階を比較した。その結果、Table 19に示したように、処理後形態的に正常であった卵子の割合は、0°C冷却区では93%であったのに対し、凍結区では32%に低下した。

Table 19. In vitro maturation of mouse follicular oocytes after cooling to 0°C and -196°C.

Treatment	No. of oocytes treated	No. of oocytes recovered	No. of normal oocytes after culture (%)*	No. of oocytes examined	No. (%)** of oocytes at stage of		
					GV	M1	M2
Control	-	283	270 (95)	225	8 (4)	59 (26)	157 (70)
Cooled (0°C)	105	98	91 (93)	82	8 (10)	20 (24)	51 (62)
Frozen (-196°C)	207	186	60 (32)	60	5 (8)	20 (33)	20 (33)

* Percentage of recovered oocytes.

** Percentage of oocytes examined.

これらの卵子を体外培養により成熟させた結果、 0°C 区では、対照区に匹敵する第1成熟分裂中期(M1)および第2成熟分裂中期(M2)への移行率(それぞれ24および62%)を得たが、凍結区では、M2移行率は33%に低下した(Fig. 13-a)。

実験2では、0.5~2.0M-DMSOを用いて -196°C に凍結した卵胞卵を培養後体外受精させ、対照区および 0°C 冷却処理区と比較した。結果はTable 20および21に示した。凍結-融解後形態的に正常と思われる卵子の割合は、DMSO濃度が0.5~1.0Mの場合(9~14%)に比べて1.0~2.0Mの場合(22~25%)に高かった。これらの生存卵子を体外受精させた結果、精子侵入率はわずか6%(10/161)にとどまり、 0°C 区(34%)および対照区(46%)に比べてかなり低率であった。また、侵入卵のうち雄性前核をもつものの割合は、対照区が84%であったのに対し、 0°C 冷却区では52%、凍結区では40%(4/10)(Fig. 13.-b)であった。

Table 20. Fertilization in vitro of frozen mouse oocytes matured in culture.

Treatment	Conc. of DMSO (mol)	No. of oocytes treated	No. of oocytes recovered	No. of normal oocytes after culture (%)*	No. of oocytes examined	No. of oocytes unpenetrated (%)**				No. of oocytes penetrated (%)**
						GV	M1	M2	Act.	
Control	-	-	197	195 (99)	175	5 (3)	11 (6)	68 (39)	7 (4)	84 (48)
Cooled (0°C)	0	158	150	144 (96)	116	2 (2)	27 (23)	45 (39)	2 (2)	40 (34)
	0.5	132	119	11 (9)	10	3 (30)	3 (30)	4 (40)	0 (0)	0 (0)
	1.0	130	113	16 (14)	15	1 (7)	4 (26)	9 (60)	0 (0)	1 (7)
	1.5	521	481	121 (25)	114	7 (6)	34 (30)	65 (57)	1 (1)	7 (6)
Frozen	2.0	113	102	22 (22)	22	0 (0)	4 (18)	16 (73)	0 (0)	2 (9)

Morphologically normal oocytes after culture were inseminated in vitro and then cultured for 5-8 h.

* Percentage of recovered oocytes.

** Percentage of oocytes examined after insemination.

Table 21. Stages of eggs penetrated.

Treatment	No. of eggs penetrated	No. (%) of eggs with			
		Sperm in peri-vitelline space	Enlarged sperm head	Male pronucleus	Abnormality
Control	84	3 (4)	7 (8)	71 (84)	3 (4)
Cooled (0°C)	40	5 (13)	10 (25)	21 (52)	4 (10)
Frozen (-196°C)	10	2 (20)	2 (20)	4 (40)	2 (20)

Table 22. Effect of DMSO and sucrose on survival and fertilization in vitro of mouse oocytes cultured after freezing.

Cryoprotective agent (conc.)	Addition temperature (°C)	No. of oocytes				
		Frozen	Recovered and cultured	Considered as normal after culture(%)*	Penetrated (%)**	Undergoing normal fertilization(%)**
DMSO(1.5 M)	0	176	165	20 (12)	5 (25)	1 (5)
	37	157	136	46 (34)	13 (28)	6 (13)
DMSO(1.375 M)+ sucrose(0.125 M)	0	264	234	81 (35)	23 (28)	9 (11)
	37	136	119	46 (39)	11 (24)	3 (7)

* Percentage of the oocytes recovered.

** Percentage of the oocytes considered to be normal after culture.

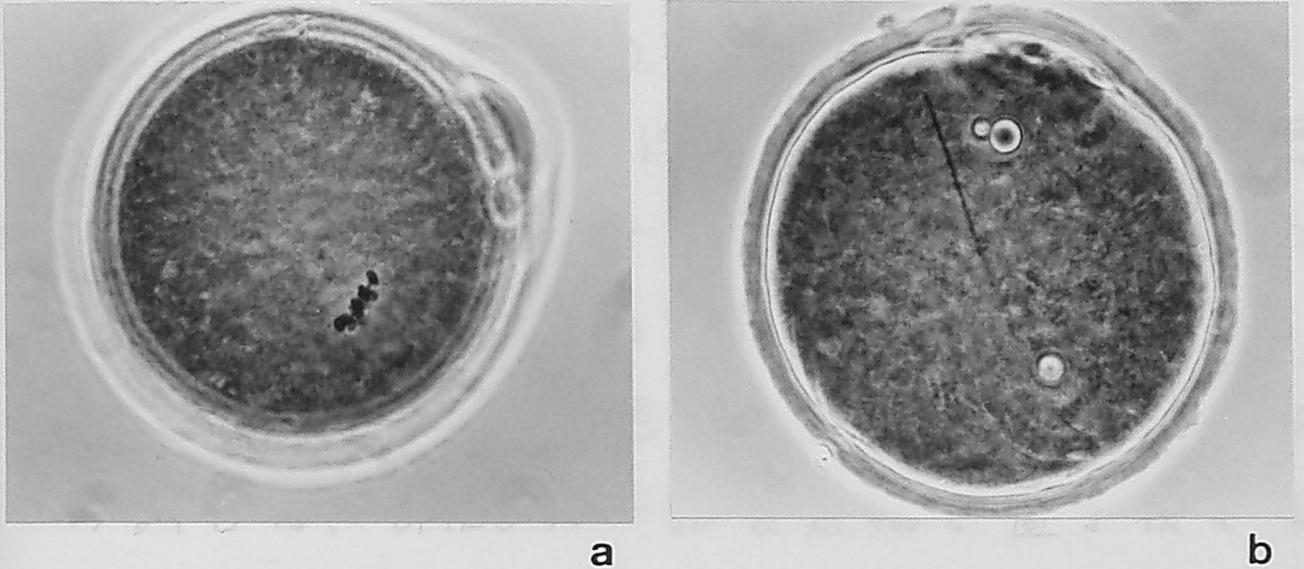


Fig. 13. Phase-contrast photomicrographs of frozen-thawed mouse follicular oocytes. x 640.

- a. An oocyte cultured for 14 hr after thawing. It looks normal showing the 1st polar body and a chromatin at a stage of metaphase II.
- b. An oocyte cultured for 13 hr after thawing, inseminated with capacitated epididymal spermatozoa and examined 7 hr after insemination. It is undergoing fertilization with the male and female pronuclei, penetrating sperm tail and the 2nd polar body.

実験3では、耐凍剤として1.5M-DMSOあるいは1.375M-DMSO + 0.125M-sucroseを用い、これらの添加温度が -196°C に凍結された卵胞卵の耐凍性および体外受精に及ぼす影響についてしらべた。結果はTable 22に示すように、融解-培養後形態的に正常と思われる卵子の割合は、DMSOの一部を蔗糖で置き換えるか、あるいは 37°C で耐凍剤を添加することにより高まったが、体外受精実験における精子侵入率には差がみられなかった。

III 考察

マウス卵胞卵の凍結保存を試みた報告はみられないが、本実験で得られた結果をマウス受精卵の凍結結果(第3章)と比較してみると、卵胞卵の耐凍性は明らかに低いといえる。これは、卵子の成熟~受精過程において膜の性質が変化することの一因と考えられる。凍結処理卵子の体外受精後の侵入率は極めて低く(6~28%)、凍結-融解後形態的には正常と思

われる卵子も生理的機能に何らかの変化を受けたものと思われる。一方で、正常な前核期まで移行した卵子 (Fig. 13-b) も観察されたことから、今後、凍結-融解の条件を変えることにより生存率および侵入率を高めることも可能であろうと思われる。

DMSOの添加温度を 0°C から 37°C に変えることにより、生存率が改善される場合がみられたが、これは、高温下でDMSOが卵細胞内に速やかに侵入したことによる可能性が考えられる。また、融解-DMSO希釈過程の浸透圧的傷害を緩和する目的でDMSOの一部を蔗糖に置き換えた結果、わざわざ高い生存率が得られたが有意差はなく(χ^2 検定)、必ずしも満足な結果とは言えない。

IV 摘要

-196°C に凍結保存されたGV期のマウス卵胞卵を体外培養により成熟させ、体外受精をおこなった。得られた結果の概要はつぎの通り

である。

1. 凍結 - 融解後の生存率は 9~39% で、受精卵に比べて低かった。また、DMSO 濃度が 1.5~2.0M の場合に生存率が高かった。
2. 凍結卵子の体外培養後の M2 移行率は 33% で、対照区 (70%) および 0°C 冷却区 (62%) に比べて低かった。
3. 凍結卵子の体外受精後の精子侵入率は 6~28% で、対照区 (48%) および 0°C 冷却区 (34%) に比べて低かった。また、侵入卵のうち前核期まで移行した卵子の割合 (40%) も対照区 (84%) に比べて低かった。
4. DMSO を 37°C で添加するか、あるいは DMSO の一部を蔗糖で置き換えることにより、わがかに生存率が高まったが、精子侵入率は改善されなかった。

第5節 ラット卵胞卵の凍結保存

前節では GV 期のマウス卵胞卵の凍結実験をおこなったが、融解後の生存率は上述の受精卵の場合に比べて低率であった。本実験は、ラットとマウスの種間、および卵子の成熟段階による耐凍性を比較する目的で、種々の成熟段階にあるラット卵胞卵の凍結実験をおこなった。

I 実験材料および方法

Wistar 系および Sprague-Dawley 由来の CD 系の白色ラットを用いた。21~26 日令の未成熟雌ラットに 10 i. u. の PMSG を皮下注射し、48 時間後に 10 i. u. の HCG を腹腔内注射した。GV 期の卵胞卵は PMSG 注射後約 48 時間目に、各種成熟段階にある卵胞卵は、HCG 注射後 3, 6.5 および 8.5 時間目に、それぞれ発育した卵胞から採取した。卵子は、室温の PBS で 2 回洗浄後、卵丘細胞を付着させたまま 10~25 個ずつ

つ、0.1mlのPBSを入れた試験管(10×75mm)に移し、ドライアイスとアルコールにより毎分1°Cの速度で0°Cまで冷却した。

DMSO希釈温度がGV期の卵細胞の耐凍性に及ぼす影響について検討する実験では、0°Cで0.02, 0.03 および 0.05mlの3.0M-DMSO添加PBSを5分間隔で試験管に添加した(最終濃度1.5M-DMSO)。5分後、毎分1°Cの速度で-4°Cまで冷却して植氷し、5分間保った。-4°Cから-50°Cまでを0.33°C/分、-50°Cから-75°Cまでを1°C/分の速度で冷却したのち試料を液体窒素中に浸漬し、1~60日間保存した。試料を室温空气中に放置することにより融解させ(25°C/分)、凍結液が融解しはじめるとたんに試験管を、氷水中、室温空气中あるいは37°C水中におき、各温度で1.4mlのPBSを3分間隔で5回に分けて加えることによりDMSOを希釈した。

DMSO添加温度がGV期の卵細胞の耐凍性に及ぼす影響をしらべる実験では、卵子を入れた

試験管を 37°C 水中、室温空气中あるいは 0°C 氷水中におき、各温度で DMSO を添加した。凍結および融解は上記と同じ方法でおこなひ、融解後の DMSO 希釈は室温でおこなった。

卵子の成熟段階、および凍結液中に添加した sucrose が耐凍性に及ぼす影響についてしらべる実験では、耐凍剤として、 3.0M-DMSO あるいは $2.75\text{M-DMSO} + 0.25\text{M-sucrose}$ を含む PBS を室温で添加したのち(最終濃度 1.5M-DMSO および $1.375\text{M-DMSO} + 0.125\text{M-sucrose}$)、上記と同じ方法で試料を凍結-融解した。DMSO の希釈は室温でおこなひ、一部の試料では第 1 段階の希釈液 (0.1ml) に 0.25M-sucrose を添加した PBS を用いた。

融解後回収された卵細胞は PBS で 2 回洗浄後、修正 KRB 液で培養した。PMSG 注射後 48 時間目に採取した卵細胞は 14 時間、HCG 注射後 3, 6.5 および 8.5 時間目に採取した卵細胞はそれぞれ 11, 7.5 および 5.5 時間培養して成熟分裂を誘起させたのち、形態的に正常と思わ

れる卵子を、あらかじめ5時間の前培養をおこなったラット精巢上体精子($0.2 \sim 0.6 \times 10^6$ 精子/ml)浮遊液へ移して体外受精をおこなった。卵子は、精子とともに8時間培養したのち固定染色して観察した。精子が卵細胞質中に入るとは卵細胞質中に精子尾部とともに膨化精子頭部あるいは雄性前核を見出せるものを受精途上卵とした。

II 実験結果

第1の実験では、GV期のラット卵細胞を凍結-融解後種々の温度でDMSOを希釈し、それらがその後の生存性および体外受精に及ぼす影響についてしらべた。結果はTable 23に示した。凍結された卵子の生存率および体外受精後の精子侵入率は、融解後DMSOを室温で希釈した場合はそれぞれ46および34%、 37°C で希釈した場合はそれぞれ54および33%であり、いづれも 0°C で希釈した場合(それぞれ

Table 23. The effect of diluting DMSO at various temperatures on survival and fertilization in vitro of rat oocytes cultured after freeze-thawing.

Dilution temperature of DMSO	No. of oocytes cultured after thawing	No. of normal oocytes after culture (%)	No. of oocytes inseminated*	No. of oocytes penetrated (%)	No. of oocytes undergoing fertilization (%) ⁺	No. of oocytes penetrated with abnormality (%) ⁺
0°C	146	42(29)	34	4(12)	0(0)	3(75)
Room temperature	138	63(46)	58	20(34)	9(45)	6(30)
37°C	128	69(54)	49	16(33)	6(38)	6(38)

The oocytes recovered 48 h after PMSG were frozen after adding DMSO at 0°C, and cultured for 14 h after thawing.

*The oocytes were examined 8 h after insemination with spermatozoa preincubated for 5 h.

⁺Percentages of the number of penetrated oocytes.

29 および 12%) よりも高かった。また、精子侵入が見られるものの、極体、前核、細胞質などが異常である卵子の割合も、DMSO の希釈を室温あるいは 37°C でおこなった場合は 30~38% であったのに対し、 0°C 希釈区では 75% ($3/4$) であった。

第 2 の実験では、DMSO 添加温度が凍結 - 融解されたラット卵細胞 (GV 期) の耐凍性および体外受精に及ぼす影響についてしらべた。結果は Table 24 に示した。DMSO を室温で添加したのうち凍結 - 融解された卵子は培養後 63% が生存していたが、DMSO 添加を 37°C あるいは 0°C でおこなった場合の生存率はそれぞれ 45 および 48% に低下した。体外受精による精子侵入率は、 0°C 、室温 および 37°C 添加区でそれぞれ 17, 36 および 47% であったが、最高の受精途上卵率 (62%) および最低の異常侵入卵率 (8%) は室温添加区で得られた。

第 3 の実験では、卵子の成熟段階および、凍結液あるいは希釈液中に添加した sucrose

Table 24. The effect of adding DMSO at various temperatures on survival and fertilization in vitro of rat oocytes cultured after freeze-thawing.

Adding temperature of DMSO	No. of oocytes cultured after thawing	No. of normal oocytes after culture (%)	No. of oocytes inseminated*	No. of oocytes penetrated (%)	No. of oocytes undergoing fertilization (%) ⁺	No. of oocytes penetrated with abnormality (%) ⁺
0°C	85	41(48)	41	7(17)	3(43)	3(43)
Room temperature	86	54(63)	36	13(36)	8(62)	1(8)
37°C	47	21(45)	19	9(47)	4(44)	4(44)

The oocytes recovered 48 h after PMSG were frozen after adding DMSO at various temperatures, and cultured for 14 h after thawing and diluting DMSO at room temperature.

*The oocytes were examined 8 h after insemination with epididymal spermatozoa pre-incubated for 5 h.

⁺Percentages of the number of penetrated oocytes.

Table 25. Freezability and fertilization in vitro of rat oocytes at various stages of maturation after freeze-thawing.

Time of recovery (h after HCG)	Freezing medium (PBS) with:	Dilution medium	No. of oocytes cultured after thawing*	No. of normal oocytes after culture (%)	No. of oocytes inseminated**	No. of oocytes		
						Penetrated (%)	Undergoing fertilization (%)***	Penetrated with abnormality (%)***
3	1.5 M-DMSO	PBS	50	19(38)	19	6(32)	3(50)	3(50)
	1.5 M-DMSO	PBS+sucrose†	54	23(43)	23	15(65)	7(47)	8(53)
	DMSO+sucrose†	PBS	36	21(58)	21	14(67)	7(50)	5(36)
	Total		140	63(45)	63	35(56)	17(49)	16(46)
6.5	1.5 M-DMSO	PBS	57	45(79)	44	30(68)	20(67)	10(33)
	1.5 M-DMSO	PBS+sucrose†	53	40(75)	39	31(79)	26(84)	5(16)
	DMSO+sucrose†	PBS	56	35(63)	34	32(94)	27(84)	5(16)
	Total		166	120(72)	117	93(79)	73(78)	20(22)
8.5	1.5 M-DMSO	PBS	55	35(64)	34	32(94)	28(88)	4(13)
	1.5 M-DMSO	PBS+sucrose†	45	35(78)	35	34(97)	34(100)	0(0)
	DMSO+sucrose†	PBS	50	42(84)	42	41(98)	40(98)	1(2)
	Total		150	112(75)	111	107(96)	102(95)	5(5)

DMSO or DMSO+sucrose was added before freezing and diluted after thawing each at room temperature.

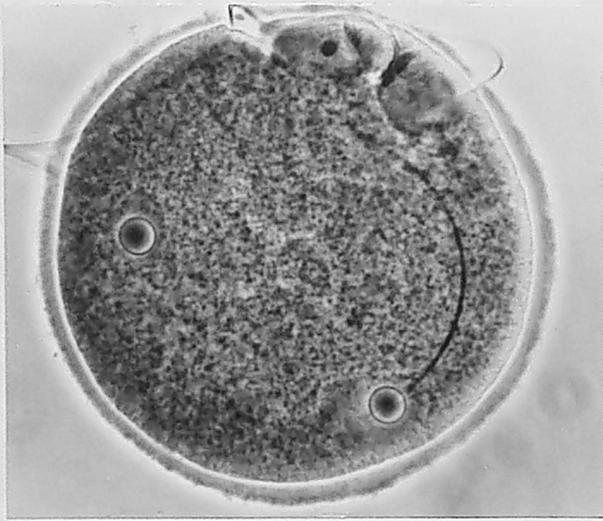
* The oocytes recovered 3, 6.5 and 8.5 h after HCG were cultured for 11, 7.5 and 5.5 h, respectively, after thawing.

** The oocytes were examined 8 h after insemination with epididymal spermatozoa preincubated for 5 h.

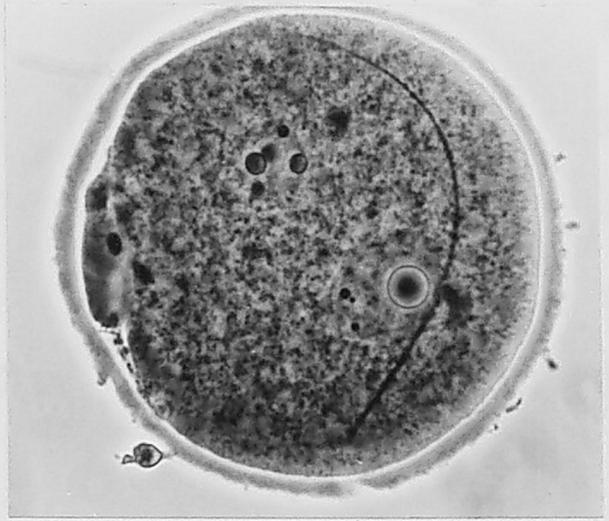
*** Percentages of the number of penetrated oocytes.

† 1.375 M-DMSO and 0.125 M-sucrose were included.

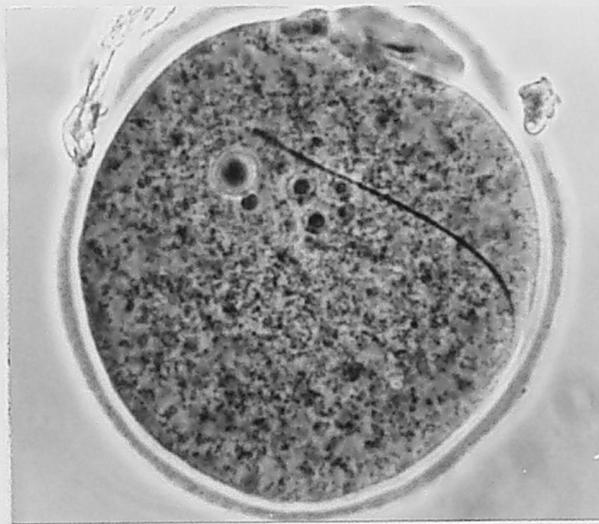
‡ PBS with 0.25 M-sucrose was used only for the first step (0.1 ml) of dilution.



a



b



c

Fig. 14. Phase-contrast photomicrographs of frozen-thawed rat follicular oocytes collected 0(a), 6.5(b) and 8.5(c) hr after the injection of HCG. Oocytes were cultured for 14(a), 7.5(b) and 5.5(c) hr after thawing, inseminated with capacitated spermatozoa and examined 8 hr after insemination. All the oocytes are undergoing fertilization with the male and female pronuclei, penetrating sperm tail and the 2nd polar body. x 640.

が、凍結-融解後のラット卵胞卵の生存性に及ぼす影響についてしらべた。結果は Table 25 に示した。HCG 注射から卵胞卵の採取までの時間が長くなるに従って、融解-培養後の生存率、体外受精後の精子侵入率および受精途上卵率はすべて増加し、対照的に異常侵入卵の率は減少した。凍結液あるいは DMSO 希釈液中に sucrose を添加することにより、一般に生存率および侵入率がやや増加し、異常侵入卵の率が減少する傾向がみられたが、6.5 時間区の生存率は逆にやや低値であった。

IV 考察

凍結されたマウス胚盤胞の生存率は、DMSO の添加および除去を 20°C でおこなった場合³⁸⁾の方が、 0°C でおこなった場合³⁰⁾よりも高い値が報告⁴⁴⁾されている。Whittingham (1974) はマウス胚盤胞の凍結保存実験の際の DMSO 添加および除去温度についてより詳細に検討した結果、添加温度に関係なく、 37°C で希釈した場合に

胚の生存率は高く、一方、 37°C 添加 - 0°C 希釈の場合に生存率は最も低いことを観察した。最近では、めん羊⁵³⁾、家兎^{93), 102)} およびウシ胚^{59), 60)} の凍結保存実験でも、高い温度域 ($20 \sim 37^{\circ}\text{C}$) での DMSO の添加および希釈がおこなわれている。本実験に用いた GV 期のラット卵胞卵においても、室温 ($20 \sim 28^{\circ}\text{C}$) あるいは 37°C において DMSO を添加および除去した場合には、生存率、体外受精後の精子侵入率ともに高い値が得られた。すでに本章第 2 節で明らかにされたように、DMSO は 30°C ではマウス未受精卵に極めて急速に侵入するが、 0°C では侵入に $30 \sim 60$ 分間を要する。このことは、ラット卵胞卵にもあてはまることが確認されており (未発表データ)、本実験で、室温あるいは 37°C において DMSO を添加した場合に融解 - 授精後の精子侵入率が高かったのは、DMSO が細胞質内に十分侵入することにより凍結によるストレスが軽減されたためかもしれない。しかし、DMSO の侵入に時間を要する 0°C 添加区においてもかな

りの生存卵子が得られたことから、凍結前にDMSOが細胞質内に侵入することは、卵子の生存に必ずしも必要ではないと思われる。一方、室温あるいは 37°C でDMSOを希釈した場合に高い生存率および精子侵入率が得られたのは、DMSOが速やかに除去されたために、水分の流入による浸透圧的傷害が緩和されたためと考えられる。

種々の成熟段階にあるラット卵胞卵を凍結せずに体外培養し、体外授精をおこなった実験では、成熟段階が進むにつれて受精率が高くなることが報告¹⁰⁸⁾されている。このことは、HCG注射後3, 6.5 および8.5時間目に採取した卵胞卵を培養前に凍結-融解処理した本実験の結果と一致する。また、融解-培養後の生存率もHCG注射から採卵までの時間の経過とともに高まったが、これは、卵子の成熟とともに耐凍性も高くなったことを示している。HCG注射後3, 6.5 および8.5時間目に採取された卵胞卵は、それぞれGV期~Condensed

GV期(CGV), CGV~M1 および M1~第1成熟分裂終期(Telo. 1)の成熟段階にあると考えられる¹⁰⁹⁾ことから、M1期以前の段階にある卵子は、それ以降の段階の卵子に比べて特に耐凍性が低いと思われる。これは、Whittingham(1977)⁵⁷⁾が示唆するように、GV崩壊後に膜の透過性をはじめ種々の性状に何らかの変化が生じたことによるとも考えられる。

蔗糖は、それ自体でもある種の細胞には凍害防止作用をもつ¹¹⁰⁾が、哺乳動物卵子には効果がない^{37)~39)}ことが知られている。本実験では、融解およびDMSO希釈過程で高張な卵細胞内に急速に水分が流入することによっておこると推測される浸透圧的傷害を防ぐ目的で、細胞質内に侵入できないが、細胞外の浸透圧を高めうる物質として蔗糖を使用した。凍結液あるいは希釈液中に蔗糖を添加することにより、全体として生存率および体外受精時の精子侵入率が高まったが、これは、蔗糖が目的どおり細胞内外の浸透圧差による傷害を緩和させ

たためであろうと推測される。Bank & Maurer (1974)⁸⁹⁾は、凍結-融解された家兎胚の希釈液に高張液を用いることにより生存率が改善されることを認めているが、Whittingham & Adams (1976)⁹¹⁾は、やや急速に凍結された家兎胚では、むしろ低張な希釈液が有効であることを報告している。低張液の作用機序については不明であるが、いづれにしても、耐凍剤除去過程における傷害を緩和することは凍結保存に成功する上で重要な要因の一つになるとと思われる。

IV 摘要

種々の成熟段階にあるラット卵細胞を -196°C まで凍結し、融解-培養後体外授精をおこなった。得られた主な結果は、以下の通りである。

1. GV期の卵細胞は、DMSOを室温で添加した場合に生存率および授精による精子侵入率が高かった。

2. GV期の卵胞卵は、室温あるいは37°CでDMSOを除去した場合に生存率および授精による精子侵入率が高かった。
3. HCG注射後3, 6.5および8.5時間目に採取した卵胞卵の耐凍性を比較した結果、6.5時間目以降の成熟段階にある卵子は、3時間目の卵子に比べて生存率が高く、また、精子侵入率は卵子の成熟段階が進むにつれて上昇した。
4. 凍結液あるいはDMSO希釈液中に蔗糖を添加することにより、生存率、精子侵入率共にいく分高くなる傾向が認められた。

第6節 小括

卵子の耐凍性は発育段階によって異なることが知られているが、未受精卵の凍結保存に関する報告は少ない。本実験では、種々の成熟段階にあるマウスおよびラット未受精卵を凍結し、耐凍性を比較した。得られた結果の概要は以下の通りである。

1. マウス未受精卵を用いて耐凍剤の細胞内外への透過性を比較した結果、Glycerolの透過性はDMSOおよびEGに比べて非常に低く、DMFAの透過性は極めて高かった。また0°Cでは30°Cに比べて透過速度が遅かった。
2. 卵管から回収されたラット未受精卵を-196°Cまで凍結後融解した結果、14~24%の卵子が形態的に正常であった。これらの卵子に体外授精し、5時間目に観察した場合は、精子侵入率72%、このうち正常な受精途上卵は67%であったが、26時間目に観察した場合は、侵入率93%、正常な分割卵は

そのうち31%であった。

3. GV期のマウス卵細胞を -196°C まで凍結後融解した結果、形態的に正常な卵子の割合は9~39%で、受精卵に比べて低かった。これらの卵子を体外培養した結果33%がM2まで移行したが、体外授精後の精子侵入率は6~28%であった。
4. GV期のラット卵細胞を -196°C まで凍結し、融解後、体外培養—体外授精した結果、DMSOを室温で添加し、室温~ 37°C で除去した場合に、生存率および精子侵入率ともに高い値が得られた。
5. HCG注射後3, 6.5および8.5時間目に採取したラット卵細胞を -196°C まで凍結して耐凍性を比較した結果、6.5時間目以降の卵子の生存性が高かったことから、GV崩壊以降に耐凍性が高まるものと思われる。また、体外授精後の精子侵入率は、卵子の成熟が進むに従って高まった。さらに、凍結液あるいはDMSO希釈液中に蔗糖を添加すること

により、生存率、精子侵入率共にいく分高くなる傾向が認められた。

第5章 ハムスター-受精卵の凍結保存

第1節 緒言

マウス、ラットおよび家兎などの実験動物に比べて、ハムスター-卵子の凍結保存に関する報告は極めて少ない。Parrott (1960)³⁵⁾は、マウス-卵巣を凍結保存した報告の中で、ハムスター-卵巣の凍結保存に失敗したことを記している。Tsunodaら (1976)⁵⁵⁾および Parkening & Chang (1977)¹⁰⁷⁾は、ハムスター-未受精卵を凍結-融解後体外受精させ、高い生存率および精子侵入率を得たことを報告した。受精卵に関しては、Whittingham (1978)⁷⁶⁾が、Symposiumの中で、 -196°C に3年間保存された8細胞期胚を培養して初期胚盤胞まで発育したと述べているが、詳細については報告されていない。1979年、角田・相馬・杉江・Chang¹¹¹⁾は、ハムスター-8細胞期胚の凍結保存の試みを発表したが、凍結-融解後の生存率は高かったものの、

培養後の発生率は極めて低く、移植実験にも失敗している。ハムスター受精卵は、体外培養や移植そのものが他の実験動物卵子に比べて難しく、凍結保存に成功するまでにはまだ時間がかかるかもしれない。本実験では、まずハムスター受精卵の体外培養条件を検討し、ついで凍結実験をおこなった。

第2節 受精卵の体外培養

ハムスター-受精卵の凍結保存に関する研究がほとんどおこなわれていない大きな理由として、他の実験動物種に比べて卵子の体外培養技術が確立されていないことがあげられる。本節では、凍結保存に先立ち、ハムスター-8細胞期胚の体外培養条件を検討した。

I 実験材料および方法

10週令をこえた成熟雌ゴールデン・ハムスターを実験に用いた。膣垢像により性周期を同定し、排卵前日に雄と同居させて自然交配をおこない、3日目の夜(18:30~20:30)に屠殺した。PBSで子宮を灌流することにより8細胞期を回収し、PBSで洗浄後5~10個ずつ種々の培養液(約0.4ml)に浮遊させて、37°C, 95%空気, 5%CO₂の炭酸ガス培養装置内で培養した。12~16時間後に卵子の発育状況を実体顕微鏡下で観察した。

I 実験結果

第1の実験では、Whittingham¹¹²⁾(1971)がハムスター卵子の培養に用いた修正Tyrode液(T6), T6に家兔不活化血清を20%添加したもの, TCM 199およびマウス胚の培養に用いられる修正KRB液の4種の培養液で胚を培養し、その後の発育を比較した。その結果、Table 26に示すように、T6で培養された胚のみが低率ながら胚盤胞に発育し、他の3種の培養液では胚の発育はみられなかった。

これら4種の培養液の浸透圧はすべて約

Table 26. In vitro development of hamster 8-cell embryos cultured in various media.

Medium	No. of embryos	
	Cultured	Developing to blastocyst (%)
Modified Tyrode (T6)	27	3 (11)
T6 + 20% rabbit serum	22	0 (0)
TCM 199	23	0 (0)
Modified KRB	22	0 (0)

310 mosmol であったが、近年、橋詰・伊藤・石島・後藤⁽¹¹³⁾は、ハムスター8細胞期胚を種々の浸透圧の修正KRB液で培養した結果170 mosmol程度の低張液が適していることを報告した。そこで、第2の実験では、実験1の結果最も成績のよかったT6のNaCl量を調節することにより浸透圧を変え、これらが胚の発育に及ぼす影響についてしらべた。その結果、Table 27 に示すように、170~220 mosmolの低張な培養液を用いた場合に胚の発育率が高かった。

Table 27. The effect of osmolarity of culture medium on the development of hamster 8-cell embryos in vitro.

Osmolarity (mosmol)	No. of embryos	
	cultured	developing to blastocyst (%)
314.5	34	1 (3)
270	32	7 (22)
220	33	12 (36)
170	35	12 (34)
150	26	7 (27)

実験2では、培養液の浸透圧を下げることにより高い発育率が得られたが、NaClを減少させているため、 Na^+/K^+ 比が変化したことが培養結果を向上させた可能性も考えられる。実験3では、T6の浸透圧を317.5 mosmolに保ったまま、NaClとKClの量をかえることにより Na^+/K^+ 比を変化させ、これらの培養液で胚を培養した。その結果、Table 28に示すように、 Na^+/K^+ 比を実験2の170 mosmol区に相当する28.41あるいはそれ以下まで低下させた培養液中では、胚の発育は全く見られなかった。

Table 28. Effect of Na^+/K^+ ratio of culture medium on the development of hamster 8-cell embryos in vitro.

Na^+/K^+ ratio	No. of embryos	
	cultured	developing to blastocyst (%)
55.91 (T6)	12	1 (8)
28.41	21	0 (0)
14.20	20	0 (0)

角田ら(1979)¹¹¹⁾は、T6に1.71mM乳酸カルシウムを添加した液でハムスター8細胞期胚を培養した場合、無添加区に比べて高い発育率を得た。また、実験1ではT6で培養した胚のみが発育したが、T6の Ca^{++} 濃度(1.80mM)は、修正KRB液(1.71mM)およびTCM199(1.36mM)に比べて高かった。そこで、実験4では Ca^{++} 濃度が胚の発育に及ぼす影響についてしらべた。NaCl量を調節することにより、浸透圧は317.5 mosmolに保った。Table 29に示したよ

Table 29. Effect of Ca^{++} concentration of culture medium on the development of hamster 8-cell embryos in vitro.

Ca^{++} concentration (mM)	No. of embryos	
	cultured	developing to blastocyst (%)
57.6	25	1 (4)
28.8	25	1 (4)
14.4	25	1 (4)
7.2	25	4 (16)
3.6	25	6 (24)
1.8 (T6)	25	6 (24)

うに、 Ca^{++} 濃度をT6の倍量にした場合、(3.6mM) 胚盤胞への発育率はT6と同じ(24%)であったが、14.4mM以上に増加させた場合は発育率はむしろ低下した。

最後にエネルギー源の面から検討を加えるために、ピルビン酸濃度を変化させ、それらが胚の発育に及ぼす影響についてしらべた。なお、培養液は、実験1~4の結果より浸透圧220mosmol, Ca^{++} 3.6mMの修正T6を用いた。その結果、Table 30に見られるように、T6に含まれていた濃度(0.25mM)よりも高い濃度の場合により高い発育率が得られた。

Table 30. Effect of pyruvate concentration on the development of hamster 8-cell embryos in vitro.

Pyruvate concentration (mM)	No. of embryos	
	cultured	developing to blastocyst (%)
0.00	22	2 (9)
0.25	20	5 (25)
0.50	26	10 (38)
1.00	24	11 (46)

Ⅲ 考察

実験1で4種の培養液を比較した結果、T6で培養された胚のみが胚盤胞に発育した。角田ら(1979)¹¹¹⁾は、PBSにハムスター血清を添加した液を用いた場合、ハムスター8細胞期胚は全く発育しないことを報告しているが、本実験でT6に家兎血清を添加した場合の発生率も0%であった。血清は他の実験動物種の卵子の培養に有効なことが知られているが、ハムスター卵子の発育に対しては、むしろ抑制的に働くように思われる。

橋詰ら(1979)¹¹³⁾は、修正KRB液の浸透圧を低下させることによりハムスター受精卵の培養に成功したが、実験2では、T6を用いてこれを追試した結果、170~220 mosmol区で高い発育率(34~36%)が得られ、橋詰らの実験結果と一致した。これは、実験3で明らかにされたように、 Na^+/K^+ 比の変化に基づくものとは考えられず、浸透圧そのものによるのではないかと推測される。

角田ら(1979)¹¹¹⁾は、T6に1.71mM乳酸カルシウムを添加することにより、ハムスター8細胞期胚の発生率が増加することを報告したが、本実験で Ca^{++} 濃度を3.6mMに増加させた場合の発生率は対照区(1.8mM)と変わらず、確認されなかった。これに対して、ピルビン酸を増量し、とくに1.0mM区で最も高い発育率が得られたが、これ以上の濃度についても検討する必要があると思われる。

IV 摘要

ハムスター8細胞期胚の培養液の組成が胚盤胞への発育率に及ぼす影響について検討し、以下の結果を得た。

1. T6で培養された胚は11%が発育したが、T6+20%家兎血清、TCM199および修正KRB液では胚の発育はみられなかった。
2. T6のNaClを減少させて浸透圧を低下させることにより胚の発育率が高まり、170~220 mosmolの場合に最も高かった(34~36%)

が、これは、 Na^+/K^+ 比の低下によるものではなかった。

3. Ca^{++} 濃度を増加させることにより発育率の改善はみられなかった。

4. ピルビン酸濃度が増加するに従って発育率が改善された。

第3節 低温および凍結保存

前節でハムスター8細胞期胚の体外培養条件を検討した結果、最高46%の卵子を胚盤胞まで発育させることができた。本節では、胚を種々の耐凍剤と共に0および -196°C まで冷却し、回収後、最も高い発育率の得られた培養液で体外培養することにより生存性をしらべた。

I 実験材料および方法

自然交配させた成熟雌ゴールデン・ハムスターを3日目の夜(18:30~20:30)に屠殺し、PBSで子宮を灌流することにより8細胞期胚を回収した。PBSで洗浄後、形態的に正常と思われる卵子のうち、一部は対照区として培養し、残りは5~14個ずつ、あらかじめ 0°C に冷却された0.2mlの保存液を含むガラス試験管(10×100mm)に移した。

第1の実験では、 0°C までの冷却および耐

凍剤が胚の生存性に及ぼす影響をしらべるために、保存液として、PBSおよびPBSに1.5M-DMSO, EG, GlycerolあるいはDMFAを添加した液を用い、氷水中に60分間保持した。

第2の実験では、 -196°C に凍結保存するために凍結液として上記4種の耐凍剤を添加したPBSを用いた。試料は、 $-4\sim-5^{\circ}\text{C}$ アルコール中に浸して植氷をおこなったのち、ドライアイス片をアルコールに添加することにより、 -50°C までを毎分 0.33°C 、さらに -75°C までを毎分 1°C の速度で冷却させ、最後に液体窒素中に投入した。 -196°C に1日間保存したのち、室温空气中に試験管を放置させることにより融解させた。

0°C に保存された胚および融解された胚はただちに室温で0.2, 0.4および0.4ml PBSを5分間隔で加えて耐凍剤を希釈後回収し、さらにPBSで2回洗浄後、培養液に浮遊させた。

培養液の組成は、Table 31に示したように前節で最も高い発育率の得られたものを用い、

炭酸ガス培養装置内で約16時間培養後、実体顕微鏡下で卵子の発育状態を観察した。

II 実験結果

種々の保存液を用いて、60分間 0°C に冷却されたハムスター8細胞期胚の胚盤胞への発育率を Table 32 に示した。冷却された胚の発育率は、冷却されなかった対照区 (55%; Fig. 15-a) に比べてやや低く、耐凍剤を含まない PBS 中に保存された胚では 32%, DMSO, EG, Glycerol および DMFA を含む PBS を用いた場合は、それぞれ 15, 25, 15 および 0% であった。

Table 31. Composition of modified Tyrode solution used to incubate hamster 8-cell embryos.

Composition	Concentration (mM)
NaCl	47.80
KCl	2.68
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0.36
CaCl ₂ ·2H ₂ O	3.60
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.49
NaHCO ₃	25.00
Glucose	5.56
Na-pyruvate	1.00
Na-lactate	25.00
BSA	4mg/ml

Table 32. Survival of hamster 8-cell embryos stored at 0°C for 60 min in the presence of various cryoprotective agents.

Treatment	Medium	No. of embryos		
		Cooled	Recovered	Developed to expanded blastocyst (%)*
Control	-	-	20	11 (55)
Cooled	PBS	20	19	6 (32)
	PBS + 1.5M-DMSO	20	20	3 (15)
	PBS + 1.5M-EG	18	16	4 (25)
	PBS+1.5M-Glycerol	20	20	3 (15)
	PBS + 1.5M-DMFA	15	11	0 (0)

* Percentage of recovered embryos.

Table 33. Survival of hamster 8-cell embryos stored at -196°C in the presence of various cryoprotective agents.

Cryo-protective agent (1.5 M)	No. of embryos				
	Frozen	Recovered	With normal cytoplasm (%)*	With normal zona pellucida (%)*	Developed to expanded blastocyst (%)*
DMSO	20	17	17 (100)	16 (94)	3 (18)
EG	21	18	18 (100)	17 (94)	1 (6)
Glycerol	20	18	18 (100)	12 (67)	0 (0)
DMFA	18	13	13 (100)	13 (100)	0 (0)

* Percentage of recovered embryos.

4種の耐凍剤を用いた凍結処理による凍結耐性

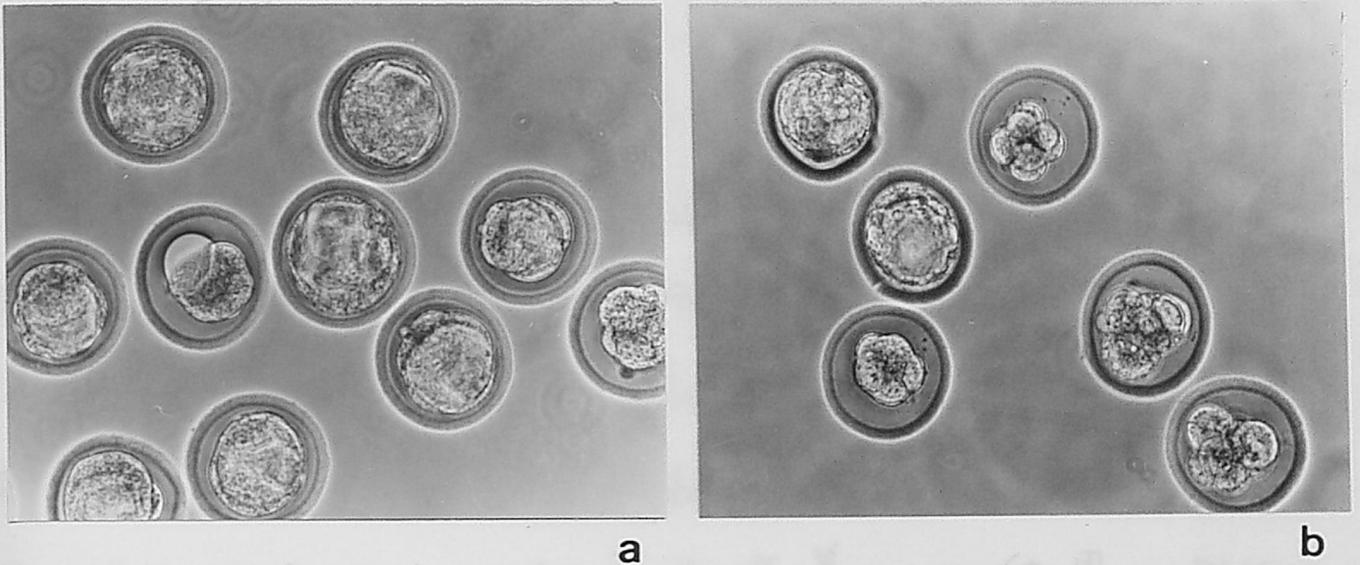


Fig. 15. Phase-contrast photomicrographs of hamster embryos cultured in vitro. Magnification x 157.

- Eight-cell embryos were cultured in modified Tyrode solution for 16 hr.
- Eight-cell embryos were frozen to -196°C in the presence of 1.5 M-DSMO and cultured for 16 hr after thawing. There are two embryos developed to blastocysts.

ハムスター胚の凍結耐性に関する試みは極めて少なく、角田ら(1979)の報告が唯一のものである。彼らは、8細胞期胚を凍結する際に耐凍剤の添加および融解を 0°C で行った場合に、形態的に正常な胚の回収率が高くなることを報告している。本実験では、耐凍剤を 0°C で添加して -196°C まで凍結し、融解

4種の耐凍剤を用いて -196°C まで凍結された胚の融解後の形態および発育率をTable 33に示した。DMSO, EG, GlycerolおよびDMFAを用いた場合の形態的に正常と思われる卵子の割合は、それぞれ94, 94, 67および100%であったが、傷害を受けた卵子はすべて透明帯の損傷によるもので、卵細胞質はすべて正常であった。これらの卵子を培養した結果、DMSO区では 0°C 冷却処理後と同様の発育率(18%; Fig. 15-b)が得られたが、EG区では6%(1/17)、GlycerolおよびDMFA区では0%であった。

III 考察

ハムスター胚の凍結保存に関する試みは極めて少なく、角田ら(1979)¹¹⁾の報告が唯一のものである。彼らは、8細胞期胚を凍結する際に耐凍剤の添加および除去を 0°C でおこなった場合に、形態的に正常な胚の回収率が高くなることを報告している。本実験では、耐凍剤を 0°C で添加して -196°C まで凍結し、融解

後室温で除去したが、細胞質は形態的には全く傷害を受けず、一部の胚の透明帯のみが損傷を受けた。

しかし、これらの胚の培養後の発育率は低く、ハムスター胚は、① 0°C への冷却、②耐凍剤の添加、③ -196°C への凍結、と処理がすすむに従って何らかのストレスを受けることが明らかとなった。角田らは、DMSO、EG および Glycerol を用いて -196°C まで凍結された胚の融解後の発育率はそれぞれ 3% (8/257)、3% (2/64) および 25% (3/12) であったと報告している。本実験では、DMSO を用いた場合にやや高い値 (18%) が得られたものの、他の実験動物種に比べて極めて低い値といえる。しかしこのことからハムスター卵子の耐凍性が本質的に低いと考えるのは不適當と思われる。すでに述べたように、形態的な傷害は極めて少なく、また、未受精卵においては、凍結-融解後高い生存率 (83~94%) および体外受精後の精子侵入率 (85~98%) が得られることが報告さ

55), 107)
れており、ハムスター一卵子の耐凍性は、むしろ極めて高いと考えられる。これに対して、すでに前節で明らかにしたように、ハムスター一卵子は体外培養による発育率自体が他の実験動物種の卵子に比べて低く、冷却-凍結によって受け取れずかのストレスにより発育が大きく制限されたことが推察される。さらにハムスターでは、未受精卵と受精卵でストレスに対する感受性にかなりの差があることが推察される。

IV 摘要

本実験では、ハムスター8細胞期胚を種々の耐凍剤と共に、0あるいは -196°C まで冷却したのち体外培養し、胚盤胞へ発育するか否かを観察した。得られた結果の概要は、以下の通りである。

1. 胚盤胞への発育率は、無処理の対照区が55%であったのに対し、 0°C 冷却区は32%、DMSO, EG, Glycerol および DMFA と共に 0°C

に冷却された胚ではそれぞれ 15, 25, 15 および 0% であった。

2. 種々の耐凍剤と共に -196°C まで凍結された胚は、融解後、一部の透明帯が損傷を受けたものの細胞質はすべて正常であった。これらの胚を培養した結果、DMSO, EG, Glycerol および DMFA を用いた場合の生存率はそれぞれ 18, 6, 0 および 0% であった。

第4節 小括

本実験では、まず、ハムスター8細胞期胚の体外培養条件を検討し、ついで、胚を 0°C および -196°C まで冷却したのち体外培養をおこなった。得られた結果の概要は、以下の通りである。

1. 胚の培養液は、TCM199および修正KRB液に比べて、修正Tyrode液がすぐれていた。さらに、浸透圧を $170\sim 220\text{ mosmol}$ に低下させ、ピルビン酸を 1 mM まで増加させた場合に胚盤胞への発育率が増加したが、 Na^+/K^+ 比および Ca^{++} 濃度を変化させても改善されなかった。
2. -196°C に凍結された胚は、融解後は大部分が形態的に正常であったが、培養後の胚盤胞への発育率は、 0°C への冷却、耐凍剤の添加、さらに -196°C への凍結と処理が進むに従って低下した。

第6章 家畜卵細胞の低温保存

第1節 緒言

ウシについては、すでに凍結精液が実用化され、改良および増殖に大きく貢献してきたが、一方、雌側の生殖細胞を有効に利用する技術として人工妊娠が考えられる。人工妊娠は、人工授精よりもさらに改良速度を速めうる技術であり、また多胎による増産が可能になり、産業面での利用価値は極めて高いと考えられる。人工妊娠の普及のためには、受精卵の保存技術の開発が不可欠の条件となってくる。すでに、^{39), 59), 60)}ウシ、^{53), 60)}めん羊および山⁵⁴⁾羊においても、凍結された受精卵を移植することにより産子を得たという報告が散見されるが、実用化のためにはかなり高い生存率が要求され、今後にも多くの課題を残している。しかし家畜においては、実験動物に比べて得られる卵子の数が少なく、このことが技術研究の進

展に大きな障害になっている。

本実験では、手はじめに受精卵を対象とせず、屠場で比較的簡単に入手しうるウシおよびブタ卵巢から得られる卵胞卵を用いることによつて、種特異的な凍結条件をある程度推測し得るのではないかと考えて、卵胞卵の冷却および凍結実験をおこなつた。

第2節 ウシ卵胞卵の低温保存

ウシ卵胞卵の凍結保存を試みた実験はほとんどおこなわれていない。本実験では、ウシ受精卵の凍結保存法を確立するための手がかりを得ることを目的として、ウシ卵胞卵を0~-196°Cまで冷却したのち体外培養をおこない、生存性をしらべた。

1 実験材料および方法

屠場で成熟雌牛から卵巣を採取し、採卵までの2~3時間を32~35°Cの生理食塩水中に浸して保存した。卵巣は濾紙上で血液等の付着物を取り除いたのちPBSを入れた時計皿へ移し、柄付針を用いて卵胞を破ることにより卵胞卵を採取した。PBSで2回洗浄後、膨化していない状態の卵胞細胞を有する卵子を実験に用いた。

第1実験では、一部の卵子は対照区としてただちに培養し、残りは5~10個ずつ、あ

はじめ 0.2 ml の PBS を入れたガラス試験管 (10 × 100 mm) へ移し、0.25 ~ 0.5, 1.0 および 40°C/分の速度で 0°C まで冷却後、60 分間氷水中に保ったのち卵子を回収して修正 KRB 液で 31 ~ 35 時間培養した。

第 2 の実験では、0.1 ml の PBS を入れたガラス試験管に移した卵子を毎分 40°C の速度で 0°C まで冷却後、3.0 M の DMSO, EG, Glycerol あるいは DMFA 0.1 ml を 0.05 ml ずつ 2 回に分けて添加した。試料を -4 ~ -5°C のアルコール中に浸して植氷し、アルコールを入れた魔法ビンのまま液体窒素ガス中に静置させることにより毎分約 0.33°C の速度で -100°C まで冷却したのち液体窒素に浸して保存した。試料は、室温空气中に放置することにより融解させ (25°C/分)、1.4 ml の PBS を 5 段階に分けて加えて DMSO を希釈し、回収された卵子を PBS で洗浄したのち 31 ~ 35 時間培養した。

第 3 の実験では、実験 2 と同様の方法で卵子を冷却して耐凍剤を加え、植氷したのち、

アルコールにドライアイスを添加することにより $1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の速度で -10°C まで凍結し、同温度に5分間保ったのち融解させ、31~35時間培養したが、一部の卵子は、採取後25~30時間培養したのち -10°C までの凍結処理をおこない、融解後さらに4~5時間培養した。

卵子は培養後スライドガラスにマウントし、酢酸-エタノール(1:3)で3~5日間固定したのち酢酸オルセインで染色し、位相差顕微鏡下で成熟分裂像を観察した。

II 実験結果

実験1で、ウシ卵胞卵を 0°C に60分間保存したのち培養した結果をTable 34に示した。毎分0.25~0.5, 1.0 および 40°C のいずれの速度で冷却された卵子も、培養後37~45% (平均42%)が第2成熟分裂中期まで移行したが、これは対照区(44%)とほぼ等しい値であった。GV期にとどまったかあるいは退行した卵子の割合は、対照区(12%)に比べてやや高かった。

Table 34. Survival of bovine ovarian oocytes cooled to 0°C at various cooling rates.

Treatment	Cooling rate (°C/min)	No. of oocytes examined	No. of oocytes at GV or degenerated (%)	No. of oocytes at stage of (%)		
				M1	An.1 Tel.1	M2
Cooled	0.25-0.5	62	12 (20)	20(32)	2(3)	28(45)
	1.0	28	3 (10)	12(43)	1(4)	12(43)
	40	57	18 (31)	14(25)	4(7)	21(37)
	Total	147	33 (22)	46(31)	7(5)	61(42)
Control	-	132	16 (12)	55(42)	3(2)	58(44)

Table 35. Survival of bovine ovarian oocytes frozen to -196°C.

Concentration of cryoprotectant (1.5 M)	No. of oocytes	
	Examined	Cytolyzed (%)
DMSO	53	53 (100)
EG	12	12 (100)
Glycerol	15	15 (100)
DMFA	13	13 (100)

(22%)ものの、 0°C 冷却によるストレスは小さいものと思われる。実験2では、4種の耐凍剤を用いて卵子を -196°C まで凍結した。しかし、Table 35 に示すように、融解-培養後すべての卵子が死滅していた。

そこで、実験3では、凍結温度を -10°C まで引き上げ、さらに一部の卵子は採取後25~30時間培養することにより成熟分裂を誘起させたのち凍結し、耐凍性を比較した。その結

Table 36. Survival of bovine ovarian oocytes frozen to -10°C .

Treatment	Cryoprotective agent (1.5 M)	No. of oocytes examined	No. of oocytes at GV or degenerated (%)	No. (%) of oocytes at stage of		
				M1	An.1 Tel.1	M2
Control(unfrozen)	-	22	0 (0)	8(36)	0(0)	14(64)
Frozen just after collection 1)	DMSO	31	31 (100)	0(0)	0(0)	0(0)
Frozen after 25-30 hr culture 2)	DMSO	34	32 (94)	1(3)	0(0)	1(3)
	EEG	13	13 (100)	0(0)	0(0)	0(0)
	Glycerol	10	10 (100)	0(0)	0(0)	0(0)

1) Oocytes were frozen just after collection and cultured for 30 hr after thawing.

2) Oocytes were frozen after 25-30 hr culture and re-cultured for 4 hr after thawing.

果 (Table 36)、採取後ただちに -10°C まで凍結された卵子はすべてが死滅あるいは退行しており、正常な成熟分裂像は観察されなかった。また、あらかじめ培養したのち凍結した卵子においても、DMSO, EG および Glycerol のいずれの耐凍剤を用いた場合も、正常な成熟分裂像を示した卵子は皆無に近かった。

III 考察

ウシ受精卵では、 0°C までの冷却処理による抵抗性が卵子の発育段階によって異なり、8細胞期～24細胞期の初期桑実胚では冷却後の発育率が極めて低いのに対し、後期桑実胚から胚盤胞へと発育段階が進むに従って冷却後の発育率が高くなることが知られている^{114)~116)}。本実験でウシ卵細胞を 0°C まで冷却したのち培養した結果、無処理の対照区とほぼ等しい割合の卵子に正常な成熟分裂像がみられたことから、生存性の判定規準は異なるものの、GV期卵細胞の 0°C 冷却処理に対する抵抗性は

初期桑実胚に比べてむしろ高いものと思われる。Trounsonら(1976)¹¹⁵⁾は、受精卵を $0\sim 7.5^{\circ}\text{C}$ に冷却した場合、冷却速度が低下するに従って生存率が高まることを認めただが、本実験に用いた卵胞卵では、冷却速度による影響はみられなかった。

GV期の卵胞卵を -196 あるいは -10°C まで凍結することにより、すべての卵子が傷害を受け、GV期の卵胞卵の耐凍性は極めて低いといえる。すでにラット卵胞卵において、GV崩壊後に卵子の耐凍性が高まることを明らかにしたが、GV期の卵胞卵を培養して成熟分裂を誘起させたのちに -10°C まで凍結した結果、ほとんどすべての卵子の染色体は凝集した状態で、正常な分裂像を保った卵子はわずか2例であったことから、ウシ卵胞卵では、GV崩壊後、第1および第2成熟分裂中期まで成熟した卵子の耐凍性も極めて低いと推察される。

尾川・友田(1974)⁴⁷⁾は、ウシ卵胞卵を 1.25M-DMSO と共に -80°C まで凍結したのち融解した

結果、34%の卵子が形態的に正常であったと報告している。本実験においても、凍結後、形態的に正常と思われる卵子は数多く回収されたが、培養後、固定染色して観察した結果やはり傷害を受けており、尾川らが凍結した卵胞卵も傷害を受けていたことが推測される。

IV 摘要

ウシ卵胞卵を、0, -10 および -196°C まで冷却したのち体外培養をおこない、生存性をしらべた。得られた結果の概要は、以下の通りである。

1. 卵胞卵を 0°C に 60 分間冷却したのち培養した結果、冷却速度にかかわらず、対照区 (44%) とほぼ等しい割合の卵子が M2 まで成熟した。
2. -196°C に凍結された卵子は、耐凍剤の種類 (DMSO, EG, Glycerol, DMFA) に関係なくすべてが死滅した。
3. 卵胞卵を -10°C まで凍結したのち培養し

た結果、正常な分裂像は全く観察されなかつた。また、採卵後25~30時間培養したのち -10°C まで凍結した場合も、正常な分裂像を保った卵子は極めて少なかつた(2/55)。

4. 以上のことから、ウシ卵胞卵は、 0°C までの冷却には耐えうるが、耐凍性は極めて低いと思われる。

第3節 フタ卵胞卵の低温保存

フタ受精卵は、 10°C 以下まで冷却することにより死滅することが報告されている^{117), 118)}。一方、フタでは、精子の低温に対する感受性の高いことが知られているが、卵胞卵の低温に対する感受性をしらべること、卵子凍結条件の動物種および発育段階による特異性を知る上で興味深い。本実験では、フタ卵胞卵を種々の温度まで冷却したのち体外培養をおこない生存性をしらべた。

I 実験材料および方法

屠場で、体重約100 kgの未成熟雌フタより採取された卵巣を実験に供した。

実験1では、採卵までの2~3時間を $32\sim 35^{\circ}\text{C}$ の生理食塩水に浸して保存したのち、ウシ卵胞卵と同様の方法で卵胞卵を採取した。一部の卵子は対照区として培養したのち、残りは10~15個ずつ、0.1 mlのPBSを入れた試験

管に移して、緩慢 ($0.25 \sim 1.0^{\circ}\text{C}/\text{分}$) あるいは急速 ($40^{\circ}\text{C}/\text{分}$) に 0°C まで冷却した。緩慢冷却する試料の一部には、PBS に $10 \sim 20\%$ 卵黄を添加した保存液を用いた。 0°C 冷却区では、60 分間保ったのち室温にもどして胚を回収して培養し、一方、凍結区では、 0°C で 3.0M-DMSO を含む PBS 0.1 ml を添加し、 -5°C で植氷をおこない、毎分約 0.33°C の速度で -80°C まで冷却したのち -196°C の液体窒素中に保存した。室温空气中で融解 ($25^{\circ}\text{C}/\text{分}$) 後、 1.4 ml の PBS を 5 回に分けて添加したのち卵子を回収して培養した。

実験 2 では、卵巢を採取後ただちに、 35 、 25 、 15 あるいは 5°C の生理食塩水中に浸し、 $1 \sim 3$ 時間後に卵胞卵を採取して培養した。

培養液には修正 KRB 液を用い、 $31 \sim 34$ 時間培養後に酢酸 - エタノール ($1:3$) に $5 \sim 7$ 日間浸漬して固定したのち、酢酸オルセインで染色して成熟分裂像を観察した。

II 実験結果

実験 1 で、7"夕卵胞卵を 0 あるいは -196°C まで冷却したのを培養した結果を Table 37 に示した。無処理の対照区では、46% が正常な M1~M2 の成熟分裂像を示したが、 0°C 処理区では、冷却速度および卵黄添加にかかわらず大きな傷害を受け、正常な分裂像を示したものは極めて少なかった (M1: 1%, M2: 0%)。さらに、 -196°C まで凍結された卵子はすべてが死滅していた。

そこで、実験 2 では、卵子が傷害を受ける

Table 37. Survival of porcine ovarian oocytes cooled to 0°C and -196°C .

Treatment	Cooling rate ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	No. of oocytes examined	No. of oocytes at GV or degenerated (%)	No. of oocytes at stage of (%)		
				M1	An.1 Tel.1	M2
Control	-	140	76 (54)	25(18)	8(6)	31(22)
Cooled to 0°C	0.25-1.0	106	105 (99)	1(1)	0(0)	0(0)
	0.25-1.0*	17	17 (100)	0(0)	0(0)	0(0)
	40	49	48 (98)	1(2)	0(0)	0(0)
Frozen to -196°C		15	15 (100)	0(0)	0(0)	0(0)

* 10-20% egg yolk was added to the medium.

臨界温度をしらべるために、卵子を卵巣ごと35, 25, 15 および 5°C に保ったのち培養した結果 (Table 38)、正常な M1~M2 の分裂像を示した卵子の割合はそれぞれ 40, 15, 2 および 1% であり、フタ卵胞卵は 15°C までの冷却に耐えられないことが示された。

Table 38. Survival of porcine ovarian oocytes stored at various temperatures above 0°C.

Storage temperature (°C)	No. of oocytes examined	No. of oocytes at GV or degenerated (%)	No. of oocytes at stage of (%)		
			M1	An.1 Tel.1	M2
35	83	50 (60)	15(18)	2(3)	16(19)
25	115	98 (85)	9(8)	1(1)	7(6)
15	123	121 (98)	2(2)	0(0)	0(0)
5	100	99 (99)	1(1)	0(0)	0(0)

Ⅲ 考察

本実験の結果より、フタ卵胞卵は凍結に至るまでもなく、15°C 以下まで冷却することにより、ほとんどすべてが傷害を受けることが

示唆された。保存液中に、精子の寒冷衝撃を防止するために用いられる卵黄を添加しても効果はみられず、フタ卵胞卵の低温感受性はかなり強いものと思われる。Wilmut (1972)¹¹⁷⁾ および Polge, Wilmut & Rowson (1974)¹¹⁸⁾ は、8細胞期～胚盤胞期のフタ受精卵を 0°C まで冷却した結果、冷却速度にかかわらず死滅し、8細胞期胚では、 15°C と 10°C の間で傷害を受けることを報告している。これに対して、卵胞卵が傷害を受ける臨界温度はやや高く 25°C と 15°C の間と思われるが、 25°C 保存卵の生存率 (15%) が 35°C 区 (40%) に比べて低いことから保存温度の低下と共に生存率が徐々に低下することが推測される。現在のところ、低温による傷害のメカニズムは明らかにされていないが、Polge & Willadsen (1978)⁶⁷⁾ は、冷却されたフタ受精卵を電子顕微鏡下で観察した結果、細胞内脂肪小滴に大きな変化がみられたことから、膜を構成している脂質が変化することにより傷害を受ける可能性を示唆している。

フタ卵子の凍結保存は極めて困難であると思われるが、本実験の結果、卵子の耐凍性に種特異性があることが示されたことから、今後フタ受精卵の低温保存条件の検索に、卵胞卵は有効な材料になりうると思われる。

IV 摘要

本節では、フタ卵胞卵を種々の温度まで冷却したのち培養し、その後の生存性を比較した。得られた結果の概要は、以下の通りである。

1. フタ卵胞卵を 0°C まで冷却した場合、冷却速度および卵黄添加にかかわらず、ほとんどすべての卵子が傷害を受けた。
2. -196°C まで凍結された卵子は、すべてが死滅した。
3. 卵子を卵巣ごと、35, 25, 15 および 5°C に保存したのち培養した結果、正常な分裂像 (M1~M2) を示した卵子の割合はそれぞれ 40, 15, 2 および 1% であり、本実験の条件

下では、 75°C 以下の冷却に耐えられないことが明らかとなった。

第4節 小括

家畜の受精卵は数多く得ることは困難であるが、卵胞卵は、屠場で得られる卵巢より多数採取することが出来る。本章では、動物種および卵子の発育段階による低温感受性および耐凍性をしらべる目的で、ウシおよびフタ卵胞卵を種々の温度まで冷却したのち培養し、成熟分裂像を観察した。得られた結果の概要は、以下の通りである。

1. ウシ卵胞卵を 0°C まで冷却したのち培養した結果、M2まで成熟した卵子の割合は37~45%で、冷却速度に関係なく対照区(44%)とほぼ等しい値であったが、 -196°C まで凍結後は、耐凍剤の種類(DMSO, EG, Glycerol, DMFA)に関係なくすべての卵子が死滅した。
2. ウシ卵胞卵を -10°C まで凍結したのち培養した結果、正常な分裂像は全く観察されなかった。また、採卵後25~30時間培養し

たのうち -10°C まで凍結した場合も、正常な分裂像を保った卵子は極めて少なかった (2/55)。

3. フタ卵胞卵を 0°C まで冷却した結果、冷却速度および卵黄添加にかかわらず、ほとんどすべての卵子が傷害を受けた。

4. フタ卵胞卵を卵巣ごと、 $35, 25, 15$ および 5°C に保存したのち培養した結果、正常な分裂像を示した卵子の割合は、それぞれ $40, 15, 2$ および 1% であり、 15°C 以下の冷却に耐えられなかった。

第7章 総括

哺乳動物卵子の凍結保存に関する研究は、1972年、Whittinghamらがマウス胚を用いて再現性ある方法を報告したことによって始まったと言っても過言ではない。以来、現在までの短期間に、本分野の研究は急速な進展を見せ、いくつかの動物種において凍結卵子による産子が報告されたが、動物種および卵子の発育段階に応じた適切な保存法が確立されるまでには、多くの研究を必要とするであろう。本研究は、哺乳動物卵子の凍結保存法を確立し、さらに耐凍メカニズムを解明するための手がかりを得ることを目的として、種々の成熟段階にある実験動物卵子、および家畜卵胞卵を用い、種々の条件が凍結-融解された卵子の生存性に及ぼす影響について検討したものである。得られた結果の概要を以下に示した。

I マウス受精卵の凍結保存

1. 室温と 0°C 間の冷却および加温速度は、桑実胚の生存性に影響しなかった。
2. 桑実胚を 20 および 0°C に保存した結果、生存性は、前者の方がやや優れていた。
3. 1.5M の EG あるいは Glycerol を添加した PBS 中に保存された桑実胚は、無添加の PBS を用いた場合に近い生存性を示したのに対し、DMSO 添加区の生存率はやや急激に低下し、DMFA 添加区では極めて急激に低下した。このことから、マウス胚に対する EG および Glycerol の毒性は極めて低く、DMSO はいく分毒性をもち、DMFA は強力な毒性をもつと考えられる。
4. 胚の凍結の際には、 -4°C 程度の高い温度域において植氷操作をおこなうことが必要である。
5. 毎分 $0.25 \sim 1.0^{\circ}\text{C}$ の速度で $-10 \sim -75^{\circ}\text{C}$ まで凍結された桑実胚を緩慢融解した結果、生存率は -75°C まで低下しなかったが、毎分

- 5~10°Cの速度で凍結された場合は、温度の低下に従って生存率が低下した。
6. 種々の温度まで緩慢冷却(1°C/分)された桑奥胚を-75°Cまで急冷した結果、-50°C以下の温度から急冷した場合に高い生存率が得られた。このことから、-50°Cで脱水がほぼ完了しているものと思われる。
7. 毎分5°Cの速度で-50°Cまで冷却された桑奥胚をただちに-75°Cへ急冷した場合の生存率は4%であったが、-50°Cに30分以上保持したのち急冷した場合の生存率は59~73%まで高まった。これは、-50°Cに保持されている間に十分脱水されたためと思われる。
8. -25 および -50°Cにおける桑奥胚の保存可能期間は、それぞれ数時間および数日間であったのに対し、-75°Cでは90日間保存しても生存性は低下せず、ほぼ安定した保存性が認められた。-75°Cに90日間保存された胚をRecipientに移植後、生存産子が

得られた。

9. 凍結液中に種々の濃度の BSA あるいは卵黄を添加して桑実胚を -196°C まで凍結した結果、これらの添加は生存性に影響しなかった。
10. 緩慢凍結 ($0.33^{\circ}\text{C}/\text{分}$) された桑実胚を -196°C から -10°C まで急速融解させた場合は、緩慢融解区と同様の高い生存率が得られたが、 0°C 以上まで急速融解させることにより、生存率が低下した。
11. 植氷後、 -20°C アルコール、 -100°C 液体窒素ガス、および -196°C 液体窒素中に、10 分間隔で静置させることにより急速凍結された桑実胚は、急速融解 ($360^{\circ}\text{C}/\text{分}$)、やや高濃度の DMSO (2.0M) および適切な DMSO 除去方法を用いることにより高率に生存しうることが明らかとなった。最も高い生存率が得られたのは、胚を、2.0M-DMSO + 0.5M-sucrose を含む PBS および 0.5M-sucrose を含む PBS 中に順次移して DMSO を除去した場合で、

胚を recipient に移植後 15 匹 (38%) の産子が得られた。

II マウスおよびラット未受精卵の凍結保存

1. マウス未受精卵を用いて、耐凍剤の細胞内外への透過性を比較した結果、Glycerol の透過性は DMSO および EG に比べて非常に低く、DMFA の透過性は極めて高かった。また、 0°C では 30°C に比べて透過速度が遅かった。
2. 卵管から回収されたラット未受精卵を、 -196°C まで凍結後融解した結果、14~24% の卵子が形態的に正常であった。これらの卵子に体外授精し、5時間目に観察した場合は、侵入率 72%、そのうち正常な受精途上卵は 67% であったが、26時間目に観察した場合は、侵入率 93%、正常な分割卵はそのうち 31% であった。
3. GV 期のマウス卵細胞卵を -196°C まで凍結後融解した結果、形態的に正常な卵子の割合

は 9~39% で、受精卵に比べて低かった。これらの卵子を体外培養した結果、33% が M2 まで移行したが、体外受精後の侵入率は 6~28% であった。

4. GV 期のラット卵胞卵を -196°C まで凍結し、融解後、体外培養—体外授精した結果、DMSO を室温で添加し、室温~ 37°C で除去した場合に、生存率および精子侵入率ともに高い値が得られた。

5. HCG 注射後、3, 6.5 および 8.5 時間目に採取したラット卵胞卵を -196°C まで凍結した結果、6.5 時間目以降の卵子の生存率が高かったことから、GV 崩壊以降、耐凍性が高まるものと思われる。また、体外受精後の精子侵入率は、卵子の成熟が進むに従って高まった。さらに、凍結液あるいは DMSO 希釈液中に蔗糖を添加することにより、生存率、精子侵入率共にいく分高くなる傾向が認められた。

Ⅲ ハムスター受精卵の凍結保存

1. ハムスター8細胞期胚の培養液は、修正KRB液およびTCM199に比べて、修正Tyrode液がすぐれていた。さらに、浸透圧を170~220mosmolに低下させ、ピルビン酸濃度を1mMまで増加させた場合には、胚盤胞への発育率が増加したが、 Na^+/K^+ 比および Ca^{++} 濃度を変化させた場合には増加しなかった。
2. -196°C に凍結された8細胞期胚は、融解後も大部分が形態的に正常であったが、培養後の胚盤胞への発育率は、 0°C への冷却、耐凍剤の添加、さらに -196°C への凍結と、処理が進むに従って低下した。

Ⅳ 家畜卵胞卵の低温保存

1. ウシ卵胞卵を 0°C まで冷却したのち培養した結果、M2まで成熟した卵子の割合は、冷却速度に関係なく、対照区とほぼ等しい値であったことから、 0°C 冷却に対する抵抗性は高いものと思われる。しかし、 -10°C

まで凍結することにより大部分が傷害を受け、耐凍性は低かった。

2. フタ卵胞卵を 0°C まで冷却した結果、冷却速度および卵黄添加にかかわらず、ほとんどすべてが傷害を受けた。フタ卵巣を種々の温度に保存したのうち卵胞卵を培養した結果、フタ卵胞卵は、 15°C 以下の冷却に耐えられなかった。

謝 辞

稿を終るにあたり、終始暖かい御指導・御教示を賜わった恩師、京都大学教授入谷明博士に深甚の謝意を表す。

また、本実験の遂行上、常に有意義な助言と御指導をいただいた京都大学助教授丹羽皓二博士に深く感謝する。

さらに、一部の研究では有益な御指導を賜わった米国ウースター研究所 Chang 博士に深く感謝する。

加えて、京都大学家畜繁殖研究室の各位、特に三宅正史助手、小林俊隆君、早瀬隆昌君、吉野淳良君の4氏から絶大な協力をいただいたことに心からの謝意を表す。

なお、本研究は、農林水産省別枠研究の援助を得ておこなわれた。さらに、本研究の一部は、日本学術振興会からの援助を得ておこなわれた。ここに記して謝意を表する次第である。

引用文献

- 1) Polge, C., Smith, A.U. & Parkes, A.S. (1949) Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. *Nature* 164, 666.
- 2) Chang, M.C. (1947) Normal development of fertilized rabbit ova stored at low temperature for several days. *Nature* 159, 602-603.
- 3) Chang, M.C. (1948) The effect of low temperature on fertilized rabbit ova in vitro, and the normal development of ova kept at low temperature for several days. *J. Gen. Physiol.* 31, 385-415.
- 4) Chang, M.C. (1948) Transplantation of fertilized rabbit ova: the effect on viability of age, in vitro storage period, and storage temperature. *Nature* 161, 978-979.
- 5) Chang, M.C. (1948) Probability of normal development after transplantation of fertilized rabbit ova stored at different temperatures. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* 68, 680-683.
- 6) Chang, M.C. (1950) Transplantation of rabbit blastocysts at late stage: probability of normal development and viability at low temperature. *Science* 111, 544-545
- 7) Chang, M.C. (1952) Fertilizability of rabbit ova and the effects of temperature in vitro on their subsequent fertilization and activation in vivo. *J. Exp. Zool.* 121, 351-382.
- 8) Chang, M.C. (1953) Storage of fertilized rabbit ova: subsequent fertilization and the probability of normal development. *Nature* 172, 353-354.
- 9) Chang, M.C. (1954) Development of parthenogenetic rabbit blastocysts induced by low temperature storage of unfertilized ova. *J. Exp. Zool.* 125, 127-149.
- 10) Sherman, J.K. & Lin, T.P. (1959) Temperature shock and cold-storage of unfertilized mouse eggs. *Fert. Steril.* 10, 384-396.
- 11) Averill, R.L.W. & Rowson, L.E.A. (1959) Attempts at storage of sheep ova at low temperatures. *J. Agric. Sci.* 52, 392-395.
- 12) 丹羽太左衛門・杉江信・大沼秀男・堀江重久・相馬正・西川義正(1960) 山羊における受精卵の移植について. *家畜繁殖誌* 5, 151-152.
- 13) 大槻清彦・杉江信・大沼秀男・相馬正・堀江重久(1960) 山羊における上向性灌流による採卵と受精卵の移植について. *家畜繁殖誌* 6, 31-32.
- 14) Hafez, E.S.E. (1961) Storage of rabbit ova in gelled media at 10°C. *J. Reprod. Fert.* 2, 163-178.
- 15) Hafez, E.S.E. (1962) Effects of antibiotics on viability of fertilized rabbit ova in vitro. *Fert. Steril.* 13, 583-597.
- 16) Kardymowicz, O. (1962) Storage of fertilized rabbit ova. *Nature* 193, 486-487.

- 17) Hafez, E.S.E. (1963) Storage of fertilized ova. *Int. J. Fert.* 8, 459-466.
- 18) Harper, M.J.K. & Rowson, L.E.A. (1963) Attempted storage of sheep ova at 7° centigrade. *J. Reprod. Fert.* 6, 183-191.
- 19) Hancock, J.L. (1963) Survival in vitro of sheep eggs. *Anim. Prod.* 5, 237-243.
- 20) Kardymowicz, M., Kardymowicz, O., Kuhl, W. & Lada, A. (1963) Storage of fertilized sheep ova at low temperature. *Acta biol. cracov. Ser. Zool.* 6, 31-37.
- 21) Kardymowicz, M., Kardymowicz, O. & Grochowalski, K. (1964) The influence of the storage of sheep ova in various temperatures on their implantation. *Acta biol. cracov. Ser. Zool.* 7, 141-147.
- 22) Buttle, H.R.L. & Hancock, J.L. (1964) Birth of lambs after storage of sheep eggs in vitro. *J. Reprod. Fert.* 7, 417-418.
- 23) Hafez, E.S.E. (1965) Storage media for rabbit ova. *J. Appl. Physiol.* 20, 731-736.
- 24) Burks, J.L., Davis, M.E., Bakken, A.H. & Tomasovic, J.J. (1965) Morphologic evaluation of frozen rabbit and human ova. *Fert. Steril.* 16, 638-641.
- 25) Kardymowicz, M., Kardymowicz, O. & Grochowalski, K. (1966) A study on the effect of cooling of sheep ova to 10°C on their capability of further development. *Acta biol. cracov. Ser. Zool.* 9, 113-116.
- 26) Kardymowicz, M., Kardymowicz, O. & Kremer, M. (1966) Successful in vitro storage of sheep ova for 5 days. *Acta biol. cracov. Ser. Zool.* 9, 117-119.
- 27) Lin, T.P. (1968) Survival of pronuclear mouse eggs kept at different temperatures. *J. Exp. Zool.* 168, 501-510.
- 28) Whittingham, D.G. & Wales, R.G. (1969) Storage of two-cell mouse embryos in vitro. *Aust. J. Biol. Sci.* 22, 1065-1068.
- 29) Sreenan, J., Scanlon, P. & Gordon, I. (1970) Storage of fertilized cattle ova in vitro. *J. Agric. Sci., Camb.* 74, 593-594.
- 30) Whittingham, D.G., Leibo, S.P. & Mazur, P. (1972) Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C. *Science, N.Y.* 178, 411-414.
- 31) Polge, C. & Rowson, L.E.A. (1952) Fertilization capacity of bull spermatozoa after freezing at -79°C. *Nature* 169, 626.
- 32) Smith, A.U. (1952) Behaviour of fertilized rabbit eggs exposed to glycerol and to low temperatures. *Nature* 170, 374-375.
- 33) Ferdows, M., Moore, C.L. & Dracy, A.E. (1958) Survival of rabbit ova stored at -79°C. *J. Dairy Sci.* 41, 739 (Abstr.).
- 34) Sherman, J.K. & Lin, T.P. (1958) Survival of unfertilized mouse eggs during freezing and thawing. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* 98, 902-905.
- 35) Parrott, D.M.V. (1960) The fertility of mice with orthotopic ovarian grafts

- derived from frozen tissue. *J. Reprod. Fert.* 1, 230-241.
- 36) Sherman, J.K. (1963) Questionable protection by intracellular glycerol during freezing and thawing. *J. Cell. Comp. Physiol.* 61, 67-83.
 - 37) Whittingham, D.G. (1971) Survival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature, Lond.* 233, 125-126.
 - 38) Wilmut, 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, Part II, 1071-1079.
 - 39) Wilmut, I. & Rowson, L.E.A. (1973) Experiments on the low temperature preservation of cow embryos. *Vet. Res.* 92, 686-690.
 - 40) 宮本元・石橋武彦 (1976) 液体窒素(-196°C)に凍結されたマウスの8細胞期卵および桑実胚の生存性に影響をおよぼす要因. *日畜会報* 47, 23-28.
 - 41) Bank, H. & Maurer, R.R. (1973) Survival of frozen rabbit embryos. *Cryobiology* 10, 508(Abstr.).
 - 42) Whittingham, D.G. & Adams, C.E. (1974) Low temperature preservation of rabbit embryos. *Cryobiology* 11, 560 (Abstr.).
 - 43) Whittingham, D.G. & Whitten, W.K. (1974) Long-term storage and aerial transport of frozen mouse embryos. *J. Reprod. Fert.* 36, 433-435.
 - 44) Whittingham, D.G. (1974) The viability of frozen-thawed mouse blastocysts. *J. Reprod. Fert.* 37, 159-162.
 - 45) Leibo, S.P., Mazur, P., & Jackowski, S.C. (1974) Factors affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Exp. Cell Res.* 89, 79-88.
 - 46) 尾川昭三・佐藤嘉兵・橋本肇・根岸則武・宇賀昭二 (1973) ラット・マウスおよび家兔卵の凍結保存について. *日畜学会第62回大会要旨*, 47-48.
 - 47) 尾川昭三・友田仁 (1974) マウス, ラット, 家兔胚および牛卵胞卵の凍結保存(-80°C)について. *明治大農研究報告* 32, 27-33.
 - 48) 内海恭三・湯原正高 (1974) ラット受精卵の凍結保存に関する研究 とくにドライアイスアルコールによる凍結保存について. *岡山大農学報* 44, 24-27.
 - 49) 内海恭三・湯原正高 (1975) ラットの移植凍結受精卵の分娩と出生後の発育について. *日不妊誌*, 20, 170.
 - 50) 内海恭三・湯原正高・西村和彦 (1976) LN₂長期保存ラットの生存性と、発育後の学習能力について. *日不妊誌* 21, 109.
 - 51) 竹島勉・早坂伴通・大滝洋嗣・尾川昭三 (1976) ラット受精卵の凍結保存に関する研究 時に保存後の胚の培養発達について. *第65回日畜学会大会要旨*, 28.
 - 52) Whittingham, D.G. (1975) Survival of rat embryos after freezing and thawing. *J. Reprod. Fert.* 43, 575-578.
 - 53) Willadsen, S.M., Polge, C., Rowson, L.E.A. & Moor, R.M. (1976) Deep freezing

- of sheep embryos *J. Reprod. Fert.* 46, 151-154.
- 54) Bilton, R.J. & Moore, N.W. (1976) In vitro culture, storage and transfer of goat embryos. *Aust. J. Biol. Sci.* 29, 125-129.
 - 55) Tsunoda, Y., Parkening, T.A. & Chang, M.C. (1976) In vitro fertilization of mouse and hamster eggs after freezing and thawing. *Experientia* 32, 223-224.
 - 56) Parkening, T.A., Tsunoda, Y. & Chang, M.C. (1976) Effects of various low temperatures, cryoprotective agents and cooling rates on the survival, fertilizability and development of frozen-thawed mouse eggs. *J. Exp. Zool.* 369-374.
 - 57) 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.
 - 58) Willadsen, S., Trounson, A.O., Polge, C., Rowson, L.E.A. & Newcomb, R. (1976) Low temperature preservation of cow eggs. In "Egg transfer in cattle" (Rowson, L.E.A., ed.), pp. 117-124, Commission of the European Communities, Luxembourg.
 - 59) Bilton, R.J. & Moore, N.W. (1977) Successful transport of frozen cattle embryos from New Zealand to Australia. *J. Reprod. Fert.* 50, 363-364.
 - 60) Willadsen, S., Polge, C. & Rowson, L.E.A. (1978) The viability of deep-frozen cow embryos. *J. Reprod. Fert.* 52, 391-393.
 - 61) Miyamoto, H. & Ishibashi, T. (1977) Survival of frozen-thawed mouse and rat embryos in the presence of ethylene glycol. *J. Reprod. Fert.* 50, 373-375.
 - 62) Miyamoto, H. & Ishibashi, T. (1978) The protective action of glycols against freezing damage of mouse and rat embryos. *J. Reprod. Fert.* 54, 427-432.
 - 63) 尾川昭三・井上恭一・友田 仁 (1977) マウス胚の凍結保存における *N,N*-Dimethyl-formamide の凍害保護効果について. 第 67 回 日畜学会大会要旨, 25.
 - 64) Whittingham, D.G. (1977) Re-establishment of breeding stocks of mutant and inbred strains of mice from embryos stored at -196°C for prolonged periods. *Genet. Res. Camb.* 30, 287-299.
 - 65) Whittingham, D.G. (1977) Long-term storage of mouse embryos at -196°C : the effect of background radiation. *Genet. Res. Camb.* 29, 171-181.
 - 66) Willadsen, S.M. (1977) Factors affecting the survival of sheep embryos during deep-freezing and thawing. In "The freezing of mammalian embryos" (Ciba Fndn Symp. No. 52 (new series)), pp. 175-189. Eds. K. Elliott & J. Whelan. Elsevier/North Holland, Amsterdam.
 - 67) Polge, C. & Willadsen, S.M. (1978) Freezing eggs and embryos of farm animal. *Cryobiology* 15, 370-373.
 - 68) Whittingham, D.G., Wood, M., Farrant, J., Lee, H. & Halsey, J.A. (1979) Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from -196°C . *J. Reprod. Fert.* 56, 11-21.

- 69) 菅原 七郎 (1972) 哺乳動物卵子の保存. 細胞 4(3), 22-31.
- 70) 菅原 七郎 (1976) 哺乳動物の卵子(17) 卵子の保存. 畜産の研究 30, 797-802.
- 71) Whittingham, D.G. (1973) Bibliography on low temperature storage of mammalian embryos. *Bibliograph. Reprod.* 21, 372-376, 501-504.
- 72) Whittingham, D.G. (1974) Embryo banks in the future of developmental genetics. *Genetics* 78, 395-402.
- 73) Whittingham, D.G. (1975) Fertilization, early development and storage of mammalian ova in vitro. In "The early development of mammals" (*Brit. Soc. Devel. Biol. Symp.* 2), pp. 1-24. Eds M. Ball & A.E. Wild. Camb. Univ. Press, London.
- 74) Whittingham, D.G. (1976) General aspects of egg culture and preservation. In "Egg transfer in cattle" (Rowson, L.E.A., ed.), pp. 101-113, Commission of the European Communities, Luxembourg.
- 75) Whittingham, D.G. (1977) Low temperature storage of mammalian embryos. *Bibliograph. Reprod.* 30, 265-268, 341-342.
- 76) Whittingham, D.G. (1978) Freezing embryos of laboratory species. *Cryobiology* 15, 367-369.
- 77) Maurer, R.R. (1976) Storage of mammalian oocytes and embryos: a review. *Can. J. Anim. Sci.* 56, 131-145.
- 78) Wilmut, I. (1976) Potential applications of techniques for embryo storage. In "Egg transfer in cattle" (Rowson, L.E.A., ed.), pp. 129-136. Commission of the European Communities, Luxembourg.
- 79) Moore, N.W. & Bilton, R.J. (1977) Frozen storage of embryos of farm animals: progress and implications. In "The freezing of mammalian embryos" (*Ciba Fndn Symp. No.52 (new series)*), pp. 203-211. Eds K. Elliott & J. Whelan. Elsevier/North Holland, Amsterdam.
- 80) Polge, C. (1977) The freezing of mammalian embryos: perspectives and possibilities. In "The freezing of mammalian embryos" (*Ciba Fndn Symp. No.52 (new series)*), pp. 3-13. Eds K. Elliott & J. Whelan. Elsevier/North Holland, Amsterdam.
- 81) 尾川 昭三 (1977) 哺乳動物卵および胚の凍結保存. 産婦人科の世界 29, 425-430.
- 82) 尾川 昭三 (1978) 哺乳動物卵および胚の凍結保存. 「家畜繁殖学-最近の歩み」: 173-188.
- 83) 尾川 昭三 (1978) 哺乳動物受精卵の保存に関する研究の紹介と展望. 家畜繁殖誌, 24(5), vii-xiii.
- 84) 尾川 昭三 (1978) ラット, マウスの人工授精および哺乳動物胚の凍結保存について. *Exp. Anim.* 27, 110-123.
- 85) 宮本 元 (1978) 実験小動物の受精卵凍結保存の現状. 家畜繁殖誌, 24(5), xiv-xxi.

- 86) 角田幸生・相馬正・杉江信(1978) 家畜受精卵凍結保存の現状. 家畜繁殖誌 24(5), xxii—xxix.
- 87) Dulbecco, R. & Vogt, M. (1954) Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. Exp. Med.* 99, 167.
- 88) Cross, P.C. & Brinster, R.L. (1970) In vitro development of mouse oocytes. *Biol. Reprod.* 3, 298-307.
- 89) Bank, H. & Maurer, R.R. (1974) Survival of frozen rabbit embryos. *Exp. Cell Res.* 89, 188-196.
- 90) Maurer, R.R. & Haseman, J.K. (1976) Freezing morula stage rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 14, 256-263.
- 91) Whittingham, D.G. & Adams, C.E. (1976) Low temperature preservation of rabbit embryos. *J. Reprod. Fert.* 47, 269-274.
- 92) Tsunoda, Y. & Sugie, T. (1977) Survival of rabbit eggs preserved in plastic straws in liquid nitrogen. *J. Reprod. Fert.* 49, 173-174.
- 93) Whittingham, D.G. (1977) Some factors affecting embryo storage in laboratory animals. In "The freezing of mammalian embryos" (Ciba Fndn Symp. No.52 (new series)), pp. 97-108. Eds K. Elliott & J. Whelan. Elsevier/North Holland, Amsterdam.
- 94) 尾川昭三・友田仁・薄井幸三(1975) 哺乳動物胚の凍結保存に関する研究: 異なる凍結処理のマウス, ラットおよび家兔胚の形態におよぼす影響について. 第64回日畜学会大会要旨, 27.
- 95) 内海恭三・沖増英治・湯原正高(1976) ラット受精卵の凍結保存に関する研究, とくに凍結過程における氷晶形成と生存性について. 岡山大学農学報 47, 59-66.
- 96) Mazur, P. (1970) Cryobiology: The freezing of biological system. Science, Wash. D.C. 168, 939-949.
- 97) Leibo, S.P. (1976) Nucleation temperatures of intracellular ice formation in mouse ova. *Cryobiology* 13, 646 (Abstr.).
- 98) Leibo, S.P. (1977) Fundamental cryobiology of mouse ova and embryos. In "The freezing of mammalian embryos" (Ciba Fndn Symp. No.52 (new series)), pp. 69-92. Eds K. Elliott & J. Whelan. Elsevier/North Holland, Amsterdam.
- 99) 宮本元・石橋武彦(1976) 急速冷却後および長期凍結保存後のマウス胚の生存性. 日畜会報 47, 29-32.
- 100) Maurer, R.R., Bank, H. & Staples, R.E. (1977) Pre- and postnatal development of mouse embryos after storage for different periods at cryogenic temperatures. *Biol. Reprod.* 16, 139-146.
- 101) 宮本元・勝浦五郎・石橋武彦(1976) ドライアイス・アルコールで-79°Cに凍結保存されたマウス胚の生存性. 日畜会報 47, 580-587.
- 102) Tsunoda, Y. & Sugie, T. (1977) Effect of the freezing medium on the survival of rabbit eggs after deep freezing. *J. Reprod. Fert.* 50, 123-124.

- 103) Fiser, P.S. & Macpherson, J.W. (1977) Survival of mouse embryos after freezing in medium containing dimethylsulphoxide and yolk extract. *J. Dairy Sci.* 60, 1301-1303.
- 104) Rapatz, G. & Luyet, B. (1973) The cryopreservation of blood by the method of two-step freezing. *Biodynamica* 11, 169-179.
- 105) McGann, L.E. & Farrant, J. (1976) Survival of tissue culture cells frozen by a two-step procedure to -196°C . I. Holding temperature and time. *Cryobiology* 13, 261-268.
- 106) Mazur, P. (1977) Slow-freezing injury in mammalian cells. In "The freezing of mammalian embryos" (Ciba Fndn Symp. No.52(new series)), pp. 19-42. Eds K.Elliott & J. Whelan. Elsevier/North Holland, Amsterdam.
- 107) Parkening, T.A. & Chang, M.C. (1977) Effects of cooling rates and maturity of the animal on the recovery and fertilization of frozen-thawed rodent eggs. *Biol. Reprod.* 17, 527-531.
- 108) Niwa, K., Miyake, M., Iritani, A., & Nishikawa, Y. (1976) Fertilization of rat oocytes cultured in vitro from various stages of maturation. *J. Reprod. Fert.* 47, 105-106.
- 109) Niwa, K. & Chang, M.C. (1975) Fertilization of rat eggs in vitro at various times before and after ovulation with special reference to fertilization of ovarian oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fert.* 43, 435-451.
- 110) Luyet, B.J. (1965) Attempt at correlating some of the extant data on low-temperature preservation of various cells. *Fed. Proc.* 24, S-315-322.
- 111) 角田幸生・相馬正・杉江信・Chang, M.C. (1979) ハムスター受精卵の凍結保存の試み. 第20回哺乳動物卵子談話会: 15-18.
- 112) Whittingham, D.G. (1971) Culture of mouse ova. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 14, 7-21.
- 113) 橋詰良一・伊藤雅夫・石島芳郎・後藤信男 (1979) ハムスター8 cell 卵子の体外培養に及ぼす浸透圧の影響. 第69回日産学会大会要旨: 54.
- 114) Wilmut, I., Polge, C. & Rowson, L.E.A. (1975) The effect on cow embryos of cooling to 20, 0 and -196°C . *J. Reprod. Fert.* 45, 409-411.
- 115) Trounson, A.O., Willadsen, S.M., Rowson, L.E.A., & Newcomb, R. (1976) The storage of cow eggs at room temperature and at low temperatures. *J. Reprod. Fert.* 46, 173-178.
- 116) Trounson, A.O., Willadsen, S.M. & Rowson, L.E.A. (1976) The influence of in-vitro culture and cooling on the survival and development of cow embryos. *J. Reprod. Fert.* 47, 367-370.
- 117) Wilmut, I. (1972) The low temperature preservation of mammalian embryos. *J. Reprod. Fert.* 31, 513-514.
- 118) Polge, C., Wilmut, I. & Rowson, L.E.A. (1974) The low temperature preservation of cow, sheep and pig embryos.

STUDIES ON FREEZE-PRESERVATION OF MAMMALIAN EGGS

Magosaburo KASAI

Summary

Since the successful storage of mouse embryos at -196°C was first reported by Whittingham et.al. in 1972, studies on deep freezing embryos have been accumulated and live offsprings have been obtained from embryos stored at -196°C in the rabbit, rat, goat, sheep and cow. But further study would be necessary for the establishment of optimum procedures for freezing embryos of different species.

Present study was carried out to examine the effect of various cryobiological factors such as cooling rate, final temperature to which the egg was frozen, warming rate and medium on the survival of mouse, rat, hamster, cow and pig eggs. Results obtained are summarized as follows.

I. Freeze-preservation of mouse morula embryos

- 1) Cooling and warming rates between room temperature and 0°C had no significant effects on the survival of embryos.
- 2) Embryos preserved at 20°C survived for slightly longer period than those preserved at 0°C .
- 3) Embryos were stored at 20 and 0°C in the presence of various cryoprotective agents. Ethylene glycol(EG) and glycerol had little, dimethyl sulphoxide (DMSO) had some and N,N-dimethyl formamide(DMFA) had large toxic effect to the embryos.
- 4) When embryos were frozen to -20°C , higher survival was obtained if suspending medium was seeded at high temperature such as -4°C .
- 5) Embryos were frozen to the different temperatures ranging -10 - -75°C at various cooling rates and warmed slowly ($25^{\circ}\text{C}/\text{min}$). When embryos were frozen slowly at the rate of 0.25 - $1.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$, survival rate did not decline up to

- 75°C. On the contrary, when embryos were frozen rapidly at the rate of 5-10°C/min, the survival rate decreased as the freezing temperature declined.
- 6) When embryos were cooled rapidly to -75°C from temperatures ranging from -10 to -40°C after slow cooling (1°C/min), the survival rate was quite low. On the contrary, when they were cooled rapidly to -75°C from -50°C or below after slow cooling, a higher survival rate was obtained, indicating that embryos had been dehydrated almost completely after slow cooling to -50°C.
 - 7) When embryos which had been cooled rapidly to -50°C at 5°C/min were immediately plunged into -75°C ethanol, the survival rate was only 4%, however, when they were kept at -50°C for 30 min or more before rapid cooling, the rate was increased to 59-73%, indicating that dehydration from embryos was well achieved during 30 min at -50°C.
 - 8) Embryos could be preserved for a few hours at -25°C, a few days at -50°C and for at least 3 months at -75°C.
 - 9) Bovine serum albumin (0-30mg/ml) and egg yolk (5-20%) supplemented to the freezing medium had no significant effect on the survival of embryos frozen to -196°C.
 - 10) When embryos which had been cooled slowly (0.33°C/min) were warmed rapidly from -196°C to -10°C, survival was comparable to that obtained when they were warmed slowly (25°C/min) to room temperature. However, when embryos were thawed rapidly to 0°C or above, the survival rate decreased significantly.
 - 11) Embryos were frozen rapidly to -196°C by three-step procedure; the seeded samples were transferred to -20°C ethanol, -100°C liquid nitrogen gas and -196°C liquid nitrogen at 10 min intervals. The highest survival was obtained when embryos frozen in the presence of 2.0M-DMSO were thawed rapidly (360°C/min) and DMSO was removed by suspending the thawed embryos in turn

into the PBS containing 2.0M-DMSO + 0.5M-sucrose and then PBS containing 0.5M-sucrose at room temperature. Fifteen normal young were obtained after transferring the frozen-thawed embryos to 3 recipients.

II Freeze-preservation of unfertilized mouse and rat oocytes

- 1) Permeability of several cryoprotective agents to and from mouse unfertilized tubal oocytes was examined. Permeability of glycerol was quite low and that of DMFA was extremely high, and medium permeability was observed in DMSO and EG. DMSO, EG and glycerol were more permeable at 30⁰C than at 0⁰C.
- 2) Unfertilized rat tubal oocytes were frozen to -196⁰C. After thawing, 14-24% of the oocytes were morphologically normal. When the normal eggs were inseminated in vitro, 72-93% of the oocytes were penetrated 5-26 hr after insemination. At 5 hr after insemination, 67% of the penetrated eggs were undergoing normal fertilization. However, the proportion of eggs cleaved to the 2-cell stage was only 31% when examined 26 hr after insemination.
- 3) Mouse follicular oocytes at germinal vesicle stage were frozen to -196⁰C. After thawing, 9-35% were morphologically normal. When the normal eggs were cultured, 33% of them were matured to the second methaphase, and 6-28% of the matured oocytes were penetrated by insemination in vitro.
- 4) Rat ovarian oocytes at germinal vesicle stage were frozen to -196⁰C. After thawing, they were cultured and inseminated in vitro. High proportion of the oocytes were normal and penetrated when addition and removal of DMSO was made at room temperature or 37⁰C.
- 5) Rat ovarian oocytes recovered 3, 6.5 and 8.5 hr after an injection of HCG were frozen to -196⁰C. The proportion of morphologically normal oocytes after thawing were higher when they were recovered 6.5 and 8.5 hr than 3 hr after HCG. With the increasing time of oocyte collection after HCG, the

proportions of penetrated oocytes after insemination were progressively increased.

III Freeze-preservation of hamster 8-cell embryos.

- 1) Embryos were cultured for 16 hr in various media. Low proportion of embryos cultured in modified Tyrode solution developed to blastocysts, however, no development was obtained in TCM 199 and modified Krebs-Ringer Bicarbonate solution. When osmolarity of modified Tyrode solution was lowered to 170-220 mosmol and pyruvate was increased to 1.0 mM, higher proportions of embryos developed to blastocysts. On the contrary, changing Na^+/K^+ ratio and Ca^{++} concentration of medium was not effective for the development of embryos.
- 2) When embryos were frozen to -196°C , most of the embryos were morphologically normal (67-100%), but the development to blastocyst in culture were quite low (0-18%). The proportion of embryos developed to blastocyst decreased as the process of freezing advanced, cooling to 0°C , addition of cryoprotective agent and freezing to -196°C .

IV Low-temperature preservation of bovine and porcine ovarian oocytes.

- 1) When bovine ovarian oocytes were cooled to 0°C and then cultured in vitro, high proportion of oocytes matured to the 2nd metaphase independently of the cooling rate. On the contrary, when they were frozen to -10°C or below, almost all the oocytes were injured.
- 2) When porcine ovarian oocytes were cooled to 0°C , almost all the oocytes were injured independently of the cooling rate. When porcine ovarian oocytes were collected from the ovaries which had been stored at 35, 25, 15 and 5°C , the respective proportion of oocytes with normal chromosomal maturation were

40, 15, 2 and 1%, indicating that porcine ovarian oocytes would be injured at below 15°C.