

Vitrification 法で凍結融解されたマウス胚における胚の生存性に対する sucrose 希釈の効果

松本徹郎*・石渡 学**・山井淳子**・山川宏人*
近藤ゆり*・川手秀一*・尾川昭三**

Effect of sucrose dilution on survival of mouse early embryos after being frozen-thawed by vitrification method.

Tetsuro MATSUMOTO, Manabu ISHIWATA, Junko YAMANOI,
Hirohito YAMAKAWA, Yuri KONDO, Shuichi KAWATE and
Shyozo OGAWA

(要 旨)

マウスの8細胞期～胚盤胞期の胚をV S液(Rall and Fahy, 1985)を用いてVitrification法で凍結した。そして、融解後の sucrose 2段階希釈の胚生存性に及ぼす効果を調べた。

8細胞期胚では、希釈法に関係なく良好な生存胚が得られたのにもかかわらず、桑実期胚から胚盤胞期胚では、sucrose 2段階希釈で得られた胚の発育率は、V S 3段階希釈に比し、高い傾向にあることが認められた。また、胚の発育ステージが進むほど、sucrose 希釈の効果が大いことがうかがわれた。

桑実期胚の sucrose 希釈胚 29 個の移植によって 11 匹の産子が得られた。

ま え が き

Rall and Fahy¹⁾は、マウス8細胞期胚をVitrification法(ガラス化超急速凍結法)で凍結し、高い生存率を得た。また、Hsuら²⁾は、このVitrification法によって、1細胞期から胚盤胞期のマウス胚を凍結した結果、生存胚を得、融解初期胚14個の移植試験によって、4匹の産子を得たことを報告した。

これらの方法では、融解後の凍害保護物質の除去には、段階的手法が用いられている。しかしながら、このVitrification法では、種々の凍害保護物質を高濃度に含む液を用いていることから、融解後の胚は収縮して、かつ浮遊した状態が多く、顕微鏡でも検索が困難であり、この点での改良が必要と考えられた。

Kasaiら³⁾は、マウス胚の凍結保存において、融解後、sucrose液を利用した簡易な凍害保護物質除去法が有効であることを報告した。また、野外で凍結受精卵移植技術が実用化されつつあるウシ胚では、このsucrose液を

利用した1段階ストロー法⁴⁻⁶⁾の開発により、特別な熟練を必要とせずに、凍害保護物質の除去を行うことを可能にしている。

そこで、我々は、Vitrification法で凍結されたマウス初期胚について、凍害保護物質除去の簡易化を目的として、融解後、sucrose液による2段階希釈を行い、得られた生存胚の移植により、産子が得られたので報告する。

材料と方法

(1) 供試胚

7～16週令のICR系マウス26匹に、5IUのPMSGおよびhCGそれぞれを、48時間間隔で腹腔内投与し、同系の雄と交配させた。hCG投与の64～68、72～76、および96～100時間後に8細胞期胚を卵管から、桑実期胚および胚盤胞期胚を子宮角の灌流により採取し、凍結実験に供した。灌流液には、1%子ウシ血清を含むDulbecco's PBS (PBS+1%CS)を用いた。

* 東京都畜産試験場 東京都青梅市新町715 (〒198)

** 明治大学農学部 神奈川県川崎市多摩区東三田1-1-1 (〒214)

(2) 凍害保護物質

Vitrification 法による凍結では、高濃度凍害保護物質含有の保存液 (Vitrification Solution: VS) が必要である。本研究では、Rall and Fahy¹⁾の液 (VS液) を用いた (表1)。

(3) VSへの胚の浸漬

VSは、0.4%のウシ血清アルブミンを添加した修正 Dulbecco's PBS (m-PBS) を加えることにより希釈され、25% VSと50% VSが用意された。

供試胚は、m-PBSで2度洗浄された後、次のa)およびb)の2通りのVS浸漬処置に移された。; a)供試胚は、25% VSに15分間 (20℃) 浸漬し、凍害保護物質の十分な細胞内への浸透をするようにした。次いで、50% VSに10分間 (0~4℃) 浸漬させ、高濃度溶液による脱水を企図した (VS浸漬手順1)。b)供試胚は、25% VSに5分間 (20℃)、次いで50% VSに2分間 (0~4℃) 浸漬された (VS浸漬手順2)。

(4) ストローへの胚の封入および凍結法

VS浸漬手順を経た胚は、100% VS中 (0~4℃) に移され、直ちに、そのVSと共に、0.25mlの牛人工受精用プラスチックストローに吸引、封入された。ストローには、図1に示すように、30~35mmの液 (I層)、4~8mmの空気層、20mmの液 (II層)、4~8mmの空気層、ならびに30~35mmの液 (III層) の順になるように充填された。胚 (3~5個) を含むVSは、II層に位置するようにした。全液層がVSからなるもの (図1-A) と、I層とIII層が0.3M-sucrose液 (in m-PBS) で、II層目がVSのもの (図1-B) 2種類について凍結保存実験を行った。これらのストロー封入は、VS浸漬手順1の経過胚では、VSに浸漬後10分以内に、また、VS浸漬手順2を経た胚は2分以内に行われ、直ちに凍結過程に移された。

凍結は、ストロー開口部を封じない状態のまま、綿栓部を下にして、キャニスター (0~4℃) の中に入れ、直接液体窒素中 (-196℃) に浸漬することにより行われた (2500℃/minの急速凍結)。

(5) 融解法

液体窒素中に半日~14日間保存されたストローは、液体窒素中からとりだし、0℃冷水中に直接浸漬して融解した。

(6) 凍害保護物質の除去

凍害保護物質の除去は、ストロー封入の際に全液層がVSのものには、VS濃度を段階的に低くしていく方法 (VS 3段階希釈; 図1-A) が採用され、0.3M-sucrose液が存在するストローは、sucroseによる2段階希釈 (図1-B) が採用された。

VS 3段階希釈は、VSへの胚の浸漬手順に費やした時間に応じて、2通りの方法で行った。すなわち、VS浸漬手順1を経て凍結された胚はRall and Fahy¹⁾の方法に従い、融解後ストローから直接50% VS中にとり出さ

表1 VS液の組成

成分*	濃 度	
	(%W/V)	(mol/l)
DMSO	20.0	2.62
ノセトアミド	15.5	2.62
プロピレン グリコール	10.0	1.32
ポリエチレン グリコール (PEG 6000)	6.0	0.008
計		6.6

* in modified Dulbecco's PBS

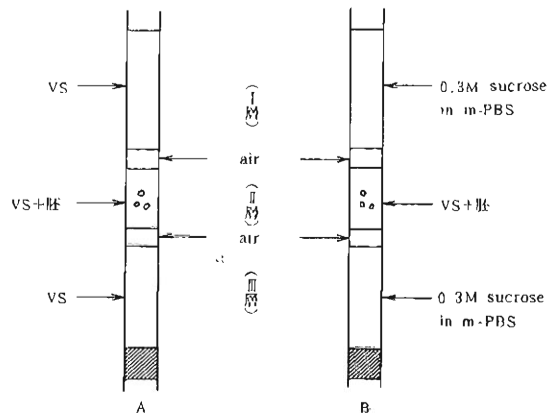


図1 ストロー封入法

れ、10分間 (0~4℃) 静置された。次いで25% VSに10分間 (0~4℃) 浸漬した後、再び20℃まであたためられ、m-PBSで2度洗浄することにより、凍害保護物質の除去を行った (VS 3段階希釈-1)。また、VS浸漬手順2を経て凍結された胚は、ストローから直接50% VS中にとり出され、2分間 (0~4℃) 静置された。次いで25% VSに2分間 (0~4℃) 浸漬した後、再び20℃まであたためられ、m-PBSで2度洗浄することにより、凍害保護物質の除去を行った (VS 3段階希釈-2)。

一方、sucrose 2段階希釈は、室温下で、ストローの内容 (I II III層) を1度に時計皿にとり出すことによって行われた。この時、0.3M-sucrose液と、少量のVSとが混合されるため、胚とVSはsucroseにより希釈される。そのまま2~3分間保持した後、m-PBSで2度洗浄した。

(7) 胚の培養および移植

凍害保護物質除去を終えた胚は、Whittinghamの標準培養液⁷⁾で、36.5~37℃、CO₂ 5%、湿度飽和条件下で培養した。8細胞期胚および桑実期胚は48時間、そして胚盤胞期胚は24時間後に、拡大胚盤胞に発育したものを、発育能を有する胚として記録した。

VS液で凍結された桑実期胚のうち、融解後 sucrose 2段階希釈を経て、培養により拡大胚盤胞まで発育したものの29個を移植試験に供した。この移植には、精管結紮雄マウスと交配した偽妊娠4日目の胚受容雌マウス（ICR系）を2匹用いた。この内訳は、VS浸漬手順1を経た胚の中の16個を1匹に、VS浸漬手順2を経た胚の中の13個をもう1匹に移植した（各子宮角当たり6~8個の胚を移植）。

なお、VS 3段階希釈群、sucrose 2段階希釈群間、および、VS浸漬手順1群、VS浸漬手順2群間における融解後の培養による胚の発育率については χ^2 -検定により、有意差を検定した。

結 果

VS液を用いたVitrification法で凍結されたマウス胚の、融解後の、回収胚数、発育率を、表2に一括して示す。

8細胞期胚では、VS 3段階希釈、sucrose 2段階希釈のいずれにおいても、80~90%の発育率が得られた。

桑実期胚では、sucrose 2段階希釈を行った胚の発育率は、VS浸漬手順1において94.7%（18/19）、そして、VS浸漬手順2において88.9%（16/18）であった。2匹の胚受容雌は共に妊娠が成立し、それぞれ、5匹、6匹の産子が得られた。一方、VS 3段階希釈を行った胚の発育率は、VS浸漬手順1において、33.3%（6/18）、そして、VS浸漬手順2において31.6%（6/19）であった。このように、sucrose 2段階希釈による胚の発育率は、VS 3段階希釈による胚の発育率よりも有意に高かった（ $P < 0.01$ ）。

胚盤胞期胚では、VS浸漬手順1を経て sucrose 2段階

表2 Vitrification法で凍結されたマウス胚の生存性

胚の ステージ	VS 浸漬手順	供 試 例 数	供 試 胚 数	回 収 胚 数	希 釈 方 法	発育 胚数（%/回収胚） ^{****}
8 細 胞 期	1	5	20	19	VS 3段階-1 [*]	17(89)
	1	5	20	18	sucrose 2段階 ^{**}	15(83)
	2	5	20	19	VS 3段階-2 ^{***}	17(89)
	2	5	20	20	sucrose 2段階	18(90)
桑 実 期	1	5	20	18	VS 3段階-1	6(33)a
	1	5	20	19	sucrose 2段階	18(95)b
	2	5	20	19	VS 3段階-2	6(32)c
	2	5	20	18	sucrose 2段階	16(89)d
胚 盤 胞 期	1	5	20	18	VS 3段階-1	0(0)e
	1	5	20	20	sucrose 2段階	1(5)f
	2	5	20	20	VS 3段階-2	5(25)g
	2	5	20	20	sucrose 2段階	12(60)h

VS浸漬手順1：25% VS液に15分間（20℃）、50% VS液に10分間（0-4℃）の後、100% VS液に10分間（0-4℃）浸漬。

VS浸漬手順2：25% VS液に5分間（20℃）、50% VS液に2分間（0-4℃）の後、100% VS液に2分間（0-4℃）浸漬。

* 0℃融解の後、50% VS液に10分間（0-4℃）、25% VS液に10分間浸漬する。次いで20℃まで暖め、m-PBSで2度洗浄。

** 0℃融解の後、0.3M-sucrose液で希釈し2-3分間保持（20℃）。次いでm-PBSで2度洗浄。

*** 0℃融解の後、50% VS液に2分間（0-4℃）、25% VS液に2分間浸漬する。次いで20℃まで暖め、m-PBSで2度洗浄。

**** 拡大胚盤胞まで発育したものを。

a, b ($P < 0.01$) c, d ($P < 0.01$) f, h ($P < 0.01$) g, h ($P < 0.05$) e, g ($P < 0.05$)

希釈を行った胚20個のうち、1個のみに発育胚が認められた。しかしながらVS浸漬手順2では、sucrose 2段階希釈胚の60% (12/20)が、そして、VS3段階希釈胚の25% (5/20)がそれぞれ発育した。VS浸漬手順2におけるsucrose 2段階希釈胚とVS3段階希釈胚の間の発育率の差は有意であった ($P < 0.05$)。

考 察

Fahyら⁸⁾は、Vitrification法においては、細胞が生存し得るためには、凍結時の細胞内外の氷晶形成を防ぐことが必要であり、このためには高濃度の凍害保護物質が必要であると述べた。彼らは、この方法では、特定の高浸透圧のVS液中で、細胞が、脱水収縮された状態で凍結することが必須条件であると述べている。

しかしながら、本研究では胚盤胞期胚の凍結で、VS浸漬時間の比較的短いVS浸漬手順2を経た胚のほうが、VS浸漬手順1を経た胚よりも、融解後の発育率が高い傾向を示した(表2)。胚盤胞期胚の凍結では、栄養膜細胞が、VS浸漬の際に、高浸透圧による強度の脱水のために収縮し、融解後、希釈の過程を経た後もなお、収縮しているのが観察された(図3)。

Hsuら²⁾は、Vitrification法によるマウス胚の凍結保存の結果、8細胞期胚の生存率に比べ、桑実期胚および胚盤胞期胚の生存率は、低い傾向にあることを報告した。その傾向と、本研究のVS3段階希釈によって得られた結果とは、よく一致する。

このVS3段階希釈を行った桑実期胚の中には、希釈の過程で形態をくずす胚も多く観察された(図2)が、これらのものは、凍結の過程で既に、物理的な傷害を受けたものと推定されるが、一部には、VSの浸透圧濃度が非常に高いため、VSをVS3段階希釈により段階的に除去操作を経てなおかつ、浸透圧差による水分の急速な細胞流入がおこったために、細胞膜の破損が生じたことも考慮に入れる必要がある。

胚の発育が進み、割球の単位容積あたりの表面積が大きくなるほど、個々の細胞の脱水効果が高まり、凍結保存には有利であると考えられている⁹⁾。今回、VS3段階希釈を行った際、8細胞期胚の方が、やや桑実期胚や胚盤胞期胚に比し、高い発育率を示した。この理由については、発育の段階によって、細胞膜の透過性などで、物理化学的性質の変化が胚細胞に生じていることが考え

られるが、いまだ十分な説明を得られない。しかしながら、この結果は、割球が小さいことが、凍結保存に必ずしも絶対的有利性を有するとは言えないことも示唆している。

一方、融解後の希釈で、収縮した状態のマウス胚は、0.3M-sucrose液に浸漬させることにより、高浸透圧のVSを除去され、高い率で生存性を維持していることが認められた。

すなわち、桑実期胚および胚盤胞期胚においては、VS3段階希釈を行った胚の発育率よりも、sucrose 2段階希釈を行った胚の発育率のほうが高い傾向にあることを示し、特に桑実期胚ではその差が顕著であった ($P < 0.05$)。

このように、Vitrification法で凍結され、そして、融解後にsucrose 2段階希釈を適用された桑実期胚や胚盤胞期胚では、従来行われてきた段階的希釈法で得られたものよりも高い生存率を得ることが期待できよう。

Kasaiら³⁾は、DMSOで凍結融解されたマウス桑実期胚の凍害保護物質除去に、DMSOとsucroseの混合液を用い、融解胚を、この液の中で脱水、収縮させた後に、sucrose液へ浸漬させたところ、融解胚を、sucrose液に直接浸漬させる方法を採用した時よりも、胚の生存性が高かったと報告している。

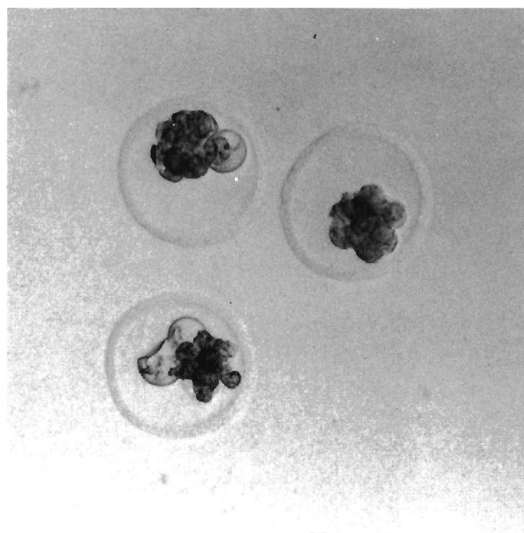
Schneider and Mazur¹⁰⁾は、非浸透剤であるsucroseは、細胞膜を介する水分の移動を制限し、すみやかに、細胞内の凍害保護物質を除去する作用があると述べている。おそらく、これと同じ理由によって、sucrose 2段階希釈胚では、VSから直接、浸透圧差の大きな0.3M-sucrose液に移されても、非浸透剤であるsucroseの作用により、水分の急速な細胞内流入を緩和することができたものと思われる。

Hsuら²⁾は、Vitrification法により凍結されたマウス胚の移植により、産子が得られることを実証した。また、本研究では、sucroseを用いた簡易な凍害保護物質除去法を、このVitrification法に導入し、マウス胚に適用した。そして、得られた生存マウス胚の移植により、産子が得られた。

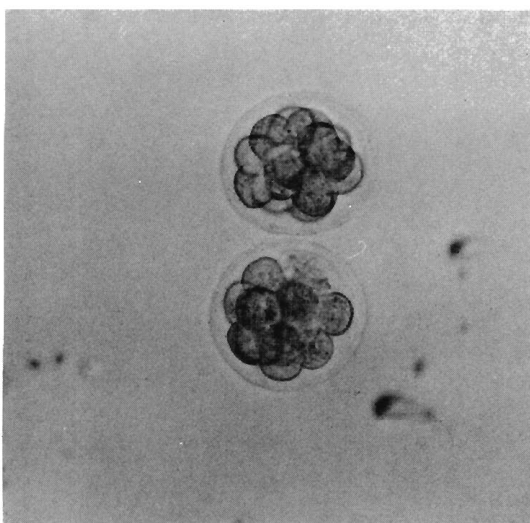
今後、このような、sucrose希釈の手法を用いることにより、Vitrification法の操作手順が短縮される可能性は大きいと思われる。



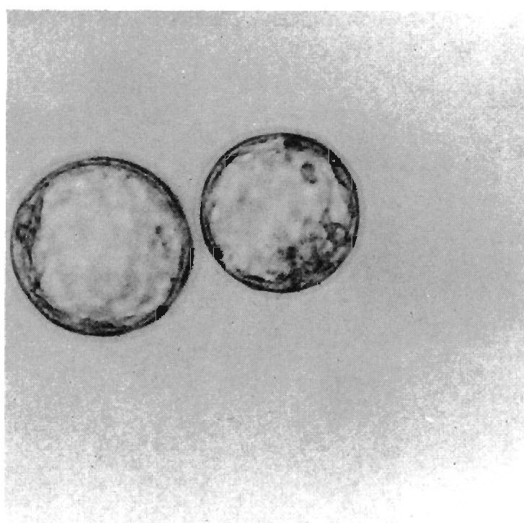
a



a'



b

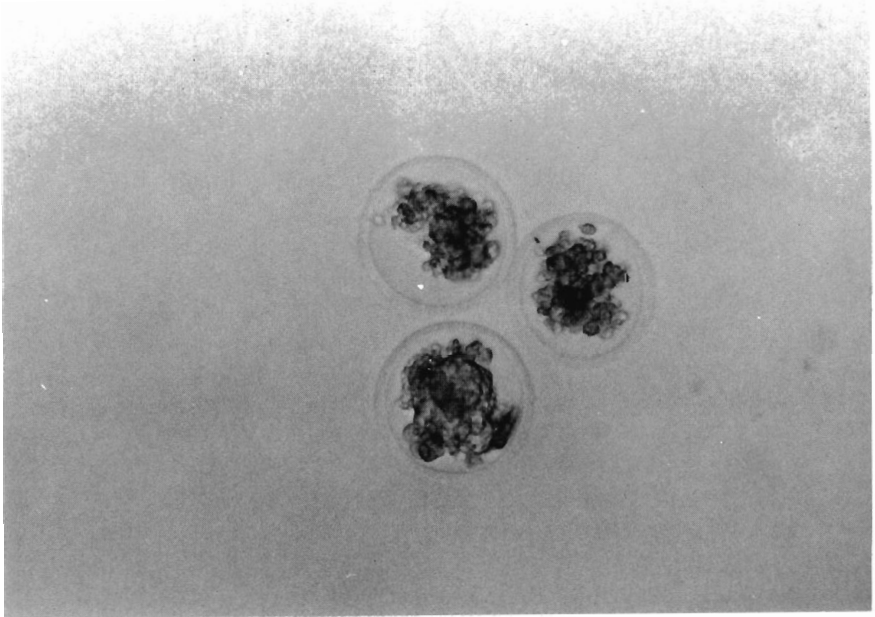


b'

- 図2 a : Vitrification 法で凍結融解され、VS 3 段階希釈されたマウス桑実期胚、細胞の膨化が見られる。(m-PBS中)
a' : 48時間培養後、発育せず。
b : Vitrification 法で凍結融解され、sucrose 2 段階希釈されたマウス桑実期胚。(m-PBS中)
b' : 48時間培養後、拡大胚盤胞に発育。



a



a'

図3 a : Vitrification 法で凍結融解され、VS 3段階希釈されたマウス胚盤胞期胚、
収縮した状態のままである。(m-PBS中)
a' : 24時間培養後、発育せず。

文 献

- 1) Rall WF., GM Fahy (1985), Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature.*, 313, 573-575.
- 2) Hsu TT., H Yamakawa., J Yamanoi., S Ogawa (1986), Survival and transfer test of mouse embryos frozen by vitrification method. *Jpn J Anim Reprod.*, 32, 29-32.
- 3) Kasai M., K Niwa., A Iritani (1980), Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. *J Reprod Fert.*, 59, 51-56.
- 4) Leibo SP (1983), Field trial of one-step frozen bovine embryos transferred non surgically. *Theriogenology.*, 19, 139.
- 5) Renard JP (1983), Sucrose dilution, A technique for field transfer of bovine embryos frozen in the straw. *Theriogenology.*, 19, 145.
- 6) 鈴木達行・下平乙夫・藤山雅照 (1984), 蔗糖を用いた1段階ストロー法によるウシ凍結融解卵の生存性と非手術的移植。家畜繁殖誌, 30, 211-215.
- 7) Whittingham DG (1971), Culture of mouse ova. *J Reprod Fert Suppl*, 14, 7-21.
- 8) Fahy GM, DR Macfarlane., GA Angell., HT Meryman (1984), Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology.*, 21, 407-426.
- 9) 内海恭三 (1984), 哺乳動物卵子の凍結と移植。日畜会報, 55, 523-534
- 10) Schneider U, P Mazur (1984) . . Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. *Theriogenology.*, 21, 68-79.