

ラット胚の液体窒素ガスによる急速簡易凍結法に関する研究

藤井好孝・内海恭三・湯原正高

(岡山大学農学部家畜繁殖学教室)

Received October 31, 1980

A Simplified Rapid-Freezing of Rat Embryos by Liquid Nitrogen Gas

Yoshitaka FUJII, Kyozo UTSUMI and Masataka YUHARA

(Laboratory of Animal Reproduction)

A successful low temperature preservation of mammalian embryos was first reported in mouse in 1972. Survival of cryopreserved mammalian embryos has required both slow cooling and slow warming. For the purpose of cryopreservation of mammalian embryos, a freeze-thaw cycle should be more simplified. This experiment was to develop a simplified rapid-freezing of rat embryos.

Erythritol was used as a cryoprotectant, since it did not impair the development of rat embryos *in vitro* at relatively high concentration. Rat embryos were cooled by three-step cooling procedure in liquid nitrogen gas. The highest survival of the embryos (54%) was obtained when embryos were cooled from 25°C to -20°C at 2.25°C/min, then to -60°C at 8°C/min, and to -180°C at 22°C/min. The embryos were thawed by immersing the straws directly into water bath at 30°C.

The relationship between holding temperature at the first cooling step and survival ratio was examined. Survival required a holding temperature at about -20°C, and the lower holding temperature resulted in lower survival ratio. Rat embryos were also cooled in other cryoprotectant. But inositol, ethylene glycol and glycerin were not found effective in preserving the embryos.

結 言

現在哺乳動物胚凍結保存の成功例はマウス¹⁰⁾、ラット^{8,9)}、家兔²⁾、牛^{3,7,12)}、羊¹³⁾等で報告されている。しかし、家畜において、融解後の胚の生存率は低く、凍結法も時間のかかる緩慢凍結法が必要とされている。従って、今後家畜胚の凍結保存技術を広く一般に普及させるには融解後も胚の生存率が高く、しかも簡単で時間のかからない凍結法が望まれる。

そこで著者等は家畜動物胚のモデルとしてラット胚を用いて、凍結操作を簡易化するために液体窒素ガスによる簡易急速凍結を試みた。哺乳動物胚凍結保存にはこれまで凍結保護物質として dimethyl sulfoxide (DMSO) や、glycerin を用いた緩慢冷却法が行なわれてきた。哺乳動物胚を急速冷却するために、特に急速冷却に対して保護効果があるとされている細胞外凍結保護物質⁴⁾の糖類について検討した。また胚の冷却速度も胚の生存性に大きな影響を与える要因¹¹⁾なので、本研究では液体窒素ガスでさまざまな冷却速度を試み、胚の生存性との関係を調べた。そして冷却脱水温度域と融解胚の発育率から凍結による胚の生存性の機序を考察した。

材料及び方法

当研究室で自家繁殖した Wistar 系ラットの雌を雄と交配させ、交配した翌日膈スミアによって交尾の有無を確認した日を妊娠の第1日とした。妊娠第4日の夜に自然排卵による後

期桑実胚から早期胚盤胞を卵管還流によって時計皿上に得た。得られた胚は卵管還流液で3回洗浄された後、実験に供された。卵管還流液は生理的食塩水：同種不活化血清が4：1の液にペニシリンを800単位/ml 添加した液を用いた。

予備実験として *in vitro* での胚の発育性に及ぼす各種凍結保護物質の影響を見るために、室温で胚を生理的食塩水にさまざまな濃度で凍結保護物質を添加した液を用意した。供試胚は低濃度液から高濃度液の入った時計皿に段階的に移して行き、Table 1 に示してあるそれぞれの最終濃度の液中に10分静置した。その後等張に戻すため段階的に低濃度液の入った時計皿に移して行き、修正 KRB 液で3回洗浄し、修正 KRB 液の入った時計皿で炭酸ガス培養した。そしてその後の胚の生存性は培養開始後24時間後に形態的に正常と思われる後期胚盤胞への発育率で示した。なお凍結保護物質としては polyvinyl pyrrolidone (PVP), hydroxy ethyl starch (HES), hydroxy ethyl chitin (HEC), inositol, erythritol, そして対照として DMSO, ethylene glycol を使った。

凍結保護物質を含む媒液での感作試験から erythritol が凍結保護物質として適していると思われたので、冷却融解曲線の検討を erythritol を用いて行なった。まずラット胚を室温で5% erythritol 液（生理的食塩水：同種不活化血清が2：1の基礎媒地に erythritol を5%添加した液）を含む時計皿に10分静置し、更に10% erythritol 液（基礎媒地に erythritol を10%添加した液）を含む精液凍結用2重ストローの内筒に10分置いた。ラット胚の急速凍結はそのストローをキャニスターに入れ、キャニスターを -196°C まで液体窒素ガス中を段階的に下降させる方法で行なった。融解はストローを液体窒素から取り出して直接 30°C の温湯に浸すか、あるいは -18°C ethanol バスに2分置いてから 30°C の温湯に浸して行なった。融解後の erythritol の希釈は、時計皿に回収されたラット胚を順に8%, 6%, 4%, 3%, 2%, 1% erythritol 液（生理的食塩水に erythritol を添加した液）を含む時計皿に移し変えて行なった。ラット胚は各時計皿に7分以上置かれた。胚の生存性の検査は、そのラット胚を修正 KRB 液で3回洗浄し、修正 KRB 液を含む時計皿で培養して、24時間後形態的に正常な後期胚盤胞への発育を観察して行なった。結果は後期胚盤胞への発育率で示した。

冷却脱水温度域と胚の生存性の関係を知るために、ラット胚を冷却する際、キャニスターを第1段階の最初の20分は液体窒素ガス上のさまざまな高さに固定した。それ以下の温度域の冷却は全て erythritol を凍結保護物質として用いて最も生存率の高かった凍結法に準じて行なった。融解はストローを液体窒素から取り出して直接 30°C の温湯に浸して行なった。

なお、凍結保護物質に erythritol を用いて得られた最も生存率の高かった冷却融解曲線を用いてラット胚を erythritol 以外の凍結保護物質を用いて凍結融解した。凍結保護物質としては inositol, ethylene glycol, glycerin, 対照として DMSO を用いた。

ラット胚の培養は気相 CO_2 5%・空気95%、湿度98%、温度 37.0°C の培養器内に時計皿を置いて行なった。またキャニスター底の冷却中の温度の測定は、直接試料の温度ではなく、試料の入ったストローを入れたキャニスター底の温度を銅-コンスタンタン熱電対で測定した。冷却融解期間中に胚の受けた温度は、同時に冷却融解されるサンプルと同じ凍結媒液を含むストローの内筒に、胚の沈んでいる位置まで熱電対を差し込み温度を測定し、記録計に温度変化を記録させて行なった (Fig. 1)。

結 果

1. 胚に対する凍結保護物質の影響

in vitro におけるラット胚の発育性に及ぼす細胞内と細胞外凍結保護物質の影響は Table 1 に示した。PVP, HES, HEC, inositol の場合、胚は比較的低濃度にさらされただけでそ

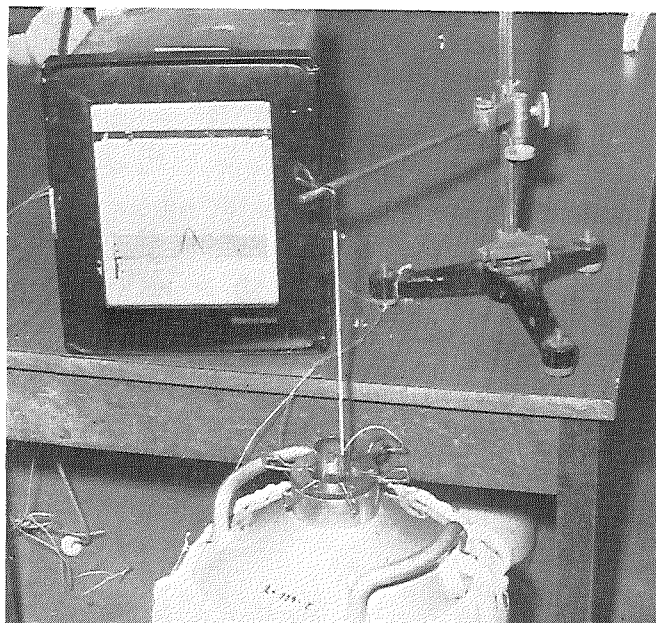


Fig. 1 A liquid nitrogen tank, straw in canistar and thermometer.
The canistar is placed in liquid nitrogen gas phase.
Thermocouple is inserted in the straw.

Table 1 Effect of both penetrating and nonpenetrating cryoprotectants on unfrozen rat embryos *in vitro*

Cryoprotectant (mol wt)	% (M)	No. of embryos cultured	No. of full-expanded blastocysts (%)
P.V.P. (40000)	2 (0.0003)	10	0 (0)
hydroxy ethyl starch	6 8	5 6	2 (40) 3 (50)
hydroxy ethyl chitin	1 2 3	6 6 6	6 (100) 6 (100) 6 (100)
inositol (180)	4 (0.23) 8 (0.48) 10 (0.62)	4 4 2	4 (100) 4 (100) 0 (0)
erythritol (122)	9 (0.81) 12 (1.12) 16 (1.45)	4 4 3	4 (100) 4 (100) 3 (100)
DMSO (78)	8 (1.11) 16 (2.44)	3 3	3 (100) 3 (100)
ethylene glycol (62)	6 (1.03) 12 (2.20) 15 (2.85)	4 3 3	4 (100) 3 (100) 1 (33)

の発育性を著しく阻害された。またこれらの細胞外凍結保護物質は分子量が大きいため、低濃度でも胚がそれぞれの溶液中に浮上してしまい培養が困難であった。細胞外凍結保護物質の erythritol と、細胞内凍結保護物質の DMSO では比較的高濃度感作後でも発育性に悪い影響は認められなかった。

本実験においてはラット胚の急速凍結を目的の1つとしているため、凍結保護物質には従来の DMSO とか glycerin といった細胞内凍結保護物質よりも急速凍結に適していると考えられる細胞外凍結保護物質の性質を持つ糖類の使用を試みた。従って、比較的高濃度感作後でも胚の発育性に影響を与えなかった erythritol (16%の濃度で胚の発育率100%) を胚の凍結実験に用いることにした。

2. 冷却融解速度と胚の生存性

冷却融解速度と融解後のラット胚の生存率の関係は Table 2 に示した。Table 2 に示される通り、キャニスターを液体窒素ガス上に置いて30分後にキャニスター底温度が -50°C に

Table 2 Effect of cooling and warming rate on the survival of rat embryos

Cryoprotectant (%)	Temperature at stepwise cooling & thawing (min)						No. of embryos recovered	No. of full-expanded	
							No. of embryos frozen	blastocysts (%)	
erythritol (10)	25	-50 (30)	-120 (10)	-190 (10)	LN	-18 (2)	30 (2)	$\frac{6}{9}$	1 (11)
	25	-50 (35)	-90 (10)	-190 (10)	LN	-18 (2)	30 (2)	$\frac{3}{5}$	0 (0)
	25	-70 (20)	LN	30 (2)				$\frac{6}{6}$	0 (0)
	25	-70 (20)	-120 (10)	-190 (10)	LN	30 (2)		$\frac{10}{10}$	4 (40)
	25	-70 (20)	-125 (5)	-190 (5)	LN	30 (2)		$\frac{25}{25}$	14 (54)

なるようにし、続いてキャニスターを下げて再固定し10分後に -120°C になるようにし、更にキャニスターを下げて再固定し10分後に -190°C になるようにした後液体窒素中に沈めた。融解はストローをいったん -18°C ethanol バス中に2分入れ、 30°C 温湯中で融かす方法によって行ない、その後の生存率は11%であった。同様に室温の 25°C から -50°C へ、 -90°C へ、更に -190°C へ、そして液体窒素へと冷却段階を変えても生存率は低く0%であった。そこで第1段階を室温から -70°C まで冷却し、更に -70°C から直接液体窒素に入れた時には生存率は0%であったが、 -70°C から -120°C 、 -190°C 、そして液体窒素へと、室温から3段階で液体窒素に入れ、 30°C 温湯で直融する方式をとった時に40%の生存率が得られた。そして -120°C と -190°C の2ステップをより急速冷却で行うことにより、生存率は更に高くなり54%となった。

なお、この最も生存率の高かった方法において胚が受けた温度は Fig. 2 に示した。胚の温度は冷却開始後約5分で氷点に達し、約7分後植氷し、約10分後から徐々に下降し、20分後 -20°C になり、それから直線的に下降し25分後 -60°C になり、更に急激に下降し30分後 -180°C になった。

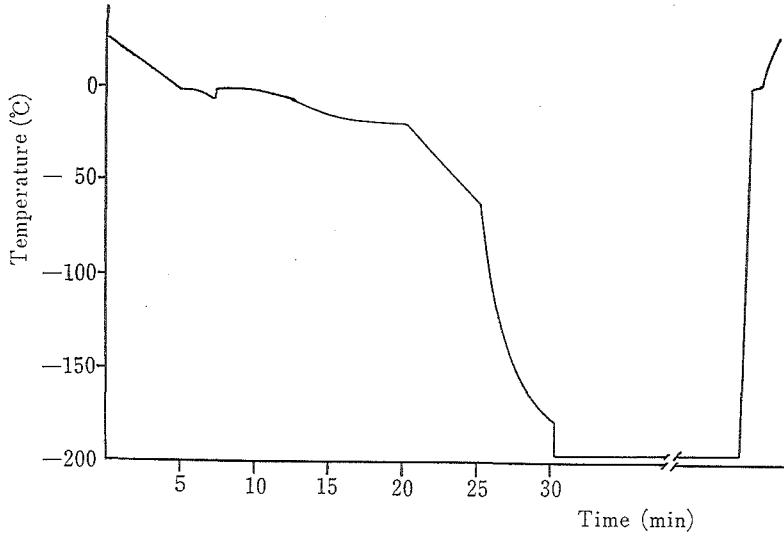


Fig. 2 The cooling curve (left) and the thawing curve (right).

3. 冷却脱水温度域と胚の生存性

10% erythritol を凍結保護物質としてラット胚を冷却融解した際に最も生存率の高かった冷却融解操作を基本として、第1段階（最初の20分）のキャニスターの高さをさまざまに変化させた時のラット胚の受けた温度変化とそれぞれの冷却速度での融解胚の生存率はそれぞれ Fig. 3, Table 3 に示した. Fig. 3 と Table 3 から、冷却速度B, C, Dの時、融解胚の生存率は比較的高かった (B: 86%, C: 54%, D: 60%). B よりも冷却脱水温度域の高い A においては生存率が低く 0% であった. そして冷却脱水温度域が相対的に低い E~I の冷

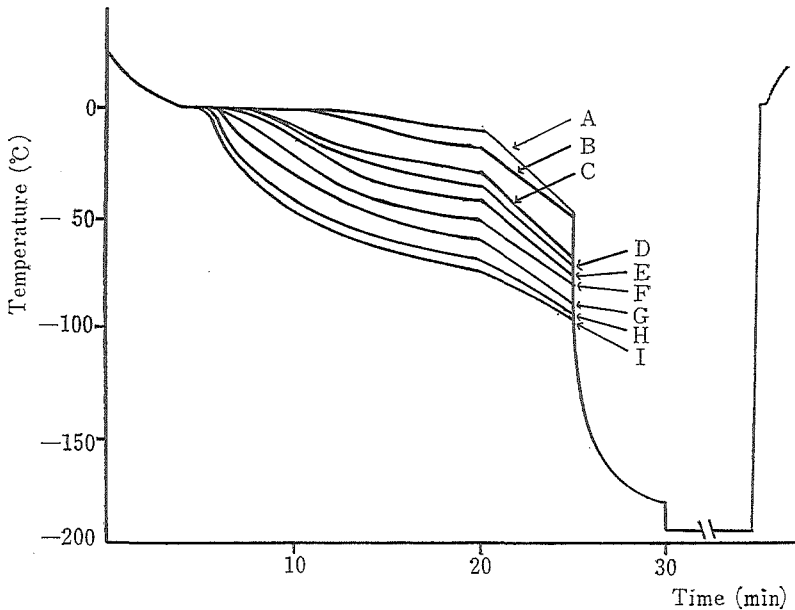


Fig. 3 The cooling curve at subzero temperature.

Table 3 Relationship between the cooling rate at subzero temperature and the survival of rat embryos

Cooling rate	No. of embryos recovered	No. of full-expanded blastocysts (%)
	No. of embryos frozen	
A (n=3)	$\frac{13}{13}$	0 (0)
B (n=3)	$\frac{13}{14}$	12 (86)
C (n=3)	$\frac{13}{13}$	7 (54)
D (n=3)	$\frac{10}{10}$	6 (60)
E (n=3)	$\frac{15}{15}$	6 (40)
F (n=3)	$\frac{13}{13}$	3 (23)
G (n=3)	$\frac{14}{14}$	3 (21)
H (n=3)	$\frac{10}{10}$	1 (10)
I (n=3)	$\frac{9}{10}$	1 (10)

却速度では生存率は低く、冷却脱水温度減の下降とともに低下した (E: 40%, F: 23%, G: 21%, H: 10%, I: 10%)。

4. 各種凍結保護物質による凍結と生存率

erythritol と他の凍結保護物質を用いてラット胚を凍結した時の融解後の生存率は Table 4 に示した。erythritol は対照の DMSO に匹敵する凍結保護効果を示した。即ち 10%

Table 4 Effect of cryoprotectants on the survival of rat embryos

Cryoprotectant	(%)	No. of embryos frozen	No. of embryos recovered	No. of embryos cultured	No. of full-expanded blastocysts (%)
erythritol	(10)	26	25	19	14 (54)
	(8)	6	9	3	0 (0)
DMSO	(10)	5	5	5	2 (40)
	(8)	10	9	6	6 (60)
inositol	(8)	10	9	0	0 (0)
ethyleneglycol	(12)	14	13	0	0 (0)
glycerin	(8)	4	4	0	0 (0)

erythritol を用いた場合、生存率54%で、8% DMSO を用いた場合、生存率60%であった。しかしながら、細胞外凍結保護物質の inositol と細胞内凍結保護物質の ethylene glycol と glycerin では融解後の胚に全く生存性は認められず、生存率はいずれの場合も0%であった。なお erythritol の濃度を10%から8%に下げると生存率は0%であった。また DMSO の濃度を8%から10%に上げると生存率は60%から40%に下がった。

考 察

哺乳動物胚は他の細胞と比較して外的環境に対して影響を受けやすく、しかも1細胞当たりの細胞質体積が大きいため、凍結保存には緩慢凍結法が常法とされてきた。しかし、本研究では凍結保護物質として10% erythritol を用いたラット胚の急速凍結が試みられた。

キャニスター底の温度が凍結開始後30分で -50°C になるようにした場合、胚の温度は凍結開始後20分から30分の間に -15°C から -18°C にまでしか下降していないことから、融解後の胚の生存率が低かったのはたぶん冷却脱水温度減が高すぎたためと考えられる。対照的に、キャニスター底の温度が凍結開始後20分で -70°C になるようにした場合、胚の温度は Fig. 2 に示す通り凍結開始後20分で -20°C にまで下降しており、その後 -196°C まで2ステップで冷却された場合には生存率が良かったので、冷却脱水温度域は -20°C まで下げられた方が望ましいと考えられる。また融解法は直接 30°C 温湯に浸した時の生存率が良かったので、急速冷却された細胞は急速融解した方が融解後の生存率が高くなるという2要因仮説⁴⁾とよく一致する。なお、キャニスター底の温度が凍結開始後20分で -70°C になるようにした場合でも、 -70°C から直接液体窒素に入れられた時には融解後の胚に生存性が認められなかったが、これは -20°C から直接 -196°C まで胚の温度が下げられた間に胚内に残存していた細胞内水が細胞内氷晶形成を起し、また残余の細胞外溶液の氷晶形成が急速に起こり、それらの氷晶が胚に対して激しい損傷を与えていたため⁶⁾と考えられる。そして、キャニスター底の温度を -70°C から -190°C まで20分かけて下げた時よりも10分かけて下げた時の方が生存率が高かったのは、 -20°C から -180°C まで胚の温度をより急速に下げることとでたとえ生じたとしてもその細胞内氷晶の大きさを小さくしたためと考えられる。

冷却脱水温度域と胚の生存性の関係についての実験結果 (Fig. 3 と Table 3) において融解後の胚の生存率が最高の84%を示したのは冷却曲線Bの時であった。冷却曲線Bの場合、胚の温度は凍結開始後15分から20分の間に約 -15°C から -20°C の温度域に保持されている。従って、この冷却脱水温度域に保持されている間に、胚はその後の -196°C までの比較的急速な冷却に耐えられるよう変化していたと考えられる。その変化としては主に次の3つが考えられる。

- 1, -20°C から -190°C までの急速冷却期間中に生じると考えられる細胞内氷晶を胚の生存性に影響を与えない程度まで少なくするように細胞内水が脱水した。

- 2, 細胞外氷晶形成に伴う胚への物理的圧迫に対して胚が馴応した。

- 3, *Solution effect*⁵⁾ に対して胚が馴応した。

そして冷却脱水温度域の下降に伴い胚が -15°C から -20°C に置かれる時間が減少するので、冷却曲線BからIに向けて融解胚の生存率は除々に減少していったのであろう。冷却曲線Aにおいては冷却脱水温度域が -15°C から -20°C に達しなかったため、胚の脱水が不十分なまま急速冷却されて細胞内凍結を起し、融解後の胚の生存性が認められなかったものと考えられる。

このように、本研究において凍結保護物質として erythritol を用いてラット胚の急速凍結に成功したが、この凍結法における冷却曲線は1980年、MAUREEN J. WOOD 等¹⁴⁾によ

て報告されたマウス胚の急速凍結における冷却融解曲線と殆んど等しいことは大変興味深い。1979年、T. AKHTAR 等¹⁾はネズミリンパ腫細胞をさまざまな速度で冷却融解して、融解後の生存率は低速冷却低速融解した場合と急速冷却急速融解した場合に高かったことを報告し、融解後の生存率に対する冷却融解速度の2極性分布を示した。従って現在、この2極性分布がマウス胚とラット胚にも当はまることが示されているものと考えられる。この事から、この2極性分布は他の哺乳動物胚にも当はまるであろうことが示唆される。今後、牛胚、羊胚、山羊胚、家兎胚等の急速凍結の可能性も期待される。

erythritol や DMSO の保護効果とは対照的に、inositol, ethylene glycol, glycerin のラット胚に対する凍結保護効果は本研究では認められなかったが、これらがラット胚に対して凍結保護効果を持っていないと結論づけることは出来ない。冷却融解速度と凍結保護物質の間には密接な関係が示されている⁴⁾ので、これら3つの凍結保護物質についても、適切な冷却融解速度のもとではラット胚を凍結できることも考えられる。

本実験において実験用動物のラットの胚を DMSO 以外の凍結保護物質、すなわち erythritol で凍結保存できたことは、この先、更に急速凍結に適した凍結保護物質が発見されるであろうことを示唆している。

摘 要

哺乳動物胚凍結保存法を簡易化するため、家畜動物胚のモデルとしてラット胚を用い、液体窒素ガスによる簡易急速凍結を試みた。

凍結保護物質には比較的高濃度感作後でも *in vitro* におけるラット胚の発育性に影響を及ぼさなかった erythritol を選定した。冷却方式は凍結開始後、胚の温度が20分で -20°C 、25分で -60°C 、30分で -180°C になるようにし、融解方式はストローを液体窒素から 30°C 温湯へ直接入れるようにした時に、その生存率が最も高かった。

10% erythritol によるラット胚の凍結法において、 -20°C から -38°C までの冷却脱水温度域を持った冷却法による融解胚の生存率は50%以上であった。 -43°C から -74°C までの冷却脱水温度域を持った冷却法による融解胚の生存率は40%以下で、しかも冷却脱水温度域の下降に供なって生存率も低下していった。そしてこの冷却脱水温度域と融解胚の生存率の関係から凍結の機序を検討した。

erythritol を凍結保護物質としてラット胚を凍結した際に最も生存率の高かった冷却融解方式で他の凍結保護物質を用いてラット胚を凍結してみたが、inositol, ethylene glycol, glycerin では融解胚の生存率は0%であった。

文 献

- 1) AKHTAR, T. : Cryobiology 16, 424-429 (1979)
- 2) BANK, H. and MAURER, R. R. : Experimental Cell Research 89, 188-196 (1974)
- 3) BILTON, R. J. and MOORE, N. W. : J. Reprod. Fert. 50, 363-364 (1977)
- 4) MAZUR, P. : Exp. Cell. Res. 71, 345-355 (1972)
- 5) MAZUR, P. : Cryobiology (ed. by, MERYMAN, H. T.), 214, Academic Press, New York (1966)
- 6) MAZUR, P. : Fed. Proc. 24, 175-182 (1965)
- 7) TROUSO, A. O., SHEA, B. F., OLLIS, G. W. and JACOBSON, M. E. : J. Animal Science 47, 3, 677-681 (1978)
- 8) 内海恭三・湯原正高 : 日本畜産会報, 45, suppl. 62, (1974)
- 9) 内海恭三・湯原正高・西村和彦 : 日本不妊会誌 21, 561, abst. (1976)
- 10) WHITTINGHAM, D. G., LEIBO, S. P. and MAZUR, P. : Science 178, 411-414 (1972)

- 11) WHITTINGHAM, D. G. : J. Reprod. Fert. 56, 11-21 (1979)
- 12) WILLADSEN, S. M., POLGE, C. and ROWSON, L. E. A. : J. Reprod. Fert. 52, 391-393 (1978)
- 13) WILLADSEN, S. M., POLGE, C., ROWSON, L. E. A. and MOOR, R. M. : J. Reprod. Fert. 46, 151-154 (1976)
- 14) WOOD, M. J. : Cryobiology 17, 178-180 (1980)

正誤表 (Errata)

頁 (Page)	行 (Line)	誤 (Erratum)	正 (Correct)
目次	6	温原正高	湯原正高
19	10	その節囲に	その範囲に
31	12	脱水温度減	脱水温度域
35	41	バクテリアヤ	バクテリア
38	8	ATP代用	ATPで代用
〃	12	G-I-P	G-1-P
40	10	学験結果	実験結果
〃	〃	マツノザイセンチュウ	マツノザイセンチュウ