

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

内海恭三・沖増英治・湯原正高
(家畜繁殖学研究室)

Received November 1, 1975

Survival of Frozen Rat Embryos: Ice Formation on Rat Blastocyst during Freezing Process

Kyozo UTSUMI, Eizi OKIMASU and Masataka YUHARA
(Laboratory of Animal Reproduction)

Recently, a deep-freezing preservation of mammalian egg, e. g. of mouse, rat and rabbit, has succeeded experimentally by application of dimethylsulfoxide (DMSO). However, the mechanism of such protective substance as DMSO and Glycerol for mammalian embryo as well as for sperm has not been made clear yet in many respects.

The study reported in the present paper was designed to observe microscopically the process of ice formation in deep-freezing of rat embryos in reference to protective substances: DMSO and Glycerol.

Preliminarily, the cleavage of rat blastocysts after deep-freezing was tested by means of *in vitro* incubation, and DMSO (8%) was proved to be more effective than Glycerol (5%) for the freezing of embryo.

In case of no protective substances in saline: serum (2:1), the process of darkening in one-cell egg of rat was observed under the microscope. The intracellular freezing, so-called flashing, was proved to be fatal in the embryo. When rat blastocysts were cooled below -20°C in the medium, the extracellular ice crystal ceased the migratory recrystallization and constituted irregular dendrite. The fact that the shrinkage of the embryo was scarcely observed was supposedly due to the formation of intracellular ice crystal in the egg.

As for the freezing of the embryo in the medium containing 5% Glycerol, the extracellular crystallization was induced progressively to form the irregular feather-type crystal, intermediatetype of irregular dendrite and coarse spherulite. The extracellular migratory recrystallization developed and resulted in the shrinkage of the embryo at temperature above -80°C . Both the fixation of extracellular migratory recrystallization and the sub-dehydration of the free-intracellular water below -80°C seem to be responsible for motality of the embryo.

In the medium of 8% DMSO, the extracellular migratory recrystallization occurred, by the shrinkage of the embryo, in the same manner as in the case of 5% Glycerol except for the following change at temperature above -132°C (eutectic point of DMSO). Below the eutectic point of DMSO, the numeral crevices grew, regardless of arrangement of the ice crystal. The consistency of opacity of the embryo throughout the cooling process suggests that intracellular ice formation was, if any, scarce. This was considered to show the effective action of DMSO for the freezing of rat embryos.

緒 言

哺乳動物卵子の凍結保存は1950年代に家兎で試みられているが、その後は散見されるにすぎない。1973年に至り WHITTINGHAM¹⁾ がマウスで、凍害防御剤として PVP* を使って成功し、さらに DMSO** によってめざましい成果を得るに至った。著者ら²⁾ も DMSO を用いてラット胚の凍結保存に成功している。一方哺乳動物精子では、凍害防御物質としてグリセリンが使われているが、哺乳動物卵子ではグリセリンが DMSO に劣ること³⁾ が報告されている。さきに著者ら⁴⁾ は、DMSO 加のラット胚盤胞の凍結過程における氷晶形と温度下降速度との関係ならびに温度域と氷晶形との関係を明らかにした。凍結過程中の細胞内外の氷晶形の観察は、植物のような大型細胞と違って、動物細胞での研究は比較的少なく、ウニ卵⁵⁾ やマウス未受精卵¹⁰⁾ で観察されている程度である。

本研究はグリセリンあるいは DMSO 存在下のラット胚の凍結過程中の細胞内外氷晶形成過程を観察して、凍害防御物質の胚に対する防御の作用機序を明らかにする目的で行われた。

材 料 と 方 法

自家繁殖した Wistar 系ラットから得られた胚を実験に供した。予備実験として、DMSO あるいはグリセリンを加えてラット胚を凍結し、融解後の胚の生存性を調べた。ラット胚盤胞の採取は既報⁶⁾ に従って行い、生理食塩水・自家不活化血清(2:1)の媒液で数回、回収卵を洗浄した。その卵を2分して、一方は8% DMSO 媒液へ、他方は5%グリセリン媒液へ移し、既報⁷⁾ のごとく凍結精子用プラスチックストローに封入して、ドライアイスアルコール(以下 DA と略す)の温度にまで凍結し、さらに DMSO 区を2分して、 -190°C の LN_2 ガス*** 中へ静置する場合と、DA から直接 LN_2 中へ浸漬する2つの法を行った。グリセリン区も2分し、同様の処置を行った。それぞれを融解して形態観察を行った後、体外培養によって生存性を確めた。つぎに凍結過程中の胚の細胞内外の氷晶形の観察を行った。前実験と同様にして採取した胚盤胞を3分した。その1は対照区として凍害防御物質を含まない媒液に、その2は5%グリセリンを含む媒液に、その3は8% DMSO を含む媒液に移した。胚の観察には既報⁴⁾ のごとく NIKON 製低温顕微鏡 NE 型を用いた。試料冷却室のスライドガラス上にシリコングリースで縁を取り、その中心に数個の胚を含んだ媒液約 0.001 CC を滴下し、カバーガラスでおおい、卵がこわれない程度にまで圧した。コントロールボックスから LN_2 ガスを送り、前報⁴⁾ のストロー法による凍結速度を修正した方法で冷却した。すなわち常温から 0°C までは緩冷し(約 $1^{\circ}\text{C}/1$ 分)、 0°C から急冷により媒液の氷晶核を形成せしめ、次に加温による移動再結晶によって氷晶を拡大させた。その後 -79°C までは、 -20°C から -40°C の急冷を除いて緩冷した。 -79°C から -197°C までは急冷(約 $4\sim 6^{\circ}\text{C}/1$ 分)した。各冷却過程の細胞内外氷晶形成を氷晶の形の変化と移動ならびに氷晶の光の不透明度を中心に観察した。なお細胞内の氷晶形成過程を詳しく観察するためにラット 1 cell 卵を卵管から採取し、同様の方法で 0°C からの急冷による Flashing 前後の卵細胞内を観察した。

* Polyvinylpyrrolidone

** Dimethylsulfoxide

*** 液体窒素ガス

結果と考察

I. 凍害防御物質と胚の生存性

DMSO とグリセリンのラット胚に対する凍害防御能を比較検討した。表—1 に示すように、8% DMSO を添加した媒液中の胚盤胞は DA から LN₂ ガス中へ静置した後、LN₂ へ

Table 1. Protective Effect of DMSO and Glycerol for Freezing Rat Blastocyst

Protective substance	Freezing process	No. of samples tested	% of ova survive	% of ova cleave
8% DMSO	DA.....190*.....LN ₂	15	61 (48/79)	67 (32/48)
8% DMSO	DA.....LN ₂	4	0 (0/20)	0 (0/0)
5% Glycerol	DA.....190*.....LN ₂	4	15 (3/20)	0 (0/3)
5% Glycerol	DA.....LN ₂	4	0 (0/24)	0 (0/0)

* exposed for 10 minutes to LN₂-gas

の浸漬した場合、61%の生存率を示し、そのうち67%の胚が体外培養によって Expand している。一方、DA から直接 LN₂ へ浸漬したものは一例の生存胚も得られていない。5% グリセリンを添加した媒液中の胚盤胞は DA から LN₂ へ浸漬した場合、わずかに形態の良好なものも得られたが、その立体感は DMSO のそれに劣り、体外培養によっても Expand は認められていない。さらに DA から LN₂ へ直浸したものは一例の生存胚も得られていない。

このようにラット胚に対する DMSO とグリセリンの凍害防御効果は、本凍結法では著しく異なることが認められた。精子の凍害防御物質としてのグリセリンと、血球の凍結に用いられている DMSO の胚に対する防御効果の本質は十分に明らかにされていない。しかしグリセリンより DMSO の方が細胞膜の透過性が高いことおよび DMSO の共晶点がグリセリンのそれよりもかなり低い (-132°C) ことが指摘されている。しかし、DMSO といえども DA から LN₂ に直浸した場合、胚の細胞質が崩壊して蛋白質の沈澱反応が見られることから、DA の温度域ではまだ細胞内自由水が残っており、LN₂ へ至る過程で細胞内凍結を生じたものと思われる。このことは既報⁴⁾のごとく 8% DMSO の媒液中では、DMSO の共晶点を通過して -150°C 以下になって媒液の氷晶が固定することからも推察される。また菅原³⁾らもラットの 2 cell 胚でグリセリンよりも DMSO が融解後の形態の優れていることを報告し、AVERILL⁸⁾らは羊卵をグリセリンで凍結して失敗している。WHITTINGHAM¹⁾もグリセリンより PVP、PVP より DMSO の方がマウス胚に有効であることを報告している。本実験の結果とは違って、動物種や媒液の種類や凍結法によっては DA から LN₂ へ直浸しても良好な結果を得ている報告もある。WHITTINGHAM⁹⁾はラットで -100°C 以下での温度下降の調整が胚の生存に有効なことに注目しているのは本実験の結果を支持しているように思われる。

II. Flashing 前後の 1 cell 卵の細胞内氷晶

生細胞の凍結に際して、細胞内凍結は原形質構造を機械的に破壊するために細胞にとって障害になるといわれている。ラット 1 cell 卵では Plate-1 で見られるごとく、細胞内凍結を生じていない卵は光の透過度が高く明るく見える。しかし Plate-2 で見られるごとく、

Flashing 数秒後、不透明度がやや減じているのは、移動再結晶が生じているものと思われる。もちろん Flashing を起こした卵は融解後は原形質の崩壊を生じる。このように細胞内凍結の様子は細胞内氷晶構造よりむしろ、不透明度の変化によって判定できることが明らかにされた。

Ⅲ. 凍害防御物質添加胚盤胞の細胞内外における氷晶形成

ウニ卵では細胞内に多価アルコールがある場合でも、いったん細胞内凍結が起これば細胞の生存に致命的であることが認められている⁵⁾。したがって細胞内凍結を起こさないように緩冷して、細胞内の自由水を除くことが動物胚の凍結保存の成功の鍵と思われる。そのような目的のために考案された凍結法⁴⁾にしたがって胚を凍結した場合の細胞内外の氷晶を観察した。

0°C から急冷後の媒液の自発凍結 (Spontaneous freezing) は、DMSO 区では -14°C、グリセリン区で -10°C、対照区では -16°C で起り、前2者は“不規則な樹枝状 (Irregular dendrite)”と“粗い小球 (Coarse spherulite)”の中間型を示し、対照は Irregular dendrite の花弁状を呈している。この結果は一般に Heterogeneous nucleation の方が高温で起こるといふ諸家の結果と一致している。しかしいずれの区も胚盤胞腔内の不透明度は低く細胞内凍結は生じていないものと思われる。

次にこの細胞外凍結が進んで細胞内が植氷されない前に、温度を上げて細胞外氷晶に移動再結晶を起こさせ、できるだけ細胞外氷晶を大きくする必要がある。既報⁴⁾のごとく DMSO 区では“六角形氷晶 (Hexagonal form)”に再結晶し、完全氷晶により近い状態になることを示した。本実験でもグリセリン区も同様の変化を見せたが、対照区では細胞外氷晶の拡大が局所にみられるに過ぎない。さらに除々に温度を下げるにつれて、DMSO 区 (-10°C) の移動再結晶は丸形から六角形に変化し (Plate-5)、卵細胞は -20°C から萎縮し始め、氷晶間液は -40°C 付近ではほぼなくなることが認められた。グリセリン区は -11°C 付近から細胞が萎縮し始めた (Plate-8) が、丸形氷晶と角形氷晶が混在しており、DMSO 区と比較的類似した氷晶形を呈する。冷却と共に細胞外氷晶は波動的に移動拡大し、-40°C 付近で氷晶間液がほぼなくなっている。一方、対照では -10°C 付近では細氷晶と粗氷晶が混在 (Plate-3) し、温度の下降に伴ない、その氷晶の拡大も若干みられたにすぎず、氷晶の移動も -20°C ぐらいまでで固定されている。またこの場合、卵細胞も萎縮していないことから脱水が不充分的のまま細胞内凍結を生じたものと思われる。

このように DMSO 区もグリセリン区も細胞外の移動再結晶により氷晶が大形化し、細胞が萎縮していることから細胞内の自由水が脱水されて、細胞内凍結は生じていないものと思われる。凍害防御物質の存在下では、原形質膜の細胞内植氷を防ぐ作用が強められることが推察されたが、この温度域ではグリセリンも DMSO と同様の作用をもつことが想像される。

しかし、その後の温度下降につれてグリセリン区では -80°C 付近 (Plate-6) で細胞外氷晶の動きが固定され、卵細胞の萎縮が止まっている。LN₂ の温度になっても (Plate-7) 氷晶の変化はほとんどなく、-80°C で氷晶形成が完結していることが想像された。対照では -20°C 付近から -80°C (Plate-4) に至るまで、細胞内外の氷晶形に変化がほとんど認められない。一方、DMSO 区では、温度下降に伴ない細胞外氷晶は鋭い角化を呈し (Plate-9)。DMSO の共晶点 (-132°C) で角化氷晶の移動が止った。-150~160°C で細胞外氷晶とは無関係に、氷の亀裂が生じ、それ以下の温度での変化は認められていない。しかも、細胞の

不透明度が全過程を通じて変わらないことから変化は認められていない。極低温下でも不透明度を変えるほどの細胞内の氷晶形成は生じていないことが推論された。このように媒液中の凍害防御作用をもつ媒質の違いによって、氷晶の形成型の異なることが認められた。DMSO やグリセリンが存在しない媒液では -20° 以下で、細胞内外の氷晶形に変化が認められず、細胞の萎縮も認められず、細胞内凍結が生じているものと思われる。それは融解時に細胞質の蛋白凝固を招来して卵の破壊をもたらすものであろう。一方、DMSO やグリセリンの凍害防御質の存在下では、細胞外凍結後の細胞外氷晶の増大につれて、胚は収縮することから細胞内の脱水が生じていることが推察された。しかし、グリセリンの場合は -79°C で細胞外氷晶の移動が止まることから、細胞内の脱水が不十分のまま細胞が固定され、細胞内凍結がその温度域以降に生じたものと思われる。この観察は、予備実験のグリセリンによる胚の生存が DMSO によるそれより著しく劣ることの説明の一つとなり得る。一方、DMSO 区での氷晶形の変化は一次凍結の完了時 (-132°C) まで氷晶形に変化の認められることから、十分に細胞内の自由水が脱水され、細胞内凍結を防止したか、または最少限に抑止したものと思われる。一般に水に対する透過性が高いほど、透過性の温度による変化が小さいほど、細胞の体積に対する表面積の割合が大きいくほど、細胞内凍結が起こりにくいといわれている。胚は球状を呈しているため、脱水率が非常に低いが、グリセリンや DMSO は胚の原形質膜の透過性の増大、あるいは細胞内凍結を誘発する細胞外氷晶による細胞内への植氷防止作用に対し、何らかの機序で有効に作用しているものと思われる。しかし、DMSO の方がグリセリンよりも共晶点が 50°C 以上も低いため、細胞外氷晶による細胞内自由水の脱水を十分に全うできることにより表一にも示したように胚の生存に効果的に作用するものと想像された。

摘 要

8% DMSO あるいは 5% グリセリン添加のラット胚盤胞の凍結後の生存性を検討した。8% DMSO を加え、DA から LN_2 ガス 10 分静置後 LN_2 に浸漬したものが最も良好な成績が得られ、5% グリセリンを加え、DA から同様の法によるものは著しく劣った。いずれも DA から直接 LN_2 へ浸漬した場合は生存胚は得られなかった。

細胞内凍結を観察するために、凍害防御物質を含まない液でラット 1 cell 胚を凍結し、低温顕微鏡によって観察したが、Flashing 直後は不透明度が急激に増し、数分後には移動再結晶による不透明度の低下を招いた。

ラット胚盤胞を同様に凍結した場合、 -20°C で細胞外氷晶の移動が止まり、卵細胞の萎縮はわずかで原形に近い形で固定され細胞内凍結が想像された。

5% グリセリン加媒液で凍結した場合、移動再結晶誘起後の緩冷によって細胞外氷晶の増大と胚盤胞の萎縮が観察された。しかし、その氷晶形の移動とその変化は、 -80°C 以下では認められず、胚は脱水不十分のままですれ以下の温度で細胞内凍結を招来していることが推察された。

8% DMSO 加媒液で凍結した場合、氷晶の形成と移動はグリセリンと同様の経過を示したが、 -80°C から DMSO の共晶点まで細胞外氷晶の角化と増大が認められ、胚の萎縮もその温度まで続いた。さらに $-150\sim-160^{\circ}\text{C}$ 付近において氷晶形の配列とは無関係に氷晶部に亀裂が入り、それ以後、 -197°C まで変化は認められなかった。また、細胞内の不透明度の

変化は全温度域を通じて認められず，細胞内凍結はごく一部かあるいは生じていないことが想像された。

文 献

- 1) WHITTINGHAM, D. G., S. P. LEIBO and P. MAZUR : Science **178**, 411—414 (1972)
- 2) 内海恭三, 湯原正高 : 日不妊会誌 **20** (2), 102 (1975)
- 3) 菅原七郎, 辻井弘忠, 竹内三郎 : 第12回哺乳動物卵子談話会 p—7, (1971)
- 4) 沖増英治, 内海恭三, 湯原正高 : 凍結精液研究会会報 **45**, 7—10 (1975)
- 5) 朝比奈英三 : The Inst. Low Temp. Sci. Sapporo 211—229 (1967)
- 6) 湯原正高, 内海恭三, 野上与志郎, 坂本寿文, 奥山博 : 岡山大農学報 (42), 27—32 (1973)
- 7) 内海恭三, 湯原正高 : 岡山大農学報 (44), 24—27 (1974)
- 8) AVERILL, B. L. W., and L. E. A. ROWSON : J. AGRIC. SCI. **52**, 392—395 (1959)
- 9) WHITTINGHAM, D. G., : J. Reprod. Fert. **43** (3), 575—578 (1975)
- 10) SHERMAN, J. K. and T. P. LIN : Fertil. Steril. **103**, 84—396 (1959)

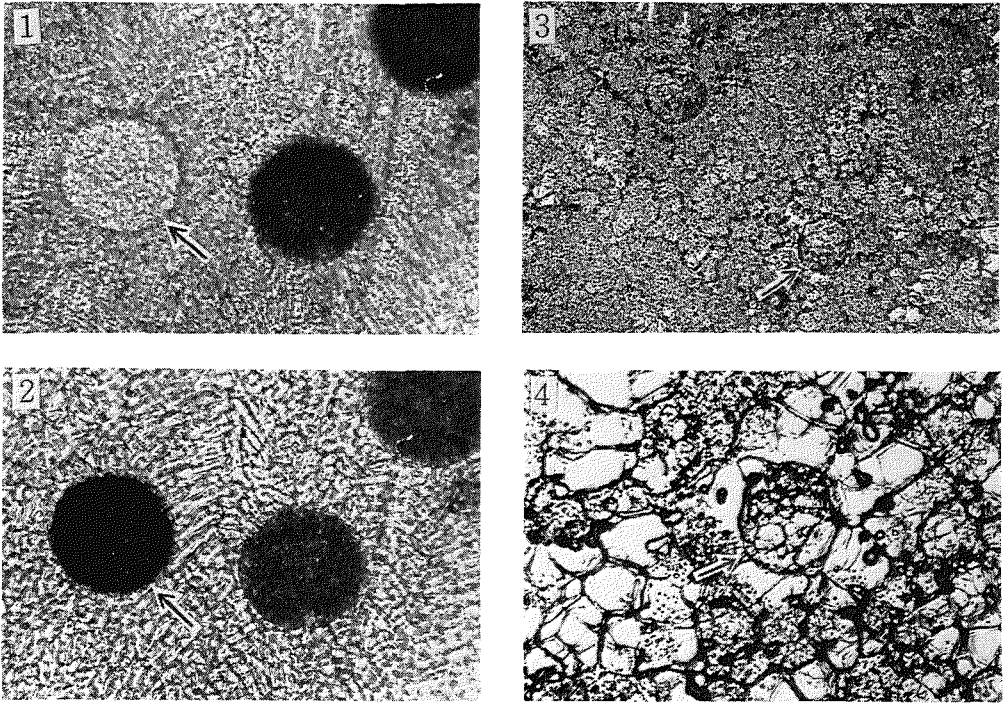


Plate 1. Pre-flashing in 1-cell egg ; The left cell (arrow) does not show intracellular nucleation. The right appears to be darkened by minute intracellular nucleation.

Plate 2. Post-flashing in 1-cell egg : The left (arrow) shows a intracellular nucleation. The reduced opacity in the right seems to be caused by migratory recrystallization.

Plate 3. No protective substance at -10°C (x33) : Extracellular fins and coarse crystals distribute heterogeneously.

Plate 4. No protective substance at -80°C (x67) : Extracellular recrystallization had ceased at temperature above -20°C . Blastocyst retained their original pattern

Plate 5. 8% DMSO at -10°C (x33) : Migratory recrystallization from irregular dendrite to hexagonal form is extracellularly observed.

Plate 6. 8% DMSO at -80°C (x33) : Cornification and enlargement of extracellular ice crystal occurred, progressively Shrinkage of blastocyst takes place consistently from -20°C .

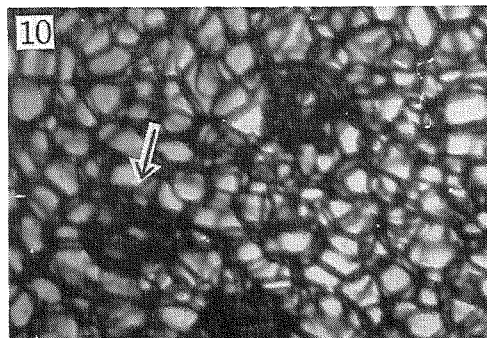
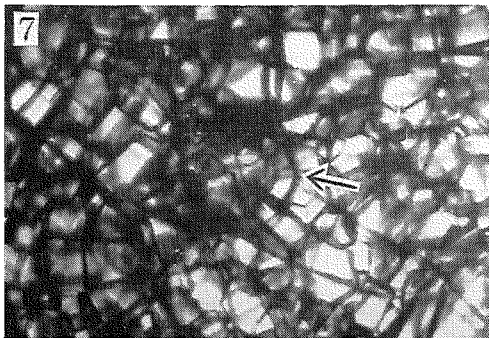
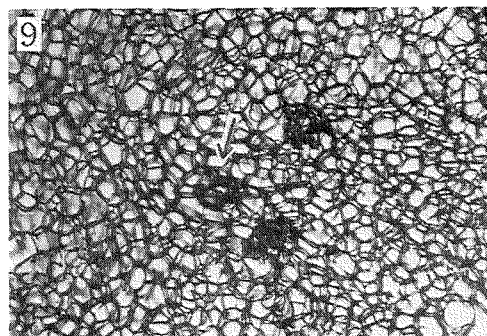
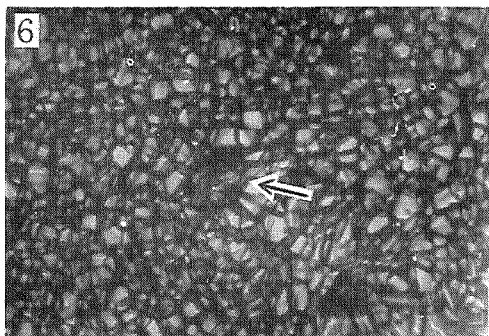
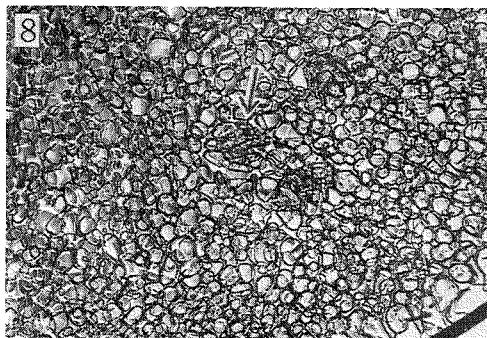
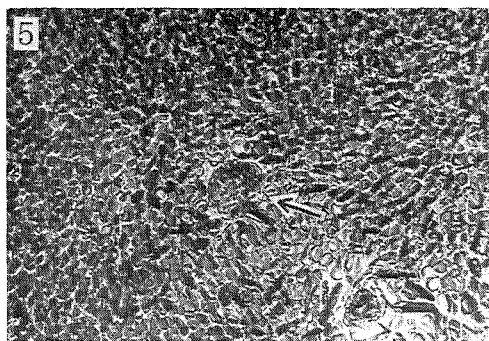


Plate 7. 8% DMSO at -190°C (x 67) : Crevices take place extracellularly regardless of ice crystal, while both extracellular crystal and shrinkage of blastocyst had ceased at -132°C

Plate 8. 5% Glycerol at -10°C (x 33) : Blastocyst begin to shrink. Pattern of extracellular crystal resembles those of 8% DMSO.

Plate 9. 5% Glycerol at -80°C (x 33) : Extracellular crystal ceased to migrate. Shrinkage of blastocyst has stopped.

Plate 10. 5% Glycerol at -190°C (x 67) : Pattern of ice crystal is not different from that of Plate 9.