

胚冷凍

細胞、精子、胚、卵、卵巢等冷凍可使生殖科技突破時空限制，是產業化最重要的技術之一；其中，細胞、精子及胚冷凍最為普遍，大多數哺乳動物目前皆可成功並例行化運作。

想成功冷凍生命，首先必須在冷凍過程不形成冰晶(ice crystal)或冰晶在細胞外形成，以避免物理性破壞細胞膜及胞器(organelle)而導至死亡。以常規生理溶液進行冷凍無法成功，因為除了細胞內、外會形成冰晶外，同時使細胞溶質濃度上升而至中毒死亡—此稱為化學性溶液效應(solution effect)。1949年，英國 Polge 等發現甘油可有效減低溶液效應而至冷凍成功；以甘油為冷凍保護劑的發現，從此開啟現代冷凍學大門。

可以例行成功運作傳統胚冷凍技術首由 Whittingham 等於 1972 年建立，隨後 Willadsen 於 1977 年加以改良並沿用至今。簡言之，胚洗入約 1.5 M 冷凍液後、裝入容器(例如小塑膠麥管)，緩慢降溫(-30°C 前每分鐘降溫 0.3°C，爾後再以每分鐘降溫 0.1°C 之速率至 -36°C)；期間在約 -7°C 植冰(seeding)，使過冷(supercool)冷凍液開始在細胞外形成「細小」冰晶，並維持溫度約 15 分鐘使完全結凍，然後直接放入液氮內(-196°C)冷凍貯存。此法使細胞內水分在細胞外冰晶形成時(溶質濃度上升)，有足夠時間因濃度差跑到細胞外形成冰晶而細胞內無冰晶形成；冷凍保護劑一方面降低細胞內溶質濃度，再與之形成膠和作用(colligative effect)而減低溶液效應。解凍時，37°C 水浴內快速回溫(每分鐘升溫約 1,000°C)使再結晶(recrystallization)沒有時間形成，因此可以成功得到具發育能力的胚；胚移置後，可分娩正常、健康後代。此等傳統胚冷凍方法對體積較大的未受精卵及受精卵無效，又植冰或緩慢降溫須額外特殊設備(例如可程式降溫儀)，且每次冷凍過程需時約 3 小時，這些缺點在實務上改善空間較有限；原理及做法完全不同的玻璃化(vitrification)冷凍技術因此發展出來。

玻璃化一詞早在 1930 年代即有清楚描述：「玻璃化是液體變成固體而不形成冰晶過程」。1938 年，Luyet 和 Hodapp 利用 1-2 M 蔗糖溶液第一例成功玻璃化冷凍蛙精子。1984 年，Fahy 氏等有詳細的理論說明；隔年，Rall 和 Fahy 首次以小鼠 8-細胞期胚成功印證之。簡言之，胚洗入含冷凍保護劑高滲透壓玻璃化溶液(55±10%, w/w)，數分鐘內快速脫水、裝入容器，然後立刻直接移入液氮快速冷凍並貯存。因為胚已經相當程度脫水且快速冷凍，因此不會形成冰晶造成細胞膜及胞器可能的物理性損傷；而脫水所形成的高溶質毒性效應也因冷凍保護劑及直接移入液氮內快速冷凍而可避免。解凍去玻璃化

(devitrification)時，快速回溫(每分鐘升溫 $\geq 1,000^{\circ}\text{C}$)使再結晶沒有時間形成，因此可以成功得到具發育能力的胚；胚移置後，可分娩正常、健康後代。2006年，台大醫院婦產科陳思源等人以相同原理成功玻璃化冷凍小鼠整顆卵巢，解凍移植後具正常功能，並可自然配種、懷孕生下仔小鼠。玻璃化冷凍效果較傳統冷凍方法有過之而無不及，不須任何特殊設備、過程僅費時10-15分鐘，這些優點使其目前幾乎全面取代傳統冷凍方法。

Arav 等於 2002 年指出，冷凍保護劑濃度越高、冷凍降溫及解凍回溫速率越快或冷凍體積越小，則玻璃化冷凍成功機率越高；玻璃化冷凍即循此原則發展。

早期玻璃化溶液含高濃度、有毒冷凍保護劑，通常在低溫操作；又溶液太粘、操作不方便，因此毒性較低、操作較方便玻璃化溶液陸續被發展出來。目前使用最普遍的玻璃化溶液含約 15% ethylene glycol (EG) 及 15% DMSO 冷凍保護劑，毒性相對最低、進出細胞快速、不會太粘、操作方便；此外，為提高玻璃化溶液滲透壓，普遍添加約 0.5 M (17%) 蔗糖。此配方使用在細胞、精子、胚、卵、卵巢等玻璃化冷凍皆有不錯效果。近年，使用低濃度玻璃化溶液(3~5% DMSO + 3~5% EG + 0.5 M 蔗糖)，並配合使用開放式冷凍板(CryoTop)快速降溫，可以成功冷凍小鼠卵，解凍、受精可發育至囊胚，移置後分娩有正常小鼠，效果與新鮮者相當。較意外的結果是，不含冷凍保護劑的人用精子標準保存液可以成功冷凍人精子；解凍後體外受精效果和新鮮精子相當。此等結果未來配合超低溫超快速(super-cooling ultra-rapid)及小體積玻璃化冷凍，發展潛力值得注意。

傳統胚冷凍方法幾乎全部使用長 135 mm、外徑 2.0 mm、內徑 1.7 mm、管壁厚 0.15 mm、容量 0.25 mL 的「小」塑膠麥管；早期玻璃化冷凍亦沿用此麥管，並前後密封(sealed)而不接觸液氮(此為封閉式，沒有微生物污染問題)。麥管形狀細長、體積小，操作不是很方便、書寫標記不易；最大的限制是冷凍體積較大的卵及受精卵效果欠佳，因此可快速或超快速降溫容器及玻璃化冷凍方法陸續被發展出來。

「小」塑膠麥管加熱拉成直徑及管壁厚約為原「小」塑膠麥管一半的開放式熱拉麥管(open pulled straw, OPS)首先於 1997 年被 Vajta 等發展出來。含胚或卵玻璃化冷凍液以毛細管作用(capillary effect)吸入管內(內徑 700 μm ，吸入量約僅 1 μL)後，不封口(open)直接移入液氮內快速冷凍並貯存(此為開放式)。封閉式「小」塑膠麥管降溫速率約每分鐘 3,000 $^{\circ}\text{C}$ ，開放式 OPS 則因管壁薄、含胚微量冷凍液直接接觸液氮而可達 20,000 $^{\circ}\text{C}$ ，卵及受精卵因此可以成功例行性冷凍。隨後直徑及管壁厚約為 OPS 一半的超細 OPS (superfine OPS,

SOPS)亦證實效果相當。直接使用現成內徑 200 μm 微量吸管或 10 μL 微量吸管頭等亦先後證實有相當效果。期間，使用現成容器、可有效大數目冷凍方法亦被成功發展出來；例如，含胚或卵玻璃化冷凍液置於孔徑 55 μm 電子顯微鏡裝樣銅網(electron microscope copper grids)或孔徑 60 μm 尼龍網上，移入 1.5 mL 標準細胞用冷凍管(cryovial)，直接注入液氮，旋上蓋子，移入液氮內貯存。開放式及封閉式冷凍環(Cryoloop)、開放式冷凍板、封閉式冷凍微管(CryoTip)等商業化套組產品亦先後問世，雖玻璃化冷凍效果極佳，惟無法有效大數目冷凍且價格相對昂貴(CryoTip 價格約為 OPS 10 倍、Cryoloop 3 倍)，因此以人胚使用較多。

開放式玻璃化胚冷凍效果普遍較封閉式者好一些或相當、更穩定，尤其對體積較大的卵及受精卵更為明顯，因為冷凍降溫及解凍回溫速率較快；惟開放式冷凍有可能污染微生物，採用前必須仔細評估。人胚因安全考慮，較不計較成本，逐漸有以封閉式為主趨勢。非人動物則普遍考量操作更簡單、成本較低、可大數目冷凍，因此以開放式為趨勢；可能的微生物污染則可以洗滌、酶處理、使用抗生素、消滅或去除透明帶而有效降低。

目前小鼠、牛及人的細胞、精子、胚、卵等玻璃化冷凍皆有不錯效果，並達例行性運作水準。豬胚則因脂肪含量高，早年以傳統方法冷凍時，水相、油相不相容而無法有效成功；1989 年，Hayashi 等利用脂肪含量極低的擴張期或已孵化囊胚以傳統方法冷凍成功，解凍後胚移置得有第一例仔豬。1998 年，Kobayashi 等成功玻璃化冷凍擴張期囊胚；隨後以高滲透壓玻璃化溶液配合快速冷凍或超低溫超快速冷凍可以成功冷凍豬桑椹胚、囊胚，解凍移置後可得到正常仔豬，惟早期胚仍因高脂肪含量而進展有限。1995 年，Nagashima 等將 2-4 細胞期胚高速離心，使脂肪與非脂肪分離，再以顯微操作技術將胚脂肪一個一個吸掉，胚冷凍解凍後移置得有仔豬。本法最大的問題是使用顯微操作，無法快速、批次作業，實用性欠佳。2004 年，Esaki 等將桑椹胚以 4%胰蛋白酶泡 3.5 分鐘使透明帶因部分被消化而膨脹，離心(12,000 $\times g$, 23 分鐘)後，脂肪與非脂肪可完全分開，玻璃化冷凍、解凍後可得到正常發育囊胚。本法不必使用顯微操作即可批次克服脂肪困擾，實用性大增；惟未來是否可為產業標準猶未可知。豬卵與透明帶間隙極小，使用高張溶液再離心亦未能有效批次去除脂肪，冷凍技術仍有待進一步研發。台灣目前尚未見正式發表冷凍豬胚產仔成功報告。

家畜(牛、羊)、實驗動物(啮齒類、兔)及人類細胞、精子、胚、卵等玻璃化冷凍雖已達可例行性運作的水準，惟仍有可改善空間；例如，更簡單化冷凍液配方、冷凍容器、冷凍過程等。又豬卵、胚冷凍

仍有待努力以使產業實用化。
(李坤雄撰/杜清富審)

ARTS