

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2007 ～ 2009  
 課題番号：19500364  
 研究課題名（和文）バイオリソース事業の展開に必須の、高圧法を用いた万能型受精卵凍結法の開発  
 研究課題名（英文）Utilization of the high pressure freezing as a gamete cryopreservation procedure for mammalian bio-resource maintenances  
 研究代表者  
 越本 知大 (KOSHIMOTO CHIHIRO)  
 宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・教授  
 研究者番号：70295210

研究成果の概要（和文）：多様な哺乳動物バイオリソース維持の費用対効果と確実性を高める支援技術として、高圧法を用いた生殖細胞の万能凍結保存の開発に着手した。電顕試料固定に用いられる高圧ガラス化凍結法を基礎に、大型の生殖細胞に応用するために、細胞毒性の低い凍結溶液条件を決定した。また融解時の脱ガラス化問題を克服するための物理条件測定系と微小チャンバーの改良を行い、本法の胚凍結保存技術としての可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：In order to maintain mammalian bio-resource colony, vitrification is an easy and reliable cryopreservation option, but limited types of cell can be frozen without a loss of viability because of unphysiological osmolality and chemical toxicity of freezing solution. On the other hand, high pressure freezing machine has been developed for the sample preparation for electron microscopic observation, by which a vitreous fixation of biological specimen is achieved. By using this engineering that were developed for microscopic sample preparation, we are devising a new cryopreservation technique where cryoprotectant is not required. Mouse zygote was frozen by using this apparatus with various cryoprotectant agents to optimize freezing solution with minimal toxicity. Freezing substitution was implemented and the samples embedded, sliced and stained under the regular procedures and observed by transmission electron microscope (TEM) to evaluate cell eumorphism. While many zygotes frozen with zero or lower concentration of cryoprotectant were fractured after high pressure freezing probably caused from pressure impact, However, when the concentration of permeable cryoprotectant higher than 1.5M, high pressure frozen zygotes maintain intact intracellular microstructures without fracturing or large ice crystal formation. We have firstly demonstrated that vitrified larger cell by high pressure method maintains an intact structures without forming ice crystal. This suggests that this new technique could be developed as universal cryopreservation protocol with very low cryoprotectant agents.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：凍結保存

## 1. 研究開始当初の背景

「生き物」が示す多様で複雑な生命機能を解析するためには、様々な実験動物が重要な研究素材となる。ナショナルバイオリソースプロジェクトに代表される生命科学研究の素材整備事業において、とりわけ哺乳動物はヒトの生命現象解明のための代替モデルとして特別な意味を持つ。しかしこれら実験動物は様々な選抜・淘汰圧力を受けた産物であり、生命現象に関連した多様性の欠如がリソースとしての欠点となりうる。その問題点を補完するため、遺伝的統御がなされていない幅広い野生哺乳動物種を選択すること、すなわち「多様性の拡大」は、哺乳動物バイオリソースの今後の方向性としての有力な選択肢であると考えられる。そこで我々は、マウス・ラットに近縁な野生齧歯類を中心としたバイオリソースの構築を試みてきた。この際、実務的な問題として、動物コロニーの維持における費用対効果や集団管理の確実性を高めることが肝要であると考えた。

## 2. 研究の目的

哺乳動物生殖細胞の凍結法は半世紀以上前に開発され、生物科学分野の基礎技術となってきた。しかし凍結保存が可能な哺乳動物種は、ヒト、ウシ、マウスなど限定的であり、これらの種においても個体差、系統差問題は克服されていない。多様な哺乳動物リソースの維持技術として凍結保存を適用するには、種を超えて再現性の高い新しい凍結技術の開発が必須である。受精卵の凍結保存にはガラス化法が多用されるが、それには生理条件から逸脱した超高濃度耐凍剤の添加が必須とされる。これは細胞に対して高い傷害性(毒性)を有しており、浸透圧ストレスと共に凍結可能な細胞種が限定される主要な原因となっている。従って高濃度耐凍剤を用いず細胞傷害性の低い溶液を用いたガラス化凍結が可能となれば、バイオリソース整備事業に有効な補助技術として広く活用可能であると考えた。

我々は 1) 電子顕微鏡の標本作成技術として開発された高圧ガラス化法に着目し、これを生物試料固定法としてではなく、細胞凍結保存技術として発展させる事を主な目的とし、2) あわせて齧歯類配偶子凍結等に関連する基礎的知見を集積することとした。

## 3. 研究の方法

1) 高圧凍結に関して、哺乳動物受精卵を、種を限定せずに安定してガラス化凍結できる系を開発するための基礎研究として、マウス受精卵をモデルとした。高圧凍結実験は電子顕微鏡試料作成用に開発された Bal-Tech HPM 010 High Pressure Freezer を用いた。従来、凍結保存法の開発研究で、その成否を判定するためには凍結融解を一つのプロセスとして捉え、融解後の試料の形態的・機能的正常性を指標とした判定が一般的である。すなわち一旦凍結した卵は、融解し常温に戻すまでは全くブラックボックス内にあり、凍結状態を直接評価する事は為されてこなかった。我々は液体窒素温度下で凍結状態の受精卵の微細構造を、低温置換法を用いて固定して観察する技術を開発してきた。本研究ではこの手法を用いて凍結保存のプロセスを (a) 冷却過程(常温→液体窒素温)と (b) 融解過程(液体窒素温→常温)の 2 段階に分けて、それぞれの過程で生じる問題点を個別に評価することとした。この事でも凍結および融解過程で受精卵が受けるダメージをそれぞれ個別に解決し、新技術開発にアプローチできると考えた。

1-a) 実験は、まず常法により体外受精で作出した 1 細胞期卵を、凍結溶液とともに既製の電顕試料用マイクロキャリア(直径 2mm、厚さ 0.3mm のアルミニウム製のトレー)に充填し、これを専用の金属ホルダーに挟み、凍結装置の加圧室内に固定して高圧凍結を行った。本法を用いる事で理論的には試料表面から 600  $\mu$ m 程度までが結晶を生じないガラス化状態の水が形成されると考えられており、通常細胞の高圧凍結には、凍結溶液として生理的条件の培養液を用い、耐凍剤は一切添加しない。しかし試料の形状、凍結溶液の量や粘性、混入した空気、与圧条件といった因子が結晶状態に影響する。実際、我々が行った予備試験では、細胞直径が 100  $\mu$ m 程度ある 1 細胞期受精卵の場合、生理的溶液のみでは安定したガラス化状態が得られない事が示唆されてきた。従って安定したガラス化を達成するために必要な耐凍剤の種類や濃度等の条件を検索しながら凍結試験を行うこととした。

1-b) 良好なガラス化状態を維持し受精卵を高圧凍結できる条件の検索とは別に、ガラス化した細胞にダメージを与えずに融解する条件を検討しなければならない。ガラス化状態にある氷を低速で融解すると、容易に結晶構造に相転移し(再結晶化現象)体積変化から細胞に損傷を与える。高濃度溶液の添加は脱ガラス化防止の有効な手段でもあり、一般的な手法でガラス化凍結した卵は 2000°C/分程度の加温率で融解しても脱ガラス化せずに融解画が可能で、細胞の生存性が維持される。とこれが高圧凍結法は試

料を低温固定する目的で開発されたため、耐凍剤を添加せず高圧でガラス化した試料を融解した場合に起こる現象についての知見は全くない。しかし耐凍剤濃度と融解速度から、脱ガラス化による細胞損傷の可能性が高いと予測された。脱ガラス化は、加温速度・細胞内外の塩濃度・細胞膜の物質透過性等の物理的パラメータと密接に関連しており、脱ガラス化を防止する条件についてはある程度予測することも可能で、その条件に合うように技術を洗練すべきと考えた。従って融解条件に関してはある程度の条件予測を行い、場合によっては耐凍剤の添加、もしくは加温速度の変更、卵への前処理などを実施しつつ脱ガラス化を防止する適切な条件を実験的に決定する必要があると予測された。

2) バイオリソース維持法としての有用性を高めるために野生種を含む齧歯類精子、魚類卵凍結に関連した基礎研究を並行してして実施した。

#### 4. 研究成果

1) 研究はまず高圧凍結過程で生じる物理的な細胞傷害の評価系の改善から開始した。すなわち高圧凍結され液体窒素温度下の大型細胞(マウス 1 細胞期受精卵)の形態を融解せずに観察するため、凍結試料の低温置換と電顕標本の作成条件の最適化に努めた。これにより、一般の緩慢凍結で用いる程度の比較的濃度の透過型耐凍剤(2M 濃度の DMSO)を添加して高圧凍結した試料および、生理溶液で凍結した対照試料は、ともに良好な電顕切片の作成が可能となり、細胞内の微小構造や氷晶の状態を評価するための再現性を高める事ができた。しかし一方で、1.5M濃度 Sucrose およびFicolと Sucrose を含むガラス化溶液である EFS40 を用いた高圧凍結試料では、低温置換時に耐凍剤(おそらく糖類)によって樹脂が硬化し、切片作成に不適な性状に変性することも明らかとなった。即ち、糖類添加試料における細胞内部構造の詳細な観察には困難なものと成るものの、これらの試料についても脱水収縮の様子や細胞表面の膜構造の変化と言った部分的評価は可能であると判断できた。

1-a) この系を用いて、高圧凍結法による凍結溶液の低(もしくは無)毒化を目的として、マウス 1 細胞期受精卵を用いた凍結試験を行った。凍結は耐凍剤の濃度を漸減しながら実施し、必要最小濃度を実験的に検索した。高圧法を数  $\mu\text{m}$  の通常サイズ細胞に適用した場合、生理的溶液のみでガラス化の達成が可能であるとされている。しかし直径  $100\ \mu\text{m}$  の巨大なマウス 1 細胞期胚を、生理溶液のみで高い再現性を以てガラス化することは不可能で、透過型耐凍剤の添加が必須で、凍結溶液の完全無毒化は困難であることが明らかとなった。しかしガラス化に必要な最低濃度は、緩慢凍結で求められる透過型耐凍剤濃度より低く、1.0M程度であったことから、

すなわち高圧法を利用することで、細胞に対しての毒性の極めて低い、従って細胞選択性の低い万能凍結溶液を用いて高圧ガラス化が達成できる事が示され(学会発表 9)、本研究の第一段階を完了することができた。本件に関しては現在投稿論文作成中である。

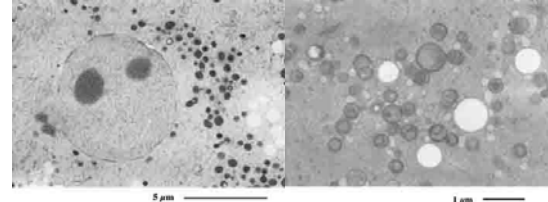


図 1 耐凍剤無添加(左)および 1 M DMSO 添加(右)で高圧凍結した、マウス 1 細胞期胚の核およびミトコンドリア構造 耐凍剤無添加では樹状の氷晶構造が観察され、ガラス化が達成されていないが、低濃度の耐凍剤添加によって、巨大細胞の高圧ガラス化凍結が高い再現性を以て達成される事が示された。

1-b) もう一方の問題点である細胞融解法については、手技的な問題からのサンプルロストが克服できず十分なデータ集積には至らなかった。しかしサンプルホルダの形状改善が進み、単位温度あたり熱容量を従来の 2.14J(図 2)から 0.40 Jにまで縮減したホルダ(図 3)の開発に至った。これにより理論的に加温速度を 5 倍以上に高める事が可能となった事や、超高速温度変化測定装置を本研究に適用するための極小プローブを改良したことで、融解時の問題点克服に向けた今後の展開に向けての整備ができた。

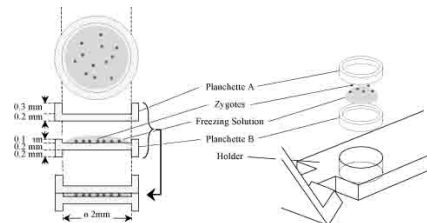


図 2 高圧凍結に用いた従来型の試料キャリア充填する溶液の体積が大きく、キャリア自体の熱容量も 2.14Jに達す事から、加温中の脱ガラス化が問題となると考えられた。

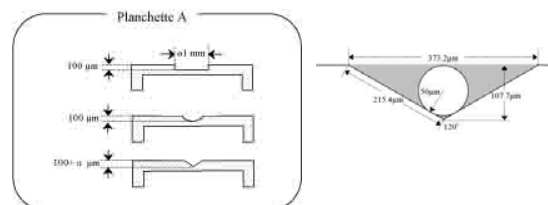


図 3 充填溶液の体積を極限まで縮小し、熱容量の減少を図るため、キャリアの形状を新みゆれーションした(左)。このことと、利用可能な金属加工技術との兼ね合いから、3 番目のキャリア(右)を試作し、凍結試験を開始した。

2) バイオリソース維持技術開発に関連して、齧歯類精子の凍結法に関する基礎データ収集を目的として、本学で維持する野生バイオリソースであるアレチネズミ亜科の精子凍結保存法の検索を行った。その結果、*Tatera indica*(インドオアレチネズミ)では浸透圧を450mOsmに調整したラフィノース濃度14-18%を含む希釈単純PBS液を用いて良好生存率の凍結精子が得られ、ハムスターテストによってその受精能力を始めて実証した(論文2)。さらに *Gerbillus perpallidus*(ウスイロアレチネズミ) のでも、450 mOsm に調整したラフィノース濃度14-18%を含む希釈単純PBS液を用いて良好な生存精子が得られる事が判明し、これら動物種のコロニーのバックアップに凍結精子が利用できる事を示した。また基礎研究として、マウス凍結精子凍結法に改良をくわえるため、そこに見られる精子凝集塊に着目し、凝集のメカニズムと融解後生存率に及ぼす影響を検討した(学会発表10)。その結果、精子凝集の主因が細胞膜表面の特定の糖鎖ではなく緩やかで一時的な結合であること(学会発表8)、遠沈処理によって分離し、融解後の精子運動率が向上する事(学会発表2)などを示した。さらに融解後の精子性状は、凍結溶液の糖濃度と浸透圧の影響を受けるが、スキムミルクは不要である事(学会発表3)、体外受精培地中のコレステロール受容体としてMethyl-β-cyclodextrinを1mM添加し、30-60分間前培養する事で受精率が向上し(学会発表6)、その効果に系統間差があり、B6系統で特に良好に機能すること(学会発表7)等、齧歯類精子凍結に関する基礎研究を進展させた。

さらに、高圧凍結法の応用を目指し、マウスおよび魚類卵の水透過性に関するパラメータ測定を行った(論文1、学会発表1,5)

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

- 1) K. Edashige, S. Ohta, M. Tanaka, T. Kuwano, D. M. Valdez Jr., T. Hara, B. Jin, S. Takahashi, S. Seki, C. Koshimoto, and M. Kasai: The role of aquaporin3 in the movement of water and cryoprotectants in mouse morulae. *Biol. Reprod.*, **77**(2): 365-75 (2007) Epub 2007 Apr. 11
- 2) C. Koshimoto, D. Watanabe, A. Shinohara, and T. Morita: Maintenance of fertility in cryopreserved Indian gerbil (*Tatera indica*) spermatozoa. *Cryobiology*, **58**(3) 303-307, (2009): Epub 2009 Mar. 5

[学会発表](計10件)

- 1) K. Edashige, S. Ohta, M. Tanaka, T. Kuwano, D. M. Valdez Jr., T. Hara, B. Jin, S. Takahashi,

S. Seki, C. Koshimoto, and M. Kasai. The Role of Aquaporin 3 in the Movement of Water and Cryoprotectants in Mouse Morulae. The 5<sup>th</sup> International Conference of Aquaporin 13-16 July 2007 Nara, Japan

- 2) C. Koshimoto, Y. Shichi, K. Edashige, M. Kasai, K. Mochida, and A. Shinohara. Simple technique to improve motility and fertility in frozen C57BL/6J mouse sperm. 44<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Cryobiology "CRYO 07" 28-31 July 2007, Lake Louise, Alberta, Canada
- 3) 持田慶司、相澤健太郎、田熊究一、金田秀貴、越本知大、枝重圭祐、太田昭彦、若菜茂晴、小倉淳郎:C57BL/6 系統マウス凍結精子におけるラフィノース濃度と浸透圧の生存性への影響について、第55回日本実験動物学会 仙台市(2008.5.15-17)
- 4) 細川由起、篠原明男、持田慶司、枝重圭祐、越本知大:凍結マウス精子の耐凍剤希釈・遠沈処理による精子回収率と運動性の改善に関する検討、第55回日本実験動物学会 仙台市(2008.5.15-17)
- 5) D. M. Valdez, Jr., R. Tsuchiya, S. Seki, N. Saida, C. Koshimoto, M. Kasai, and K. Edashige. Permeability to water and cryoprotectants of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes at mid stage III. 45<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Cryobiology "CRYO 08" 20-23 July 2008, Charlotte, NC, USA
- 6) K. Mochida, C. Koshimoto, K. Edashige, K. Aizawa, K. Taguma, A. Ohta, A. Ogura. Effects of Raffinose Concentration and Methyl-β-cyclodextrin on IVF with Cryopreserved C57BL/6 Sperm. 45<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Cryobiology "CRYO 08" 20-23 July 2008, Charlotte, NC, USA
- 7) 林和足、篠原明男、越本知大:近交系マウス凍結融解精子の培養地への methyl-β-cyclodextrin 添加の影響、第26回九州実験動物研究会 佐賀市(2008.11.15)
- 8) 細川由起、澤口朗、篠原明男、越本知大:マウス精液中に見られる精子凝集塊に関する研究、第26回九州実験動物研究会 佐賀市(2008.11.15)
- 9) 宮田亜里砂、澤口朗、井手惣幸、後藤嘉輝、森田哲夫、篠原明男、越本知大:胚の高圧ガラス化凍結法開発に関する研究、第27回九州実験動物研究会 熊本市(2009.11.14)
- 10) 細川由起、澤口朗、篠原明男、越本知大:精子回収液の違いがマウス精子の凝集に及ぼす影響、第27回九州実験動物研究会 熊本市(2009.11.14)

[図書](計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

越本 知大 (KOSHIMOTO CHIHIRO)  
宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・教授  
研究者番号：70295210

### (2) 研究分担者

葛西 孫三郎 (KASAI MAGOSABUROU)  
高知大学・教育研究部自然科学系・教授  
研究者番号：60152617

枝重 圭祐 (EDASHIGE KEISUKE)  
高知大学・教育研究部自然科学系・教授  
研究者番号：30175228