

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06816

研究課題名(和文)液体窒素およびドライアイスを用いないマウス胚と精子の保存および輸送法の新規開発

研究課題名(英文)Development of simple preservation and transportation method for mouse embryos and spermatozoa without liquid nitrogen and dry ice

研究代表者

持田 慶司(Mochida, Keiji)

国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソースセンター・専任技師

研究者番号：60312287

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウス凍結胚・精子の -40°C と -2°C での液体窒素やドライアイスを用いない簡易保管法の条件を確立した。また -5°C ～ 37°C の各温度での保管が可能な条件および方法を確立した。特に7日間冷蔵保管した受精卵および5日間の冷蔵保管中に宅配便輸送を行った受精卵からそれぞれ産子の作出に成功した。本技術により、マウスや凍結胚を欧米へ輸送する際の費用(20-30万円)が $1/10$ ～ $1/20$ に削減可能となった。更に発展的な研究として、精子の凍結感受性に関わる候補遺伝子を選抜することに成功した。以上より、凍結保存の機構解析および冷凍・冷蔵輸送の実用化への新技術を確立できた。

研究成果の概要(英文)：We established the conditions of simple preservation method for mouse embryos and spermatozoa without liquid nitrogen and dry ice at -40°C and -2°C . Then, we established the conditions and methods of preservation at temperature ranges from -5°C to 37°C . Especially, we succeeded to obtaining healthy offspring from both embryos which were stored in refrigerator for 7 days or transported using a commercial service at refrigerated temperature within 5 days. By these technical development, the expense of the transportation for mouse embryos from Japan to Europe or United States of America can reduce to $1/10$ - $1/20$. Additionally, we succeeded in choosing two candidate genes about cryopreservation sensitivity of the sperm as a more progressive study. Finally, we could establish several new technologies for practical use and mechanism analysis of the cryopreservation and the refrigeration transportation by this funded project.

研究分野：実験動物学

キーワード：凍結保存 冷蔵保存 胚 精子 マウス 輸送

1. 研究開始当初の背景

当施設は年間約 3000 件のマウス系統を世界中の研究者へ、生体もしくは凍結胚・精子として配布している。凍結胚の輸送には液体窒素の使用が必須だが、申請者は-80 でのドライアイスや超低温冷凍庫を用いた新規の保存および輸送方法を発表し (PLoS ONE, 2013、特許取得済み)、生殖・発生工学の教科書といえる『Manipulating the mouse embryo』にも掲載した。この方法は浸透圧が従来の倍以上高い溶液 (35 Osmol/kg) により細胞内の水分を極力除去し、死滅の原因となる細胞内氷晶の発生を抑制した。一方でマウス精子は 18%ラフィノースを含む水溶液で凍結され、体外受精への安定した利用法が確立してきた (Takeo ら, 2011、Hasegawa, Mochida ら, 2012) が、-80 より高い温度での凍結保存は不可能と考えられている。

2. 研究の目的

本研究の目的は細胞内氷晶の形成および保存液の毒性により不可能と考えられている -70 から 0、更に 0 から 40 の温度域で胚や精子を保存する技術の開発である。申請者は近年、野生由来マウス 37 系統の凍結胚保存技術 (PLoS ONE, 2014) および高浸透圧のガラス化溶液による受精卵の-80 保存技術を新規開発している。本研究では凍結温度での細胞内の氷晶形成を抑制する改善効果および冷蔵温度での最適な保管条件を検証し、液体窒素やドライアイスを使用せずに保存または輸送できるシステムの構築を行う。本技術は家畜やヒトおよび細胞への外挿、緊急災害時やフィールドワークおよび発展途上の国々など液体窒素が入手困難な状況でも応用可能と考えられる。

3. 研究の方法

以下の通りに、凍結胚および精子の凍結保存温度の検討、新鮮胚および精子の保管条件の検討を進め、最終的には安定で簡易な輸送方法の確立を進めた。

(1) 凍結胚の保存温度の検討：申請者が開発した高浸透圧のガラス化保存 (HOV: High Osmolarity Vitrification)法を主に用いて、-70 ~ 0 における保存可能な期間を調査し、保存液の各組成および浸透圧を修正してその効果を更に検討した。

(2) 凍結精子の保存温度の検証および凍結感受性に関わる候補遺伝子の検出：凍結精子の -70 ~ 0 における保存可能な期間を調査し、保存液の組成を修正すると共に、酸化還元試薬や細胞膜保護物質の効果を検討した。更に凍結に対する感受性の系統差を利用して、量的形質遺伝子座 (QTL) 解析により、関係する候補遺伝子の検出を行った。

(3) 新鮮胚の保管条件の検討：0 ~ 40 で 7 日間保管するために、体外受精で得られた 2 細胞期胚およびガラス化保存-加温回収した胚を用いて、保存溶液の組成や保存温度等の各種条件を調査し検討を行った。

(4) 新鮮精子の保管条件の検討：精巣上体組織を 0 ~ 40 で 3~7 日間保管するための各種条件を調査し検討した。

(5) ガラス化保存 - 回収胚の冷蔵輸送実験：ガラス化保存した胚を回収後に (3) で最適とされた条件で輸送実験を行い、実用性を検証した。

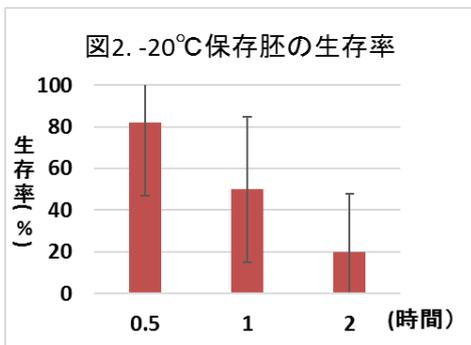
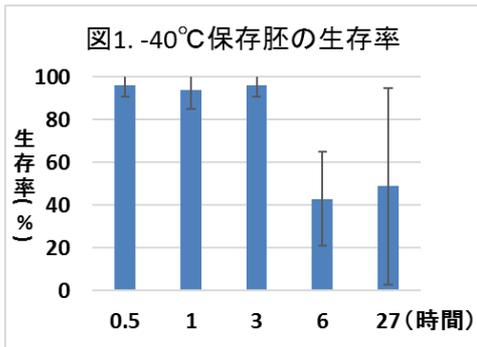
4. 研究成果

(1) 凍結胚の保存温度の検討：

一般的な DAP213 溶液を用いた方法は、融解途中で脱ガラス化する不完全なガラス化状態で細胞毒性が高いことからドライアイス温度 (-79)での保存は不可能であった。我々が高知大学と共同で開発したエチレングリコール (EG) をベースとする EFS 溶液の浸透圧を更に高めた HOV 法を用いたところ、ドライアイス温度での一定期間の保存が可能となり、ディープフリーザー (-80 設定) で 5 ヶ月間以上保存可能であった。

本実験では EG 濃度を 40-50%の範囲で調整した保存液を用いて、更に高い-40 および

-20 の保存可能期間を調査した。各保存液のうちHOV液が最も高い生存率を示し、-40で数時間から1日程度、-20では1時間以内の保存が可能である事が分かった(図1,2)。

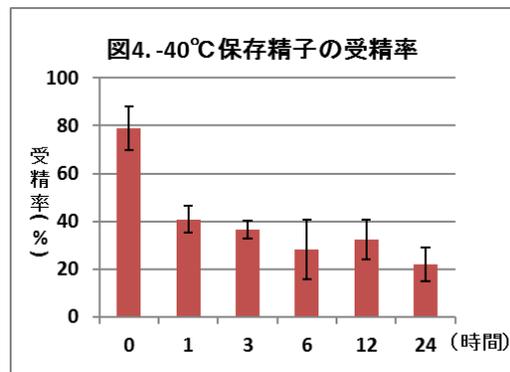
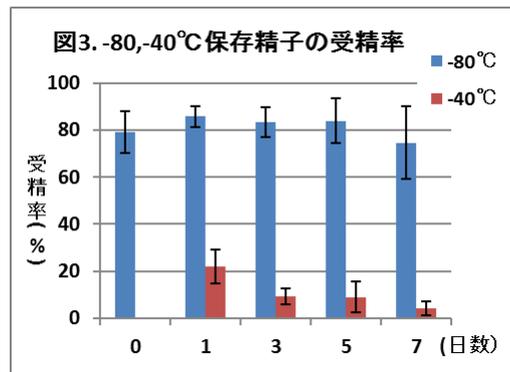


この結果から、アクシデント等により保存用タンクの液体窒素が枯渇した際に、一般的な凍結法では胚が直後に死滅してしまうのに対して、本法では数日間程度生存可能だろうと考えられる。また国内の輸送は24時間以内にほぼ行えることから、-40での宅配便輸送が可能と考えられた。更に寒剤(CaCl₂と氷)の利用で-27~-20の輸送容器の作成および1時間以内の簡易輸送が実現可能と考えられた。

一方で、凍結溶液中の氷晶形成を抑制する試薬(poly-L-lisine;PLL, Xanthan gum, Ficoll, sucrose等)の各濃度を含有する溶液を調整して冷却・加温過程での氷晶形成の抑制と凍結保護効果を検証したところ、氷晶形成の抑制に効果的であることを実証できた。しかし高濃度の溶液では細胞毒性作用も認められ、最終的に最適な保存液の組成を決定付けるには至らなかった。

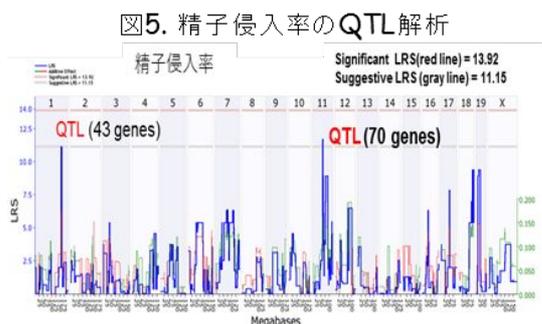
(2) 凍結精子の保存温度の検証および凍結感受性に関わる候補遺伝子の検出:

まず最適な精子凍結液の組成を明らかにするため、ラフィノースとリン酸緩衝液を用いて至適浸透圧を調査したところ、凍結後の生存精子率は400-525 mOsmol および15-21%のRaffinose濃度で40%以上と良好な成績を示した。また精子の細胞膜の損傷率をpropidium iodide染色により調べたところ、ラフィノース濃度が9-15%よりも18-21%で低い傾向があり、先体をpeanut agglutinin染色で調べると、ラフィノース濃度が15-18%で損傷度が低い傾向が認められた。また凍結時の急激な浸透圧変化を抑制するとされるPLLを10%含む保存液では、一般的な凍結液(R18S3)と同等以上の高い受精率、運動精子率、精子速度を示したことから、新規の精子保存液となる可能性が示唆されたが、再現性の調査が更に必要と判断した。



一方で、精子の凍結保存に対する感受性が大きく異なるC57BL/6JとDBA/2J系統およびそれらのリコンビナント近交系を用いて、新鮮及び凍結精子での受精率の差から量的形質遺伝子座(QTL)解析により、凍結保存に関

わるゲノム領域を推定できた(図5)。更に精巣での発現の有無および2系統間でのアミノ酸配列に多型が認められたことから、*Ab12*と*Nlrp3*を候補遺伝子として検出できた。



(3) 新鮮胚の保管条件の検討：

まずリン酸溶液(PB1)、胚培養液(CZB, KSOM)、修正したKSOMの各液に体外受精で得られた2細胞期胚を入れて3日間冷蔵した後に回収し、生存率(および体外での胚盤胞への発育率)を調査した。その結果、それぞれ100%(55%)、3%(0%)、27%(0%)、100%(62%)であった。保管条件の変更により、それぞれ100%(81%)、93%(44%)、99%(64%)、99%(90%)に改善された。またガラス化保存-回収胚を用いた場合でも100%(55%)、100%(10%)、98%(15%)、98%(73%)であった。特許取得の可能性があり詳細は公開できないが、試薬の添加など様々な条件検討を行った結果、最終的にはガラス化保存-回収胚を5日および7日間冷蔵保管した後に培養する事で60%および47%が胚盤胞へ発育する条件を発見した(図6参照)。



また、産子への発生能を調べるために胚移植を行ったところ

37%が着床し、13%が産子まで発生した。ガラス化保存-回収胚でも17%が着床し、7%が産子へ発生した。

(4) 新鮮精子の保管条件の検討：

精巣上体組織を摘出しミネラルオイル(Theriotology, 2005)、リン酸緩衝液、胚培養液および組織冷蔵保存液と耐凍剤の各種混合液に入れて主に冷蔵温度で3日間保存し、回収後に精子の活性を比較検討した。冷蔵温度では冷蔵保存液にEGを10%混合した溶液で最も生存精子率が高く、体外受精により58%と高い受精率が得られた。本実験では、精子を回収後に5時間以上培養する事で保存用液の効果の差が顕著となり、精子活性を比較するには最適な条件である事が分かった。更に長期間の保存試験を今後行う必要性を認めたが、実施には至らなかった。

(5) ガラス化保存 - 回収胚の冷蔵輸送実験：

研究協力者の鬼頭靖司博士が名古屋大学の施設長として赴任直後であるため、輸送実験は理研より発送して名古屋大学で受領後、再び理研へ宅配輸送を行った。具体的には、金曜日にガラス化保存胚を加温回収し、冷蔵庫にて保管。翌週の月曜日に理研より名古屋大学へ発送。火曜日に名古屋大学で受取り後、夕方に理研へ返送。水曜日に理研で受取り、回収した胚の一部を培養へ、残りを移植へ用いた。延べ5日間の冷蔵および輸送期間の輸送容器内の温度は7(±1.2)であり安定していた。輸送後の胚の回収率は88%と低く、胚の収納用のチューブはインナーキャップよりもアウターキャップタイプが望ましいことが理解できた。胚の生存率および桑実期胚率はそれぞれ90%および64%であり、輸送の有無による顕著な低下は認められなかった。胚移植後の着床率および産子への発生率は50%と15%であり、冷蔵輸送後の発生能が確認でき、輸送テストに成功した。

一般的に欧米諸国へマウス(片道輸送)やドライシッパー(往復輸送)を輸送すると、約20万~30万円の輸送費が掛かり、研究者

の負担は非常に大きい。本研究により、各デポジタリー施設で保存してある凍結胚を融解後に冷蔵梱包(1~1.5Kg/包)で送る事で、1.5万(米国)~2万円(欧州)の片道輸送費のみとなり、更に凍結胚を融解する手間も不要であることから、金銭的(1/10~1/20の負担金額となる)および技術的な容易性が格段に改善できた。

マウス胚の保存温度とその生存性について我々の成績を表1にまとめた。本研究の課題である-40 から 37 の範囲において、最も長期に保管できる温度は 7-8 であり、一週間以上の保管および輸送が可能であることが実証できた。

表1. マウス胚の各温度での生存性の結果

溶液の種類	各温度での生存性(◎良好、○可、△不良、×不可)									
	-198℃	-80℃	-40℃	-20℃	-5℃	0℃	3-5℃	7-8℃	37℃	
平衡液										
5D5E-PB1	×	×	×	×	△	△	△	-	-	
EFS20	×	×	×	×	△	△	△	-	-	
ガラス化溶液										
EFS40	◎	×	×	×	×	×	×	-	-	
EFS42.5c-d	◎	○	○	○	×	×	-	-	-	
EFS45c	○	○	×	×	-	-	-	-	-	
凍結液										
DAP213	◎	×	-	-	-	-	-	-	-	
培養液										
KSOM	-	-	-	-	△	△	○	◎	◎	
PB1	-	-	-	-	△	△	○	○	○	
輸送容器:	LN ₂	ドライアイス	-	氷+CaCl ₂	氷+NaCl	氷	魔法瓶			

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 7件)

Liu J, Mochida K, 他 3名, Identification of quantitative trait loci associated with the susceptibility of mouse spermatozoa to cryopreservation, 査読有, Journal of Reproduction and Development, Vol.64, No.2, 2018, doi: 10.1262/jrd.2017-148, pp.117-127

Hasegawa A, Mochida K, 他 5名, Efficient and scheduled production of pseudopregnant female mice for embryo transfer by estrous cycle synchronization, Journal of Reproduction and Development, 査読有, Vol.63, No.2, 2017, doi: 10.1262/jrd.2017-068, pp.539-545

Inoue K, Hirose M, Inoue H, Hatanaka Y, Honda A, Hasegawa A, Mochida K, Ogura A. The rodent-specific microRNA cluster within the Sfmbt2 gene is imprinted and

essential for placental development. Cell Report, 査読有, Vol.19, No.5, 2017, doi: 10.1016/j.celrep.2017.04.018

Hirose M, Hasegawa A, Mochida K, 他 13名, CRISPR/Cas9-mediated genome editing in wild-derived mice: generation of tamed wild-derived strains by mutation of the a (nonagouti) gene. Scientific Report, 査読有, Vol.7, 42476, 2017, doi: 10.1038/srep42476

Mochida K, Hasegawa A, Ogura A, Recent technical breakthroughs for ARTs in mice (Review). Journal of Mammalian Ova Research, 査読有, Vol.34, 2017, pp.13-21, DOI: 10.1274/jmor.34.13

Hasegawa A, Mochida K, 他 5名, High-yield superovulation in adult mice by anti-inhibin serum treatment combined with estrous cycle synchronization. Biology of Reproduction, 査読有, Vol.94, No.1, 2016, pp.1-8, doi: 10.1095/biolreprod.115.134023.

Ohtsuka M, Miura H, Mochida K, 他 9名, One-step generation of multiple transgenic mouse lines using an improved Pronuclear Injection-based Targeted Transgenesis (i-PITT). BMC Genomics, 査読有, Vol.16, 2015, 274, DOI 10.1186/s12864-015-1432-5.

[学会発表](計 22件)

Mochida K, Hasegawa A, 他 4名, "Rapid production of next generations by in vitro fertilization using spermatozoa from prepubertal male mice." Fourth World Congress of Reproductive Biology, 2017.

Hasegawa A, Mochida K, 他 5名, "Efficient and scheduled production of pseudopregnant female mice by progesterone injections" Fourth World Congress of Reproductive Biology, 2017.

Liu J, Mochida K, 他 4名 "Identification of quantitative trait loci associated with the susceptibility of mouse spermatozoa to cryopreservation." Fourth World Congress of Reproductive Biology, 2017.

持田慶司, 長谷川歩未, 小倉淳郎, 若齡雄を用いた体外受精による次世代マウスの早期作出, 日本実験動物技術者協会, 2017年.

Mochida K, Hasegawa A, Ogura A, "Development of ARTs at RIKEN BRC; 2.

Preservation of mouse embryos using a high osmolality vitrification (HOV) method in a deep freezer” SSR 2016 49th Annual Meeting、2016.

Hasegawa A. Mochida K, 他 4 名
“Development of ARTs at RIKEN BRC; 1. High-yield superovulation with anti-inhibin serum in mouse strains after estrous synchronization.” SSR 2016 49th Annual Meeting、2016.

持田慶司、理研バイオリソースセンターの
マウス胚・精子保存とバックアップ体制および
ガラス化保存の可能性について、
Cryopreservation conference 2016.

持田慶司、他 5 名、成熟マウスの性周期同
期化と抗インヒビン血清投与による過排卵
誘起法、日本卵子学会、2016 年.

持田慶司、他 11 名、抗インヒビン血清に
よる過剰排卵と凍結精子用の体外受精法を
用いた効率的な受精卵の獲得、日本実験動物
学会、2016 年.

持田慶司、他 11 名、野生由来マウス 3 種
(*M. musculus*, *spretus*, *spicilegus*) の効
率的な保存と産子獲得、日本実験動物学会、
2015 年.

持田慶司、他 2 名、マウス異種間での体外
受精と胚移植成績、日本繁殖生物学会、2015
年.

〔その他〕

ホームページ等

<http://ja.brc.riken.jp/lab/kougaku/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

持田 慶司 (Mochida, Keiji)

国立研究開発法人理化学研究所・バイオリ
ソースセンター・専任技師

研究者番号：60312287

(4) 研究協力者

長谷川 歩未 (Hasegawa, Ayumi)

国立研究開発法人理化学研究所・バイオリ
ソースセンター・テクニカルスタッフ II

鬼頭 靖司 (Kito, Seiji)

国立大学法人名古屋大学・動物実験支援セ
ンター・東山動物実験施設・施設長