

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：17104

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03933

研究課題名(和文)液体メニスカスによる卵膜保護が可能とする魚卵の冷凍保存の実現

研究課題名(英文)Cryopreservation of Medaka Eggs with use of Liquid Meniscus for Protecting Membrane

研究代表者

鶴田 隆治 (TSURUTA, TAKAHARU)

九州工業大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：30172068

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：実現が期待されている魚卵の凍結保存を目的とし、卵膜の親水性を利用した液体メニスカスと凍害防御剤の卵内導入を組み合わせた新たな凍結保存法を提案し、メダカ卵を対象にその可能性を検証した。メニスカスにはトレハロース水溶液を用い、卵内凍結前に粥状に凍結して保護膜とした。また、卵内凍結による損傷を低減するために、グリセリン水溶液を二本のキャピラリー管を用いて置換注入する方法を開発した。その結果、解凍直後には卵膜を含め、卵内組織の保存が確認できた。しかし、解凍後1時間を経過すると組織変化が生じ、孵化を確認するまでには至らなかった。解凍後の迅速なグリセリン除去が今後の課題である。

研究成果の概要(英文)：The cryopreservation of fish eggs is an important subject in the field of fishery and preservation of biological species. This study shows the effectiveness of using the liquid meniscus formed around the egg for protecting its morphology. Freezing and thawing experiments of medaka eggs were performed under different freezing conditions, and the hatching rate of the egg was examined. Before freezing, cryoprotective materials should be introduced inside the eggs in order to reduce the damages caused by ice formation. We have developed an effective method to introduce the aqueous solution of glycerin as the cryoprotectant with use of two fine-capillary tubes, which increased the supercooling and minimized the ice-damages. As a result, the preservation of egg tissue was confirmed at immediately after thawing. However, one hour after thawing, tissue change occurred and it was not possible to confirm hatching. Fast removal of glycerin after thawing is a future subject.

研究分野：熱工学

キーワード：凍結保存 魚卵 液体メニスカス 凍害防御剤 メダカ卵 置換導入

1. 研究開始当初の背景

魚卵の凍結保存は、水産業界における養殖の可能性拡大、および絶滅危惧種の保存の面からも重要な課題である。現在、生体卵の凍結保存に関して多くの研究がなされているが、凍結保存が可能となっているものの多くは哺乳類に限られている。哺乳動物の場合、卵の大きさは直径0.1mm程度であり、超急速冷却などの温度制御が容易であり、凍害防御剤の利用と冷却・解凍条件を組み合わせることにより凍結保存が実際に行われている。これに対して魚卵の場合は、サイズが大きく、卵内水分量も多いため、凍結時の氷晶成長による損傷を受け易いことや、厚い絨毛膜に覆われていることから凍害防御剤の卵内導入が困難なこと、さらには外気に暴露しての冷凍操作は出来ないことから懸濁液中での冷凍操作を行う場合に、卵外の氷晶成長による機械的損傷を受けることになるなど、技術的課題が多く存在するため、未だ魚卵の凍結保存技術は確立していない。しかしながら、卵膜を除去して卵内部の胚(割球)だけを取り出し、凍害防御剤に浸漬した後に凍結保存を行うと、通常の哺乳類と同等の高い孵化率になることや⁽¹⁾、魚卵内に導入した凍害防御剤が魚卵に悪影響を与えずに高い孵化率が得られた等の報告もなされている⁽²⁾。したがって、卵の形状を保つ絨毛膜の凍結保存と、適切な凍害防御剤を卵内に効率よく導入することができれば、魚卵の凍結保存の実現が期待できる状況にある。

2. 研究の目的

本研究の主たる目的は、ミリサイズに大きく、厚い卵膜に覆われている魚卵の凍結保存を実現することであり、そのための主因子を明らかにして対応策を検討できるようにすることである。

哺乳類の受精卵などでは、保護溶液中の浮遊細胞としての凍結保存法が超急速冷却によるガラス化法として確立されつつあるが、冷却性能から対象物の大きさに制限がある。また、ある程度の冷却性能を確保して急冷した場合には、水分凍結時の体積膨張により組織に機械的ストレスを与えてしまうなどの問題がある。これを改善するために、緩慢冷却と急速冷却を組み合わせた二段階式凍結法があり、最初に懸濁液中の卵細胞に緩慢冷却を行なって適度に脱水させ、卵内の水分量を減らした上で、その後の急速冷却により凍結させ、凍結時の体積膨張による機械的ストレスを抑えている。しかし、この二段階式凍結法でも成功率は約40%と高くはない。その理由としては、細胞を懸濁液中で凍結させるため細胞外部の溶液の氷晶成長により卵細胞が圧迫され、機械的損傷を受けることや、脱水を目的とした緩慢冷却では、細胞を低温下に長くさらすため、低温傷害を引き起こすこと、また外部溶液は熱抵抗にもなるため、細胞の冷却速度を上げることや、逆に下げて

外部氷晶の成長速度を制限することは困難である。

そこで、従来の二段階式凍結法の問題点を解決するため、先行研究として、図1に示すように、懸濁液中ではなく、卵表面が親水性であることと基板に疎水性を与えることにより、薄い液体メニスカスにより卵の外表面を包み、液中で行うよりも格段に熱容量を小さくした状態で冷凍操作を制御することにした。これにより、10mm程度に大きな魚卵(イクラ)に対しても解凍後に形状保存効果があることを確認している⁽³⁾。しかしながら、メニスカスによる卵表面の保護のみでは解凍後の孵化は確認できていない。この点に関し、メダカ卵について生命機能を喪失した原因を調査したところ、メニスカス凍結、すなわち外部溶液の凍結までは卵の孵化が確認できているが(図2のa-b-c-d-g過程)、卵内凍結まで行った場合には、解凍後の孵化は確認できていないことがわかった(a-b-c-d-e-f)⁽⁴⁾。よって、卵内凍結時の氷晶成長による細胞の損傷を抑制することが必要であり、卵内への効果的な凍害防御剤の導入によって、卵内の凍害防御剤濃度を高め、ガラス化状態へと導き、メニスカスを利用した凍結法と組み合わせることで実現し難い魚卵の凍結保存を成功させることを目的とする。

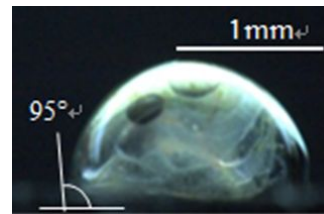


図1 メニスカスを用いた魚卵の保護

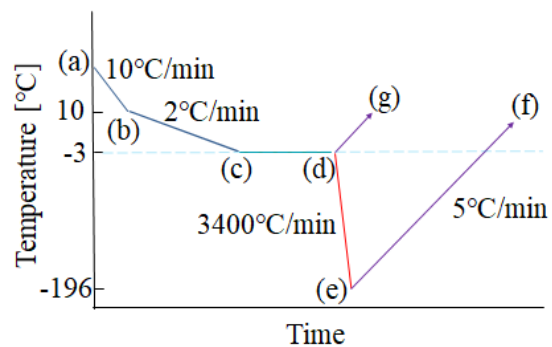


図2 冷却・解凍操作プロセス

3. 研究の方法

実験試料には、生体卵として飼育・繁殖が比較的容易であり、成長の段階が観察しやすく、四季に関係なく年中採取できるという理由からメダカの受精卵(直径約1mm)を用いることにした。受精後に開始する卵割が早く進行するため、そのステージを明確にしておく必要があるため、大まかに2通りの異なる成

長段階である stage 9~12 (桑実胚期, 受精後 5~10 時間) と stage 17~20 (神経胚期から 4 体節期, 受精 1 日後) の卵を使用した。また, 凍害防御剤には細胞膜透過型で過冷却状態になりやすく, 結晶化しにくい代表的なガラス形成物質であるグリセリンを用いた。その卵内への導入方法が本研究では最も重要となるため, 以下に示す二つの方法で卵内への凍害防御剤の導入を試みた。その導入量は温度走査型の示差熱量計 (DSC) を用いて凍結と解凍温度から評価するとともに, 凍害防御剤を導入した卵を用いてメニスカス凍結法により凍結と解凍操作を行い, 形態と孵化の有無を評価した。

(1) 浸漬処理による凍害防御剤の導入

細胞膜透過型凍害防御剤であるグリセリンを含んだ水溶液中に卵を浸漬させることにより, 受動的な膜透過によって卵内にグリセリンの導入を行う。グリセリン水溶液の濃度は 10, 20, 30% とし, 浸漬時間は 10 分から 60 分の間とし, それぞれの濃度, 浸漬時間における細胞への影響 (毒性など) を孵化率の点から評価する。また, 日立ハイテクサイエンス社の示差走査熱量計 DSC7020 を用いて, 各濃度におけるメダカ卵の凍結・融解温度を測定し, 未処理の卵の凍結温度との差からグリセリンの導入量を推定する。

(2) マイクロインジェクションによる導入

マイクロマニピュレーター (Micro Support 社) を使用し, ガラス製のキャピラリーによって卵の絨毛膜に貫通孔を開け, グリセリン水溶液を能動的に注入することで導入を行う。針の先端直径は 20~50 μm の範囲のものを使用する。まずは, キャピラリーによる穿孔のみを行って孵化率を調べ, 絨毛膜に貫通孔を設けても影響のないことを確認する。その上で, 実際に卵内にグリセリンを導入し, 浸漬処理の場合と同じく, 凝固点降下量から注入量を推定する。

4. 研究成果

(1) 浸漬処理による影響評価

まず, 受精直後の Stage 9~12 の卵を用い, 10% のグリセリン濃度において, 浸漬時間を 10 分間隔で変えた浸漬処理を行い, その浸漬時間に対する卵内凍結温度と孵化率を評価した。その結果, 浸漬時間が 20 分以上になっても卵内凍結温度はさほど変化しないこと, かつ浸漬時間が 20 分以内であればグリセリン浸漬の孵化に及ぼす影響は少なく, 8 割の卵が孵化すること, ならびに浸漬時間が 30 分になると急激に孵化率が低下することを確認した。そのため, 浸漬時間を 20 分と 60 分に設定し, stage 9~12 と stage 17~20 の卵を用いて, 再度, 凍結温度と孵化率を評価した。その結果を図 3 と図 4 に示す。また, 凍結温度の理論値との比較を行うため, 次の凝固点降下の式を用いて卵内の平衡凝固点と

の関係を検討した。

$$\Delta T = K_f m \quad (1)$$

その結果も図 4 に比較して示す。ここで, ΔT が凝固点降下度, K_f がモル凝固点降下度 (1.85K \cdot kg/mol: 溶媒が水の場合), m は質量モル濃度である。また, グリセリン水溶液の基準となる溶媒 (水) の凝固点 T_f , 融点 T_m は, DSC を用いて測定した精製水の凍結温度の平均値 -21.4 と, 融解温度の平均値 -0.8 を用いている。

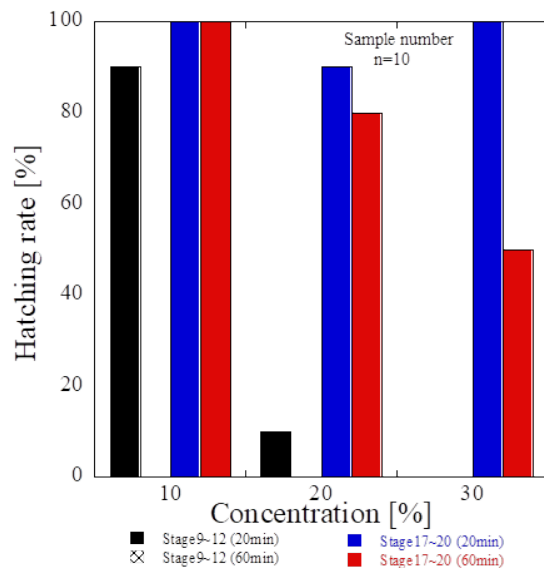


図 3 浸漬処理による孵化率

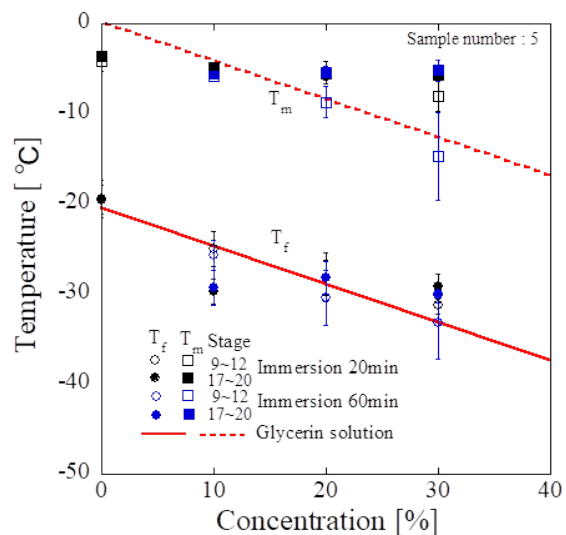


図 4 浸漬処理による凍結・融解温度

図 3 より stage 9~12 の卵はグリセリン濃度, 浸漬時間の増加に伴い, 孵化率が低下し, グリセリンが受精直後のメダカ卵に対して強い毒性を示すことが確認できる。これに対して, 受精からほぼ 1 日を経過した stage 17~20 の卵は, 濃度が 20% 以上に高くなっても孵化率が 80% 以上に高く, グリセリンの毒性への

耐性が生まれたものと判断できる。

図4に示した卵内凍結・融解温度については、stage 9~12の卵はグリセリン濃度の増加に伴い凍結温度 T_f 、融解温度 T_m とも低下しており、特に融解温度 T_m については浸漬時間を長くした方が低い温度で融解し、グリセリン水溶液の融解温度に近い値となっている。20分程度の浸漬処理でもグリセリン導入は可能であるものの、完全にグリセリンが卵内に導入されるには60分程の時間が必要であると考えられる。これに対して、stage 17~20の卵はグリセリン濃度を10%以上に高めても凍結・融解温度は変化していない。浸漬時間を増加させても同じ結果であることから、卵割が進んで組織が形成されてくると、グリセリンを吸収できる量が減少することがわかる。

(2) マイクロインジェクションの効果

浸漬処理の結果より、卵内にグリセリンを導入するには20分ほどの浸漬時間が必要であるが、浸漬時間の増加とともにグリセリンはかえって悪影響を及ぼすことが確認された。よって、短時間により効率的に凍害防御剤を導入する必要がある。マイクロインジェクションによる直接注入が重要となる。そこで、まず卵の絨毛膜に穴を開けても問題がないことを検証するため、異なる2つのステージの卵に穿孔のみを行い、孵化率を評価した。その結果、どちらの卵においても5割以上の孵化が確認できたため、穿孔の影響はそれほど大きくないと判断した。その上で、注入するグリセリン水溶液の濃度を50と80%に高め、DSCによる凍結・融解温度の測定を行った。その結果を浸漬処理の結果と合わせて図5に示す。なお、注入量はキャピラリー内の溶液体積から算出し、メダカ卵内に導入できる最大量を約0.3 μ Lとした。これは、これ以上の量を導入した際に、卵表面から液漏れが確認されたためである。

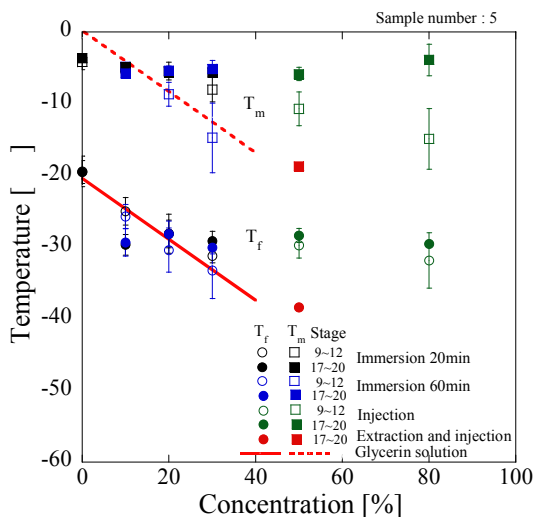


図5 マイクロインジェクションによる凍結・融解温度

最初に、一本のキャピラリーによるグリセリン注入のみを行なった結果を見ると、濃度50, 80%を注入した場合においても、卵内凍結温度は浸漬処理と同等(-30程度)であり、卵内濃度を高めることができていないことがわかる。融解温度についても同様であり、stage 17~20の卵ではほとんど導入が進んでいないことがわかる。硬い絨毛膜によって内容物が保持されている状況に、キャピラリーによって液を注入することは難しいと考えられる。

そこで、凍害防御剤の効果的な導入を行うために、卵内溶液と凍害防御剤とを置換する方法が有効であると考えた。キャピラリーを2本用いて、一方で卵内溶液の抽出を行い、もう一方で凍害防御剤を注入するといった新しい導入法を実施した。濃度50%のグリセリン導入を行ったところ、卵内凍結温度をグリセリンの平衡凝固温度に近い-38まで下げることができた。融解温度についても同様である。また、明瞭な凝固潜熱の低下も確認された。これらの結果から卵内溶液との置換を行うことが重要であることを明らかにすることができた。

(3) メニスカス凍結法の保存効果の検証

2つのステージの卵にグリセリン水溶液を注入した後、メニスカスにより卵膜の保護を行い、-3で植氷し、液体窒素に浸漬させるという図2の操作(a-b-c-d-e-f)で凍結・解凍を行った。その際の解凍前後の様子を図6に示す。上方の写真はstage 9~12の卵であり、下方はstage 17~20の卵である。また、(a)が凍結する前の卵、(b)がグリセリン50%水溶液を2本のキャピラリーによって置換注入し、凍結・解凍を行った直後の卵、(c)が解凍後1時間経過した卵の様子である。

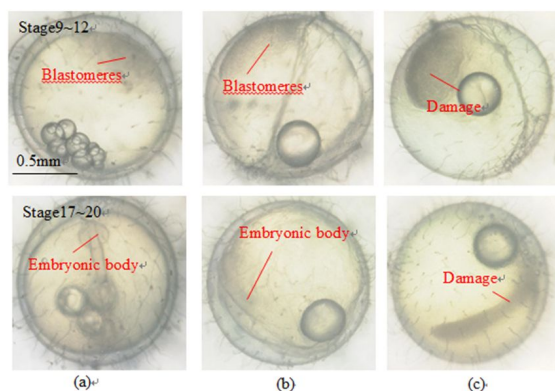


図6 解凍後のメダカ卵の形態

図6(b)を見て分かるように、解凍直後であれば凍結前と同じように胚盤や胚体などの細胞組織を確認することができる。しかしながら、解凍して1時間後には(c)のように胚盤や胚体などが損傷しており、全てのサンプルが死滅する結果となった。考えられる理由として、融解後に高濃度のグリセリンを処

理しなかったことが挙げられ、速やかに毒性を排除する必要があると考える。もちろん、更なる卵内凍結の改善と解凍操作の検証が必要であるが、本研究によるグリセリン導入法の開発によって、卵内凍結時の損傷を低減できたという意味は大きいと言える。

<引用文献>

- (1) C. A. Strussman, H. Nakatsugawa, F. Takashima, M. Hasobe, T. Suzuki, and R. Takai, Cryopreservation of Isolated Fish Blastomeres: Effect of cell Stage, Cryoprotectant Concentration, and Cooling Rate on Postthawing Survival, *Cryobiology* 39, 252-261 (1999)
- (2) J. Beirao, V. Robles, M.P. Herraiz, C.Sarasquete, M.T. Dinis, E. Cabrita, Cryoprotectant microinjection toxicity and chilling sensitivity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos, *Aquaculture* 261 (2006) 897-903
- (3) T. Tsuruta, Japanese Patent Disclosure 2012-123244 (2012), Patent NO.5939537 (in Japanese)
- (4) T. Tsuruta et al., *J. Thermal Sci. Tech*, vol11, No3 (2016)

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1件)

Takaharu TSURUTA, Hiroki SANA, Hirofumi TANIGAWA, Possibility of cryopreservation of medaka eggs using liquid meniscus, *Journal of Thermal Science and Technology*, 査読有, Vol.11, No.3, 2016, 8 pages,
DOI:10.1299/jtst.2016jtst0039

[学会発表](計5件)

大西寮, 鶴田隆治, 谷川洋文, メダカ卵の卵内凍結に及ぼす凍害防御剤の影響, 2017年度日本冷凍空調学会年次大会, 2017年

Hiroshi SANO, Hirofumi TANIGAWA, Takaharu TSURUTA, On a possibility of cryopreservation of medaka eggs with use of liquid-meniscus, The first Pacific Rim Thermal Engineering Conference, 2016.

松岡和生, 谷川洋文, 鶴田隆治, 界面前進凍結における溶質の有効分配係数に及ぼす凍結速度の影響, 日本機械学会熱工学コンファレンス 2015, 2015年.

佐野広樹, 鶴田隆治, メダカ卵の液体メ

ニスカスを用いた冷凍保存法の検証, 第52回日本伝熱シンポジウム, 2015年.

Takaharu TSURUTA, Akihiro KABASHIMA, Ryosuke IMAMURA, Hirofumi TANIGAWA, Effect of heat transfer rate on effective partition coefficient of solution in progressive freeze-concentration, The 26th International Symposium on Transport Phenomena, 2015.

[その他]

ホームページ等

<http://www.heat.mech.kyutech.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

鶴田 隆治 (TSURUTA, Takaharu)

九州工業大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号: 30172068

(2)研究分担者

谷川 洋文 (TANIGAWA, Hirofumi)

九州工業大学・大学院工学研究院・助教

研究者番号: 80197524