

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660261

研究課題名(和文) 哺乳動物初期胚の凍結乾燥保存の試み

研究課題名(英文) Studies on the freeze-drying of mammalian preimplantation embryos

研究代表者

加藤 容子 (KATO, Yoko)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：40278742

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マウスとブタの胚盤胞を用いて、凍結乾燥保存を試みた。マウス胚盤胞を用いた検討では、トレハロース添加溶液を用い元に戻す時に多量の等張液を用いることで、凍結乾燥後の胚盤胞の状態が改善されることがわかった。ブタ胚盤胞ではトレハロース添加区を含めいずれの検討区においても、凍結乾燥後、元に戻しても胚盤胞の形態は回復しなかった。以上の結果から、マウス胚盤胞では凍結乾燥保存できる可能性が示され、ブタではより工夫が必要であることが示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined whether pre-implantation stage embryos in mammals could be freeze-dried like sperm and somatic cells. When mouse blastocysts were freeze-dried, trehalose supplemented medium for freeze-drying and isotonic solution for rehydration were effective for their blastocoele recovery. For porcine blastocysts, no blastocysts recovered their blastocoele after rehydration in any approach.

研究分野：動物発生工学

キーワード：凍結乾燥 初期胚 哺乳動物

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物初期胚の保存は、1950年代から0～10°Cに静置する低温保存が試みられてきた。1970年代に凍結保存が成功してからは、初期胚の凍結ステージも様々検討され、現在では、未受精卵の凍結保存さえも可能となった。

しかしながら、凍結保存は、凍結融解の手法が煩雑であることや、管理が容易でないこと、また、震災等により保管タンクが損傷したり、液体窒素の供給が途切れたりすると保存が出来なくなる危険性もあるなど、必ずしも完璧な保存法ではない。

そのため、特に実験動物や家畜では、凍結乾燥法など、保存に大掛かりな装置の要らない方法を開発する必要があると考えられる。

凍結乾燥保存に関しては、1998年にマウス精子を凍結乾燥後にICSIして受精卵を作出し、個体発生に成功している。また、骨髄細胞を凍結乾燥後に核移植すると、染色体異常が高率に起きるという報告や、顆粒層細胞を凍結乾燥後に核移植すると、対照区と遜色なく胚盤胞へ発生するといった報告はあるものの、個体発生するかどうかは不明である。また、未受精卵の凍結乾燥に関しても、白血球や幹細胞と共に凍結乾燥に成功したと発表されているが、受精能や個体発生能については触れられていない。このように、哺乳動物精子や細胞の凍結乾燥は試みられているものの限定的であり、核移植などを行わない細胞そのままの生存性や個体発生を検討した確実な報告はまだない。

2. 研究の目的

上述の背景から、本研究では、哺乳動物の初期胚の中で割球サイズが小さい胚盤胞に着目し、これまで取り組まれていない凍結乾燥保存が可能かどうかを検討した。

本研究では、基礎的な条件設定から、有効と期待される添加物の探索をおこなった。すなわち、乾燥状態など取り巻く環境が厳しい状態になるとクリプトビオシスに入り、乾眠に備える昆虫類であるネムリユスリカやクマムシを参考に、その体内で

産生されているトレハロースなどを、凍結乾燥保護剤として使用できないか検討した。

実験では以下の検討をおこなった。

精子の凍結乾燥では染色体異常を防止すると考えられるEGTAを添加し、塩化ナトリウムを除外したETBS溶液(m-ETBS溶液)が利用されている。そのため、本実験においても、この溶液を用いて検討した。

既報で使用された体細胞や精子と比較し、初期胚では操作スケールが小さい。凍結乾燥時間は、サンプルの種類や凍結乾燥器の種類や条件によっても異なり、既報の精子では、4～6時間凍結乾燥しており、体細胞の凍結乾燥では3～72時間と処置時間の幅が広い。本実験で用いる胚盤胞では、凍結乾燥後にそのまま培養し、生存性を検討するため、細胞膜への損傷を軽減する必要があり、凍結乾燥時間はできる限り短くする必要がある。そこで、まずはマウス胚盤胞における凍結乾燥の最適時間を調べた。

既報の精子の凍結乾燥では、rehydration後はICSIにより生存性が検討されているが、本実験では、胚盤胞の生存性をそのまま検討するため、浸透圧ショックなどを回避し、細胞膜へのダメージを刺激せずできる限り抑制する必要がある。そのため、rehydrationから体外培養に戻すまでの前培養の効果ならびに前培養温度の検討を行った。

また、培地添加物の影響を検討した。FBSは培地の緩衝作用を強める働きがあり、トレハロースは乾眠を行うネムリユスリカやクマムシといった昆虫の体内で合成される糖類でガラス化しやすくガラス転移温度が高い性質を持つ。トレハロースの添加により、精子、体細胞、赤血球や血小板などは、rehydration後も代謝活性を維持すると報告されている。また、自然素材のハチミツには強い保湿効果があるため、ハチミツの影響も検討した。

通常、Rehydration時には滅菌水を加えるが、浸透圧変動を抑制するため、水の代わりに多量の等張液を添加することで細胞膜への損傷

を抑制できないか検討した。

なお、本研究では、実験の利便性からマウス胚盤胞とブタ胚盤胞を用いて検討した。

3. 研究の方法

(1) マウス胚盤胞を用いた検討：

ICR 系マウスに過剰排卵処理を施して得た受精卵を体外で胚盤胞まで育てて使用した。

- ① 溶液の検討：既報で精子や体細胞の凍結乾燥実験に用いられてきた m-ETBS 溶液がマウス初期胚の生存性に及ぼす影響を検討した。すなわち、胚盤胞を m-ETBS 溶液に 5 分～2 時間、浸漬したのち、通常の培地へ戻して体外培養を継続し、胚盤胞の形態を観察して生存性を判定した。
- ② 凍結乾燥時間の検討：凍結乾燥時間を 2～6 時間に設定し、検討した。
- ③ 前培養温度の検討：rehydration 後の前培養の検討を行った。すなわち、rehydration 後に直接 37 度へ静置するのではなく、rehydration 時の温度（4 度）で一晩静置してから体外培養した。
- ④ 添加物の影響：血清(FBS)やトレハロース等の影響を検討した。FBS の検討では、BSA の代わりに 10% FBS を添加して影響を検討した。トレハロースは 0.5～1.0M 添加して影響を検討した。
- ⑤ Rehydration 法の検討：Rehydration 時、水の代わりに等張の培養液を添加し影響を検討した。トレハロース添加・無添加区を設けて検討した。

(2) ブタを用いた検討

繊維芽細胞を用いた検討：トレハロース添加の影響を検討した。

胚盤胞を用いた検討：食肉センターから持ち帰った卵巣を使用した。卵巣から未成熟卵子を採取し、MII 期まで体外成熟培養を行った。成熟培養後に得られた MII 期卵に単為発生刺激を付与し、7 日間体外培養し、得られた胚

盤胞を供した。

- ① トレハロースの影響：0.025～0.5M のトレハロースを添加して検討した。
- ② ハチミツの影響：5%程度 of ハチミツを添加した。
- ③ FBS の影響：10%FBS を添加して検討した。

4. 研究成果

(1) マウス胚盤胞を用いた検討：

rehydration 後の胚盤胞は、rehydration 直後、24 時間後、48 時間後に観察し、形態により 5 段階に区分した（形態が良いものから A～E ランクに振り分けた）。

- ① 溶液の検討：それぞれ 71～166 個の胚盤胞を用いて検討した。m-ETBS 溶液に浸漬する時間は、30 分を越えると胚盤胞の生存性が有意に低下したため、15 分が適切であると判断された。
- ② 凍結乾燥時間の検討：それぞれ 226～388 個の胚盤胞を用いて検討したが、rehydration 後の培養時間が 24、48 時間と長くなるにつれて、胚盤胞の形態は、A ランクと判定されたものからほとんどが C ランク以下へと移行し悪くなった。いずれの胚盤胞もトリパンブルー染色に陽性となり、細胞膜や透明帯の損傷がみられた。胚盤胞の細胞数は対照区と比較して減少する傾向があった。検討区の中では 4 時間が比較的適切であると判定された。
- ③ 前培養温度の検討：Rehydration 後、4 度で一晩前培養しても胚盤胞の形態に改善はみられず、各区それぞれ 48～69 個の胚盤胞を用いて検討したところ、rehydration 直後でも A ランク胚は 22～30%で、ほとんどが D、E ランクであった。24 時間後は A ランクがほとんどなくなり、殆ど効果がないと思われた。いずれの胚盤胞もトリパンブルー染色に陽性となり、細胞膜や透明帯の損傷がみられ

た。胚盤胞の細胞数は対照区と比較して減少する傾向があった。

- ④ 添加物の影響：394 個の胚盤胞を用いて検討した。FBS を使用すると A ランクは 17.5%と低くなった。トレハロース添加区では、それぞれ 90~119 個の胚を検討し、トレハロース添加区で A ランク胚が 6.8~34.7%であった。いずれの胚盤胞もトリパンブルー染色に陽性となり、細胞膜や透明帯の損傷がみられた。胚盤胞の細胞数は対照区と比較して減少する傾向があった。
- ⑤ Rehydration 法の検討：トレハロース添加区 90 個、無添加区 110 個の胚盤胞を用いて検討した、rehydration 時に等張の培地を用いると、A ランク胚が 58.5%となり、A、B ランクを合わせて 90%以上となった。しかしながら、24 時間培養すると A、B ランクを合わせて 20%程度と減少した。いずれの胚盤胞もトリパンブルー染色に陽性となり、細胞膜や透明帯の損傷がみられた。胚盤胞の細胞数は対照区と比較して減少する傾向があった。

以上の結果より、m-ETBS 溶液にトレハロースを添加し、KSOM 培地 rehydration を行うことで、マウス胚盤胞を凍結乾燥できる可能性が示唆された。今後は移植後の胎子への発生能や核移植等により核の全能性や多能性を検討する必要があると考えられる。

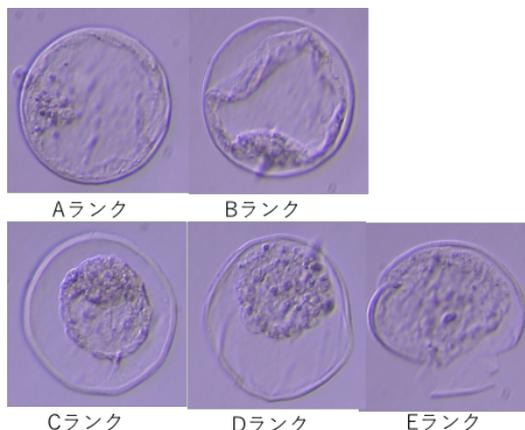
(2) ブタを用いた検討：

- ① 繊維芽細胞では、いずれの濃度であっても、トレハロースを添加すると rehydration 後の生存性が向上した。
- ② ブタ胚盤胞では、トレハロース添加、ハチミツ添加、FBS 添加いずれの区においても、rehydration 後に生存胚盤胞はみられなかった。

以上の結果から、マウス胚盤胞では、トレハロースを用いて、rehydration 時に等張液を用いることで、凍結乾燥後の胚盤胞の状態が

かなり改善され、凍結乾燥保存できる可能性が示された。今後、凍結乾燥後の胚盤胞の生存性について詳細に検討する必要がある。

また、ブタ胚盤胞ではいずれの検討区においても胚盤胞の生存がみられなかった。その理由として、ブタ胚盤胞は、GV 期から MII 期まで体外成熟培養後、単為発生により作出した胚であるため、凍結乾燥に供試した胚盤胞の生存性が元々高くなかったことが考えられる。また、初期胚の凍結保存では、種により感受性が異なることが知られているが、凍結乾燥過程に対しても、同様に感受性が異なる可能性も考えられる。



凍結乾燥後のマウス胚盤胞の形態

5. 主な発表論文等

なし (準備中)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 容子 (KATO, Yoko)
近畿大学・農学部・教授
研究者番号：40278742

(3) 連携研究者

谷 哲弥 (TANI, Tetsuya)
近畿大学・農学部・講師
研究者番号：70319763

(4) 研究協力者

田口 美里 (TAGUCHI, Misato)
近畿大学大学院・農学研究科・
博士前期課程修了(2016年度)