

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22500393

研究課題名（和文） 耐凍剤および氷結晶の3次元計測に基づく生殖組織の凍結保存

研究課題名（英文） Freeze preservation for reproductive tissue on Three Dimensional Measurement of cryoprotectant and ice crystal

研究代表者

都 甲洙 (DO GABS00)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：40385993

研究成果の概要（和文）：

本研究では、生殖細胞の最適な凍結法を解明するために、近赤外分光イメージングにより耐凍剤の濃度差および耐凍剤の浸透挙動の計測法、生体組織内の氷結晶の計測法を開発し、この手法により耐凍剤を浸透させた生体組織内の氷結晶を計測し、耐凍剤の効果を評価した。本手法は、「耐凍剤」「氷結晶」「細胞破壊」などの相互関係による生殖組織の最適凍結保存法を解明するツールとして応用されることが考えられる。

研究成果の概要（英文）：

The cryoprotectant is commonly used to protect reproductive tissues during freezing and thawing. As an effort to investigate the osmotic behavior of cryoprotectant, near-infrared (NIR) techniques were applied to monitor the concentration of ethylene glycol (EG) within reproductive tissues. The proposed method provided a novel tool to investigate the optimal freezing method of reproductive tissues on cryoprotectant, ice crystals and cell destruction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2011年度	300,000	90,000	390,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：凍結保存

1. 研究開始当初の背景

生殖細胞の凍結操作は、生体の70%以上を占めている「水」および組織の相変化である。このため、生殖細胞の凍結操作は、「凍結中」「保存中」「解凍中」におけるオリジナル内部状態（氷結晶、細胞）を解析した上、解明すべきである。しかし、「凍結中」「保存中」「解凍中」における生殖組織の内部状態、特

に、氷結晶の定量的な解析が不可能であったため、従来は、凍結条件のみを変化し、解凍後の細胞生存率を評価した。いわゆる、現在、実用化されている凍結保存法は、研究者の長年の経験により提案されたものであるとも言える。このような多くの研究者の経験による見解は、「耐凍剤の相変化および氷の再結晶による細胞の破壊メカニズム」が解明され

ていないからであった。この細胞破壊現象を解明するためには、まず、耐凍剤の相変化および生殖組織の70%以上を占めている「水」、いわゆる、再結晶により細胞を破壊する「氷結晶」の状態を計測し、解析することであると考えられる。生殖組織内の氷結晶観察法は、直接・間接法などいろいろな方法があるが、氷結晶は無色透明で、その計測が難しく、「凍結中」「保存中」「解凍中」における試料の内部状態、特に、オリジナル氷結晶の定量的な解析が困難であった。このため、研究開始当初は、生殖細胞の凍結操作において「耐凍剤」「氷結晶」「細胞破壊」などの相互関係の定量的な計測が不可能であった。

2. 研究の目的

本研究では、生殖細胞の最適な凍結法を解明するために、近赤外分光イメージングにより耐凍剤の濃度差を計測法、生体組織内の氷結晶の計測法を開発し、この手法により耐凍剤を浸透させた生体組織内の氷結晶を計測し、耐凍剤の効果を評価することにある。具体的には、耐凍剤としてエチレングリコールを(EG)選び、(1)近赤外分光法によるEG水溶液の濃度別吸収スペクトルを計測、(2)近赤外イメージング法によりEG水溶液の濃度差を計測、(3)マウス卵巣組織におけるEGの浸透および濃度分布の計測法を開発、(4)生体組織内の氷結晶計測法の開発、(5)EGを浸透させた生体組織内における氷結晶を計測し、耐凍剤の効果を評価することにある。

3. 研究の方法

(1) 近赤外分光およびイメージング装置

近赤外分光には、近赤外分光計(Bruker社、MPA FT-NIR)を用いた。近赤外分光計は、従来の装置に冷却機能を取り付け、試料温度を一定に制御可能とした。試料温度は、冷却装置内部のペルチェ素子と冷却水を循環させることにより、常温から -15°C の範囲で制御される。近赤外分光イメージング装置は、近赤外照射部、冷却部、分光観察部で構成される。近赤外照射装置

(LA-100IR, 林時計工業社)は、近赤外線反射ミラー付きハロゲンランプと可視カットフィルタ(800 nm以上透過)を内蔵し、近赤外領域の光で試料を照射する。冷却部は、凍結・乾燥真空冷却過熱システム(1008S, リンカム社, 英国)を用い、室温から -190°C の範囲で温度変動幅 ± 0.5 で制御可能である。分光観察部は、バンドパスフィルタを内蔵した正立型顕微鏡(BX51-LI, オリンパス社)および液晶チューナブルフィルタ(VS-NIRI1-10-LC-20, Cambridge Research & Instrumentation, Inc., アメリカ)と近赤外カメラ(XEVA-USB-60Hz, Xenix, Leuven, ベルギー)で構成され900~1,700 nm範囲の

分光画像を撮影する。

(2) 極低温マイクロスライサスペクトルイメージングシステム

生体材料内の氷結晶は、極低温マイクロスライサスペクトルイメージングシステム(Cryogenic Micro-Slicer Spectral Imaging System: CMSIS)により計測した。CMSISは、試料を連続的に切削するマイクロスライサ部、連続切削により得られた断面画像の取込部、二つの試料の冷却部、3次元画像処理部から構成される。試料の断面情報を可視光画像および近赤外分光イメージングによる分光画像を同時に取得することが可能である。二つの試料の冷却部は、液体窒素の流量と銅柱に内蔵された電熱ヒーターにより銅柱の上端を室温から -80°C の範囲で一定値に制御可能である。

(3) 耐凍剤濃度算出法

近赤外分光装置を用い、EGの吸収波長帯から吸収波長を特定した。この吸収波長を近赤外分光イメージングに適用し、EG水溶液の濃度別および卵巣組織におけるEG浸透挙動の分光画像を取得した。EG水溶液は、石英製のサンプル容器(内径15, 深さ2, 厚さ0.5mm)にEG水溶液(厚さ1mm)を流し込み、カバーガラスをかけ、分光画像を取得した。卵巣組織におけるEG浸透挙動の計測には、6週齢のマウス(ddY)卵巣組織を用いた。卵巣組織は、石英製のサンプル容器に入れ、組織の上部にカバーガラスを密着させ、厚さ1mmになるように調整し、EG 50 wt%を流し込み、その浸透挙動の分光画像を取得した。

(4) 生体組織内氷結晶の計測

生体組織として、生牛肉の筋繊維(直径4mm, 長さ20mm)を用いた。筋繊維は、EG水溶液0 wt.%, 10 wt.%, 20 wt.%, 30 wt.%, 40 wt.%, 50 wt.%に、120min浸透させ、ドライアイスと液体窒素で凍結した。ドライアイスの凍結は、ドライアイス上面に厚さ30mmの銅版を設置することで、銅版の温度を -77.3°C で維持した。液体窒素凍結は、ステンレスデュワー瓶に液体窒素を入れ、厚さ30mmの銅版を設置することで、銅版の温度を -195.6°C で維持した。試料は、ドライアイスと液体窒素に設置した銅版の上で60min凍結した。

4. 研究成果

(1) EG水溶液の吸収スペクトル

EG水溶液吸収スペクトル計測には、0 wt.%(水)、20 wt.%, 40 wt.%, 60 wt.%, 80 wt.%, 100 wt.%のEG水溶液を用いた。計測波長間隔は1nmで、一計測あたりのスキャンは32回で、計測時のEG水溶液の温度は 25°C を維

持した。図1にEG水溶液の濃度差による吸収スペクトルを示す。EG (EG100 wt%) の吸収ピークは1390 nm~1670 nmの波長範囲で1586 nmであり、水 (EG0 wt%) の吸収ピークは1360 nm~1600 nmの波長範囲で1460 nmであることが確認された。近赤外分光イメージングは、その吸収ピークの波長を用いることが望ましいが、本研究ではEG水溶液を「水」と「EG」の2成分系モデルと見なし、EG水溶液の分光画像の取得に、水の吸収ピーク波長に近い1450 nmの汎用型バンドパスフィルタを採用した。

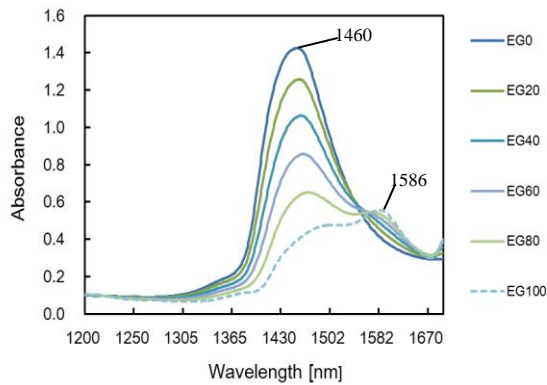


図1 EG水溶液の吸収スペクトル

(2) EG水溶液の計測

分光画像は、階調度が4,096階調(12 bit)、の解像度が、320×256 pixelで実寸法が560×420 μmであった。EG0 wt.%の分光画像の輝度は低く(暗く)、EG100 wt.%の分光画像の輝度は高く(明るく)観察された。近赤外分光イメージングは、従来の1つの受光部によるポイント測定であった近赤外分光法を2次元・3次元計測に拡張し、CCDカメラおよび赤外線カメラの各画素を分光器の受光部として扱うことにより、対象成分の定量・定性分析およびその分布の可視化を行う手法である。この手法を2成分系溶液可視化に用いる場合、1つの溶液の吸収波長を特定し、分光イメージングに適用する。本研究では、近赤外分光イメージングにより水分子の官能基の吸光度(1450 nm)を計測し、EGを算出することにある。EG水溶液濃度別の分光画像は天体観測手法で補正し、吸光度の定義に従い、式(1)を用いることで、補正画像の各画素の輝度値を吸光度に変換した。

$$A = -\log\left(\frac{C_i}{M}\right) = \log\left(\frac{M}{R}\right) \quad (1)$$

ここで、 C_i は補正画像、 M は標準白色板の平均輝度値、 R は補正画像の各画素の輝度値である。

吸光度は、EG0 wt.%が2.901で高く、EG100

wt.%が2.419で低かった。図2に水溶液吸収スペクトル計測(1460nm)におけるEG水溶液濃度別の吸光度と分光画像(1450nm)の吸光度変換における吸光度の差を示す。両者はEG濃度が高くなるにつれ吸光度が低下した。以上により、近赤外分光イメージングで得られた分光画像の画素を吸光度に変換することにより、EG水溶液濃度差の計測が可能になった。

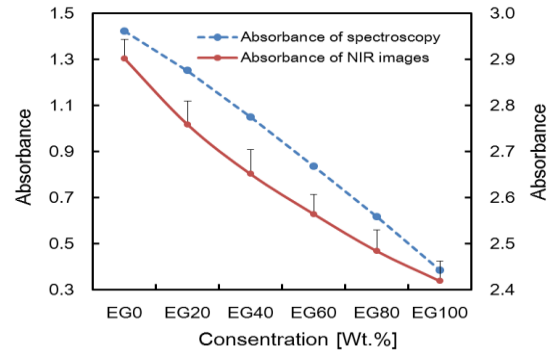


図2 近赤外分光法と分光イメージングの吸光度, average + SD (n=81,920)

(3) 卵巣組織内のEG浸透の計測

マウス卵巣組織内へのEG水溶液浸透の計測については、(1)節で述べたEG水溶液を水とEGの二成分系溶液と見なしたように、卵巣組織内におけるEGと水分を浸透圧による二成分の置換挙動として計測した。図3にEGの浸透時間における吸光度変換画像(1450 nm)を示す。吸光度画像(図3-a)は、吸光度が低い部分と吸光度が高い部分に大きく分けられた。これらの吸光度画像は、水の吸収波長により得られた分光画像を吸光度に変換しているため、水分の少ない部分の吸光度が低く、水分の多い部分の吸光度が高くなる。EGの浸透時間が長くなるに伴い、水分の減少が見られた。細胞への耐凍剤透過速度は、水の透過速度より遅いため、胚を耐凍剤に浸すと細胞内外の浸透圧が等しくなるまで水分が流出し急速に収縮する。その後、細胞内外の耐凍剤濃度が等しくなるまで耐凍剤と水分が細胞内に流入して徐々に体積が回復すると知られている。これにより、EG50 wt.%に浸された卵巣組織は、水の吸収波長(1450 nm)による分光計測においてEG、卵巣組織、EG浸透時間によってそれぞれの光吸収が異なると考えられる。近赤外分光イメージングによるEG水溶液(2節)の濃度計測と上述した卵巣組織へのEGの浸透圧を考慮すると、吸光度画像(図3-a)における吸光度の低い箇所はEG(左側帯状)で、吸光度の高い箇所は水分を多く含んだ卵巣組織であると言える。また、EG浸透時間経過とともに卵巣組織内の水分減少は、EGの浸透圧により水

が排出されることであると考えられる。以上により、近赤外分光イメージングは、卵巣組織における EG 浸透挙動の計測に有効であることが確認された。

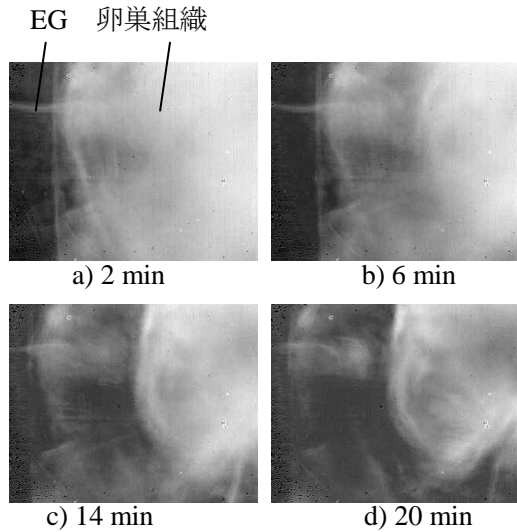


図3 EG 浸透における吸光度

(4) 卵巣組織内の EG 濃度分布算出

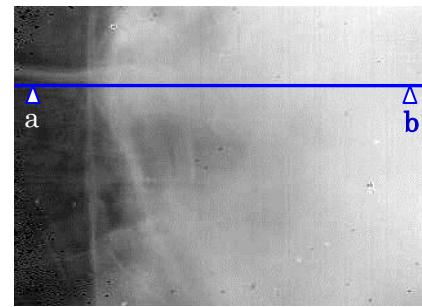
図4の上段にEG浸透時間2minにおけるEG吸光度画像を下段に任意箇所(ライン)における吸光度を示す。浸透時間2minの場合、卵巣組織(図4)のb点前後における吸光度の変化は大きく見られなかった。このことは、卵巣組織内にEGの浸透がほとんどないことを表している。また、その吸光度はEG(図4,上段a点)が0.0143で、卵巣組織(図4,上段b点)が0.3511であった。以上により、卵巣組織における水分吸光度が数値化されたので、次のような仮定を設け、卵巣組織内のEG濃度分布の数値化を試みた。卵巣組織(図4,上段b点)の吸光度が0.3511であるが、EGの浸透がないと仮定し、EG0wt.%とした。これにEG(図4,上段a点)の濃度50wt.%とその吸光度0.0143を加えた。Lambert-Beer法則の吸光物質濃度と吸光度の関係およびイメージングデバイスの特性を考慮し、図2に示したEG0からEG60区間における分光画像吸光度の回帰式(式2)を用いることで、EG濃度を算出した(式3)。

$$Y = 0.00005C^2 - 0.0081C + 0.3511 \quad (2)$$

$$Y = 103.56A^2 - 189.3A + 53.8 \quad (3)$$

ここで、CはEG濃度、Aは吸光度である。EG浸透時間ごとの任意ラインにおけるEG濃度の分布を上記の算出式より求め、図5にプロットした。EG浸透時間2minの場合、卵巣組織内においてEG濃度が低く算出された。浸透時間20minの場合、卵巣組織内(図4,

上段b点)のEG濃度は32wt.%で算出された。分光画像の吸光度を数値化、EG濃度分布を算出し、浸透時間ごとの任意のラインにおけるEG濃度分布を求めた。これにより、従来の近赤外分光法より水およびEG吸収波長を特定し、EG水溶液を「水」と「EG」の2成分系モデルに置き換え、水の吸収波長を近赤外分光イメージングに適用し、さらに、EGの浸透圧による卵巣組織内のEGと水分の置換挙動、いわゆる、分光画像における水分挙動をEGの浸透として捕らえることで、EG濃度分布が算出された。



immersion time: 2min

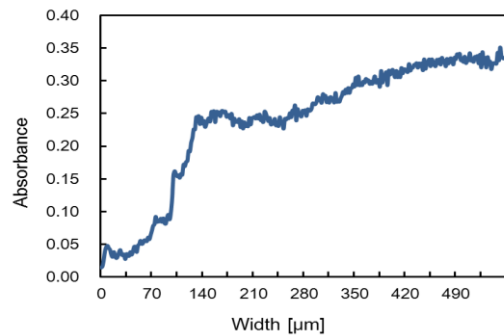


図4 卵巣組織における水の吸光度(浸透時間: 2min)

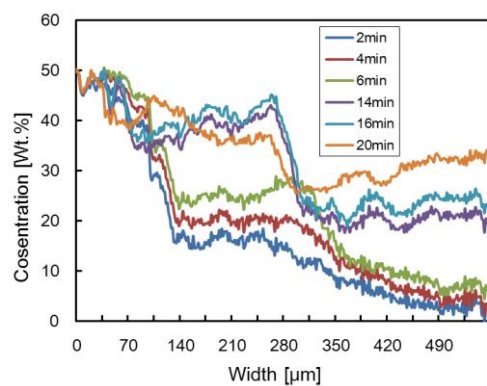


図5 卵巣組織におけるEG濃度分布

(5) 生体組織内の氷結晶計測

図6に25°C~-15°C間の水と氷結晶の吸収スペクトルを示す。水の吸収波長は1360nm~1600nmで、水の吸光ピークは1460nmであった。氷結晶の吸収波長は1360nm~1625

nm で、氷結晶の吸光ピークは 1495 nm であった。水と氷結晶の吸光ピークを比較すると、1455 nm と 1495 nm で 40 nm の差が表れた。また、グラフから氷結晶の吸光ピークは水の吸光ピークより長波長側に伸びている。以上で確認された EG の吸収波長帯において近赤外分光イメージングを行うことにある。本来、近赤外分光イメージングは、その吸収が一番高いピークの波長を用いることが望ましいものであるが、EG 水溶液は「水」と「EG」、凍結生体材料は「細胞組織」と「氷結晶」の 2 成分系として見なすことが出来るため、生体材料内の氷結晶は 1500 nm の汎用型のフィルタを採用した。

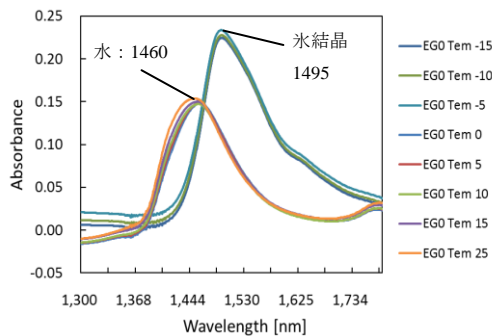


図 6 水と氷結晶の吸収スペクトル

図 7 に生体材料 (生牛肉) を凍結し、得られた分光画像 (1500 nm) を示す。得られた分光画像は、輝度が高い箇所と低い箇所で大別された。生体材料の凍結に伴い凍結濃縮・再結晶現象が起こる。このため、水 (氷結晶) の吸収波長で得られた分光画像では氷結晶の輝度が低く (暗い)、細胞組織の輝度が高く (明るい) なる。近赤外分光イメージングにおける光吸収と分子の関係と上述した細胞組織と氷結晶の 2 成分系のことを考慮すると、図 7 の分光画像において、輝度が低い (暗い) 箇所は氷結晶であり、輝度が高い (明るい) 箇所は氷結晶の生成、成長に圧迫されて多大なストレスを受けている細胞であると裏付けられる。これにより、生体材料内における氷結晶の計測が可能になった。

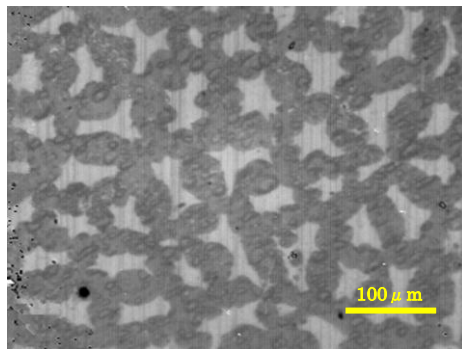


図 7 生体材料内の氷結晶

(6) EG 濃度差および凍結条件による氷結晶

図 8 にドライアイス凍結における氷結晶を示す。氷結晶の大きさは、EG0~30Wt.%までは、氷結晶の大きさが小さくなる傾向を示した。40Wt.%と 50Wt.%は 30Wt.%よりやや大きくなる傾向を示した。図 9 液体窒素凍結における筋繊維内の氷結晶を示す。氷結晶大きさは、EG 濃度の増加とともに小さくなる傾向を示した。EG30Wt.%から EG50Wt.%の間では細胞内凍結で、細胞の破壊が見られなく、氷結晶に大きな変化が見られなかった。ドライアイスと液体窒素の凍結における氷結晶の大きさを比較すると、両者の相当円直径の平均値は、EG0Wt.%から EG30Wt.%までは、EG 濃度の増加とともに相当円直径が小さく算出されたが、EG30Wt.%から EG50Wt.%の間では大きな変化が見られなかった。これは、凍結方法が異なっても、生体細胞に耐凍剤として EG を使う場合、EG30Wt.%程度が目安になるこ

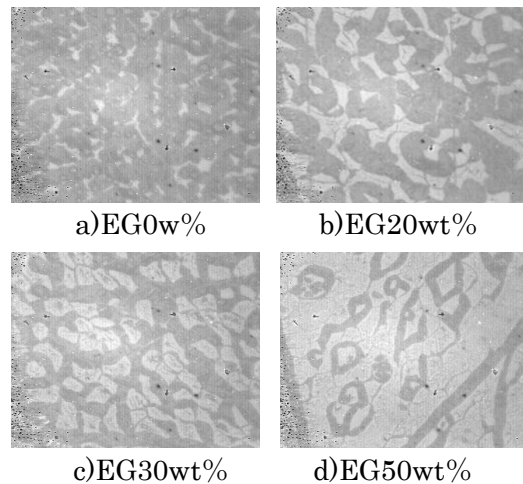


図 8 ドライアイス凍結による牛肉内部の氷結晶

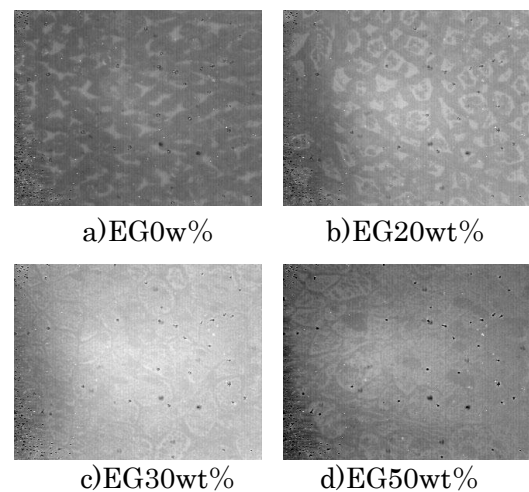


図 9 液体窒素凍結による牛肉内部の氷結晶

とを示唆している。また、液体窒素による凍結で生成された氷結晶が小さいことが分かった。これは、氷結晶の成長を抑制する耐凍剤としての EG 効果が計測されたことであると考えられる。

(7) 摘要

本研究では、生殖細胞の最適な凍結法を解明するために、近赤外分光イメージングにより耐凍剤の濃度差の計測法、生体組織内の氷結晶の計測法を開発し、この手法により耐凍剤を浸透させた生体組織内の氷結晶を計測し、耐凍剤の効果を評価した。

① 近赤外分光法により EG 水溶液の吸収スペクトルを計測した結果、EG (EG100 wt%) の吸収ピークは 1390 nm~1670 nm の波長範囲で 1586 nm であり、水 (EG0 wt%) の吸収ピークは 1360 nm~1600 nm の波長範囲で 1460 nm であることが確認された。

② 水溶液吸収スペクトル計測 (1460nm) における EG 水溶液濃度別の吸光度と分光画像 (1450nm) の吸光度変換における吸光度を求めた。分光画像の吸光度は、水が 2.902 で高く、EG が 2.419 で低かった。

③ 近赤外分光イメージングにより卵巣組織内の EG 浸透挙動の計測が可能になった。

④ EG 浸透圧における分光画像の吸光度により、卵巣組織内の EG 濃度分布を算出した。

⑤ 氷結晶の吸収波長は 1360nm~1625nm で、氷結晶の吸光ピークは 1495nm であった。

⑥ 近赤外分光イメージング法により EG を浸透させた生体材料内の氷結晶計測が可能になった。

⑦ EG 濃度差とドライアイスと液体窒素の凍結による生体材料内の氷結晶が計測された。凍結方法が異なっても、生体細胞に耐凍剤として EG を使う場合、EG30wt. %程度が目安になることを示唆した。

本手法は、EG を浸透させた生体組織内の氷結晶の計測が可能になり、耐凍剤の効果を定量的に評価する基礎研究として大きな意義がある。また、EG 濃度、浸透時間、凍結温度、保存時間、生体組織との相互関係を解明するツールとして応用されると考えられる。さらに、従来、1次元情報のみで解析した物質移動、熱移動などの物理化学現象を2次元 (断面)、3次元 (個体) に拡大し、定量解析化ツールとして応用されると考えられる。

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)

- ① 都 甲洙, 佐藤嘉兵, 裴 英煥, 池羽田晶文, 荒木徹也, 上野茂昭, 白樫 了: 生殖組織内における耐凍剤分布の計測

法, 日本冷凍空調学会論文集, 査読有, 30(2), 2013 (6 月), 掲載決定.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 小西麻友, 都 甲洙, 裴 英煥, 佐藤嘉兵, 川西啓文, 荒木徹也: 生体組織の凍結保存における耐凍剤の影響, 2011 年度日本冷凍空調学会年次大会講演論文集, 2011/09/15 日, 東京大学.
- ② 都 甲洙, 裴 英煥, 池羽田晶文, 荒木徹也: 生体組織の凍結保存における耐凍剤影響の 3 次元計測, 2012 年度日本冷凍空調学会年次大会講演論文集, 2012/09/12, 北海道工業大学.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

都 甲洙 (GABS00 D0)
日本大学・生物資源科学部・准教授
研究者番号: 40385993

(2) 研究分担者

佐藤嘉兵 (SATO KAHEI)
日本大学・生物資源科学部・教授
研究者番号: 20059778

(3) 連携研究者

()

研究者番号: