

【研究区分：先端的研究】

研究テーマ：哺乳動物胚の新たな長期保存法として非凍結マイナス 18℃保存法を開発	
研究代表者：生物資源科学部 生命環境学科 生命科学コース 准教授 阿部靖之	連絡先：abe@pu-hiroshima.ac.jp
共同研究者：なし	
【研究概要】 優良動物の効率的生産やヒト不妊治療において受精卵（胚）を長期保存することは重要であるが、胚の品質低下が問題である。そこで、マウス胚を用いて、非凍結培地および市販冷凍庫による新たな保存法「非凍結マイナス 18℃保存法」を開発した。冷却時の細胞保護と培地の凝固点降下に効果がある物質で構成される非凍結培地を作製し、胚を保存した結果、発生能を維持しながら 5 日間の保存が可能であることが示された。さらに、非凍結培地への抗酸化剤添加により、生存率および培養後の発生率が向上することが示された。	

【研究内容・成果】

1. 研究背景・目的

哺乳動物の受精卵（胚）を長期保存することは、効率的な動物生産やヒト不妊治療に対し非常に有用である。現在使用される胚保存法として、凍結法（-196℃）と冷蔵法（4℃）がある。凍結法は、液体窒素内であれば半永久的に保存可能であるが、凍結障害による品質低下や、産子で先天性症候群が増加するなどの問題がある。さらに、液体窒素や保存タンクのコストが高いことや、航空機での液体窒素の輸送は規制されているうえ、最近では誤った認識が原因で液体窒素漏出事故が発生し宅配輸送業者の輸送拒否が起こるなど、実用面の課題も多い。一方の冷蔵法は、市販の冷蔵庫で胚を保管できるが、保存可能な期間が短い（マウス胚、3 日；ウシ胚、7 日）うえに、細胞膜への損傷による品質低下も見られる。そこで、長期間の保存と胚移植後の高い受胎率が望め、さらに汎用性が高い新たな胚保存法が望まれている。そこで、マウス胚を用いて、非凍結培地および市販冷凍庫による新たな保存法「非凍結マイナス 18℃保存法」を開発した。

2. 研究成果

1) 非凍結培地の作製

胚の凍結保存において効果がある耐凍剤を使用して濃度の異なる非凍結保存液を多数作製した。耐凍剤には、細胞浸透性物質（CPA：細胞から水分を除去し細胞内氷晶形成を抑制。毒性を持つ。）および糖（細胞非浸透性。浸透性物質の脱水を補助。細胞膜の保護。）、高分子化合物（PC：糖と同様な効果。粘性が増し操作性は低下。）を使用した。作製した培地は、精液用ストローに充填後、市販冷凍庫（-18～-22℃）で 1 週間保存し、凝固の有無により非凍結培地を選別した。糖を 0.3 M または 0.7 M 添加した培地では、CPA がそれぞれ 35 または 25% 以上で凝固が見られなかったため、毒性をもつ CPA が最少量の A 液（25% CPA, 0.7 M 糖, 18% PC）および B 液（35% CPA, 0.3 M 糖, 18% PC）を次の実験に採用した。

2) マウス 2 細胞期胚の保存

上述の A 液および B 液内でマウス 2 細胞期胚を 1 日間保存後、回収し培養を行い、胚盤胞（体外で培養できる最終ステージ）への発生率を調べた。回収率は、両液ともに 92.1% で、操作性に大きな違いは見られなかった。一方で、胚盤胞への発生率は、A 液において 60.5% であり、新鮮胚の 91.7% に比べて低下したが、半数以上の胚が胚盤胞へ発生し、その細胞数は 74.2 個（新鮮胚は 86.2 個。50 以上であれば正常）と正常な範囲であった。それに対し、B 液において胚盤胞は得られず、2 細胞期で退行していた（図 1）。

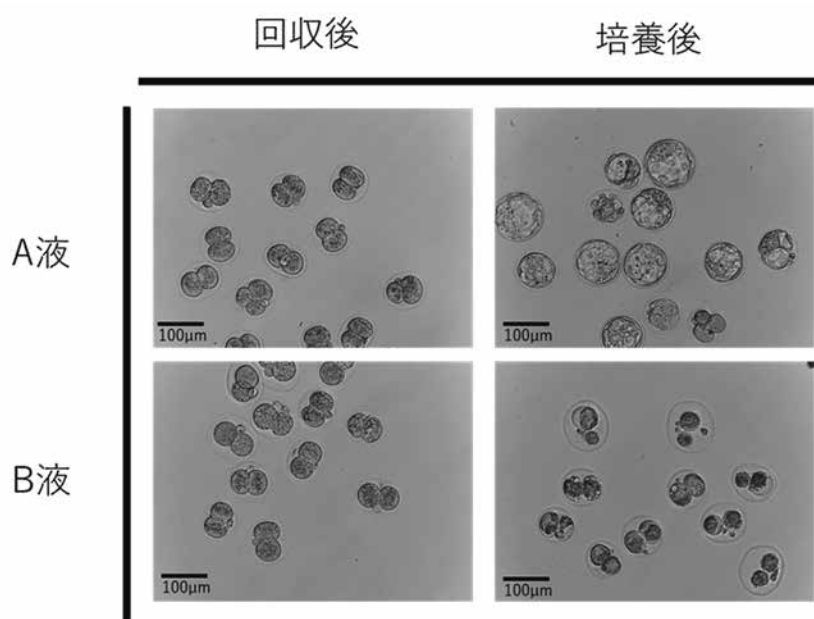


図 1. 回収および培養後のマウス胚.

3) マウス胚の生存日数の調査

培地は A 液を採用し、保存可能な期間を調べるため、マウス胚を 0 または 1, 3, 5, 7, 21 日間保存し、生存率および発生率を調べた。その結果、生存率は日数経過とともに減少し、0 日では 82.3%であったのに対し、7 日では 34.8%で有意に低く、21 日では 0%であった。また胚盤胞への発生率も日数経過とともに低下し、0 日では 94.8%であったのに対し、5 日では 5.7%であり、7 日では加温直後に生存している胚があったにも関わらず、発生率は 0%であった。一方で、得られた胚盤胞の細胞数を調べると、0 または 1, 3 日保存でそれぞれ 88.5, 79.2, 78.6 個となり、保存期間による差は見られなかった。そこで、保存期間中の品質低下の原因を調べるため、細胞内の還元型グルタチオン (GSH) レベルを測定した。細胞内に存在する GSH は、過剰生産された活性酸素種によって酸化型グルタチオン(GSSG)へと変換されると、抗酸化防御機構のバランスが崩れ、酸化ストレスが引き起こされることが知られている。マウス胚の GSH レベルを調べた結果、0 日では 124.8 だったが、1 日で 78.6 まで低下し、3 日以降は 60 前後で推移していた。

4) 保存期間延長の試み

上述の結果から、1 日間の保存であってもマウス胚は酸化ストレスにさらされ、日数経過とともに品質を低下させていると考えた。そこで、非凍結培地に抗酸化剤を添加することで保存期間の延長を図った。抗酸化剤は単独または複合 (3 種類を混合) 的に処理した。その結果、3 日間保存後の生存率では、無処理および複合処理で 60.6 および 59.4%であったのに対し、単独処理で 78.4 と有意に増加した。また胚盤胞への発生率は、無処理および複合処理の 14.6 および 23.2%に対し、単独添加区で 33.3%と有意に高かった。GSH レベルでも、7 日間保存後に単独処理で増加がみられ、抗酸化剤の有効であることが示唆されたが、保存期間を延長するためには、抗酸化剤の種類や処理法を改良する必要があると考えられる。

以上のように、マウス胚の非凍結マイナス 18℃保存法を開発したが、マウスは多数の系統や遺伝子改変マウスが作製されているので、動物個体ではなく胚として長期保存できれば、飼育管理のコスト削減や輸送の簡易化、感染症の蔓延防止など、多くのメリットがある。これはウシなどの家畜でも同様であり、ヒト不妊治療への応用も期待でき、本研究で開発した技術は広く社会に貢献しうると考えられる。