

凍結胚の保存温度に関する検討

○大矢康貴、大矢久美子、小木曾昇

医学系技術支援室 生物・生体技術系

概要

近年、医学・生物学の研究分野では、技術の進展により遺伝子組換えや突然変異マウス等有用なマウスが多数作出されており、これらマウスの利用が拡大するのに伴い、マウスの精子と胚の凍結保存技術は不可欠なものとなっている。当部門でも 2006 年 7 月より技術支援業務の一つとして開始し、現在まで多くの系統を凍結保存している。しかし、当部門で凍結胚を保存する場合、1 系統につき年間 15,000 円の保存料が掛かるため、液体窒素容器 (-196°C) を所有している講座・ユニットでは独自で保存を行いたいとの要望が増え始めている。最近では、液体窒素容器 (-196°C) ではなく -150°C や -86°C の超低温槽で保存されている講座・ユニットもある。しかし、そのような状況での保存が胚の生存率や個体復元に与える影響は今一つ把握できていない。そこで、今回 -150°C や -86°C 保存状況下の凍結胚の生存率について報告する。

1 材料および方法

1.1 供試動物

体外受精には 12~24 週齢の C57BL/6J Jcl 雄マウスおよび 9 週齢の C57BL/6J Jcl 雌マウス、Jcl:MCH (ICR) 雄マウスおよび 9 週齢の Jcl:MCH (ICR) 雌マウスを用いた。

1.2 胚の採取・体外受精、凍結-融解

体外受精は豊田らの方法に従った^[1]。精子は C57BL/6J Jcl 雄マウスの精巣上体尾部より採取し、HTF 培地に懸濁、1 時間の前培養を行った。一方、卵子は妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG) とヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) により過排卵処理を施した C57BL/6J Jcl 雌マウスの卵管膨大部より採取、HTF 培地中に導入した。体外受精は精子前培養後、最終精子濃度が 150 精子/μl となるように精子懸濁液を、卵子を含む HTF 培地内に導入することにより行った。なお、受精の有無は、媒精後 6~7 時間に倒立顕微鏡下で観察を行い、2 前核が認められた卵子を受精卵と判定した。

媒精 24 時間後に得られた 2 細胞期胚の凍結保存は簡易ガラス化法に従った^[2]。すなわち、まず 2 細胞期に発生した胚を室温にて 1M DMSO のドロップ (100μl) へ移し、胚を均等に小分けした (通常、1 ドロップに 40 個)。さらに新しい 1M DMSO のドロップへ移し、5μl の 1M DMSO 溶液と共に胚をチューブへ移し、あらかじめ 0°C にしておいた冷却装置 (CHILL HEAT:CHT-100 IWAKI) に移した。5 分後、0°C に冷やしておいた凍結保存液 DAP213 (2M dimethylsulphoxide, 1M acetamide, 3M propylene glycol in PB1) を 45μl 添加し、さらに 5 分後、チューブをケーンに装着し、直ちに液体窒素中に浸漬した。凍結胚の融解は、チューブを液体窒素保管器から取出し、速やかに中の液体窒素を捨て、室温で約 30 秒放置した。次にあらかじめ 37°C に加温しておいた 900μl の 0.25 M sucrose 溶液をチューブ内に添加し、完全に保存液が溶けるまで早くピペッティングし、内容液をシャーレに移し、さらに 400~500μl の 0.25 M sucrose 溶液でチューブ内を共洗いし、胚を回収した。回収した胚は modified Whitten 培地 (100μl) で洗浄し、胚の形態的な観察を行った。

1.3 供試胚

体外受精した2細胞期胚を一旦液体窒素(-196℃)で凍結し、その後各温度(-150℃(凍結試料運搬容器:CP100 Taylor Wharton)、-86℃(超低温槽: ULT-1490-3J-D30 Kendro Laboratory Products))で、1日間、7日間、14日間保存したものをを用いた。

1.4 融解試験

上記の各温度、時間で保存を行った凍結胚を一斉に融解し、正常2細胞期胚数を調べることにより保存条件が胚の生存に与える影響を検討した。その後、回収された2細胞期胚(凍結-融解胚)をmW培地へ導入し、胚盤胞期まで培養を行った。その際、胚盤胞期までの各段階への発生率を調べ、定法通り-196℃で保存を行った凍結-融解胚をmW培地で培養した場合と比較した。

1.5 統計解析

得られた測定値は、 χ^2 検定法を用いて有意水準5%で検定した。

2 結果

2.1 融解試験結果

-86℃で保管した場合は、すべての保存時間で生存している胚は認められなかった。-150℃で保存した場合、2細胞期胚の回収数は、-196℃で保存した凍結胚と比較しすべての保存時間で有意差は認められなかった。一方、回収した胚のうち、正常(生存胚)の数は保存時間で有意差は認められなかったが、-150℃の保存では保存時間が長くなるにつれ正常2細胞期胚数(割合)が少なくなる傾向が認められた。同様に、2細胞期胚から胚盤胞期への発生数も、-196℃で保存した凍結胚と比較して有意差は認められないものの、時間経過とともに発生数(%)が低下する傾向が認められた。一方、系統による比較では、正常2細胞期数および、2細胞期から胚盤胞期までの発生数はすべての温度、時間とも有意差は認められなかった。(表.1,2)。

	温度(℃)	時間(日)	保存数	回収数	正常2細胞期	
C57BL/6J Jcl	-150	1	80	80 (100)	77 (96.2)	
		7	80	74 (92.5)	64 (80.0)	
		14	80	76 (95.0)	66 (82.5)	
	-86	1	30	29 (96.6)	0 (0)	
		7	30	30 (100)	0 (0)	
		14	30	30 (100)	0 (0)	
	-196	-	80	80 (100)	77 (96.2)	
	Jcl:MCH (ICR)	-150	1	60	60 (100)	60 (100)
			7	60	60 (100)	56 (93.3)
14			60	58 (96.6)	51 (85.0)	
-86		1	30	30 (100)	0 (0)	
		7	30	28 (93.3)	0 (0)	
		14	30	29 (96.6)	0 (0)	
-196		-	60	59 (98.3)	59 (98.3)	

回収数(%)=回収数 / 保存数×100

正常2細胞期(%)=正常2細胞期 / 保存数×100

表.2 2細胞期から胚盤胞期までの発生数 (%)

	温度(°C)	時間(日)	2細胞期	4細胞期	桑実期	胚盤胞期	
C57BL/6J Jcl	-150	1	77	77 (100)	76 (98.7)	68 (88.3)	
		7	64	58 (90.6)	58 (90.6)	54 (84.3)	
		14	66	60 (90.9)	60 (90.9)	54 (81.8)	
	-86	1	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
		7	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
		14	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	-196	-	77	76 (98.7)	76 (98.7)	68 (88.3)	
	Jcl:MCH (ICR)	-150	1	60	59 (98.3)	58 (96.6)	54 (90.0)
			7	56	54 (96.4)	54 (96.4)	48 (85.7)
14			51	47 (92.1)	44 (86.2)	40 (78.4)	
-86		1	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
		7	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
		14	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
-196		-	59	58 (98.3)	57 (96.6)	56 (94.9)	

(%)=各細胞期 / 2細胞期 × 100

3 まとめ

液体窒素の沸点は-196°Cであり、この温度では胚内外にあるすべての水が結晶化して氷となっているか、ガラス化した状態になっている。ガラス化とは、分子が規則正しい結晶構造をとらないで固体と同程度の硬さになる現象をいい、ガラス化した珪酸塩は“ガラス”としてよく知られている。液体窒素温度で凍結保存されている胚が長期間安定なのは、単に温度が低いからではなく-130°C以下になると液体状態の水が消失することによる。これが-30°Cや-80°Cの低温槽で凍結保存する場合と決定的に異なる点である。-30°Cや-80°Cで凍結保存する場合には、わずかではあるが液体状態の水が胚の内外に残存するため、ゆっくりと生化学反応が進行し、徐々に生残率は低下する。これに対し、液体窒素温度では生残率の低下は実質的に無視しうる程度の速度のため半永久的保存が可能であると考えられている^[3]。-150°Cの保存では、これらの生化学反応の進行を止めることは理論上可能であるが、液体状態の水が消失する温度と近いこと、超低温槽の開閉によって温度が上昇することも考えられる。また、ガラス化した水が脱ガラス化し、胚内で再結晶することによって物理的に細胞内構造物を破壊し、胚を死滅させることも考えられる。今回の結果からも、-150°Cでの保存、特に長期間に渡る保存は、胚の生存率やその後の発生にも影響を及ぼす可能性があると考えられる。

今後、講座・ユニット独自で保存を行う場合には上記の説明をしていくと同時に、保存経費に見合うだけの確実性があることも解説していき、技術支援業務の質の向上に努めたい。

参考文献

- [1] 豊田裕 et al, “マウス卵子の体外受精に関する研究”, 家畜繁殖研究会誌, 1971, 16,147-151.
- [2] Kazuki NAKAO et al, “Simple and efficient vitrification procedure for cryopreservation of mouse embryos”, *Exp. Anim.*, 1997, 46, 231-234.
- [3] 桑野和可 “藻類の凍結保存”, 21世紀初頭の藻学の現況, 日本藻類学会, 2002, 108-111.