

氏名・(本籍)	福田 康義 (埼玉県)
専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	医博甲第 1053 号
学位授与の日付	令和 3 年 9 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	Small-volume vitrification and rapid warming yield high survival of one-cell rat embryos in cryotubes. (最少容量ガラス化法と急速融解によるクライオチューブを用いたラット 1 細胞期胚のガラス化保存)

論文審査委員	(主査) 田中 正光 教授	
	(副査) 寺田 幸弘 教授	齋藤 康太 教授

学位論文内容要旨

論文題目

Small-volume vitrification and rapid warming yield high survival of one-cell rat embryos in cryotubes.

(最少容量ガラス化法と急速融解によるクライオチューブを用いたラット1細胞期胚のガラス化保存)

申請者氏名 福田 康義

研究目的

生殖補助医療の進歩とともに、凍結保存技術の果たす役割は増している。細胞をそのまま凍結すると、細胞の7割は水分であるため、細胞内に生じた氷晶が細胞膜や細胞内小器官を物理的に破壊し、融解後の生存性が低下する。ガラス化法では、高濃度の耐凍剤液に細胞を浸すことで、浸透圧的に脱水するとともに細胞に耐凍剤を透過させたのちに、胚を急速に凍結することによって細胞内氷晶の形成を防ぐ。実験動物における胚のガラス化保存は、系統保存や飼育・輸送コストの低下などに重要な役割を担っている。特に、ゲノム編集技術の開発により、動物種に制限されずに安価で簡便にゲノム編集動物を作出可能になったため、CRISPR/Cas9 システムを導入するための1細胞期胚の凍結保存技術の開発が望まれる。ラットは適度な大きさで外科処置がしやすいうえ、全ゲノム配列が明らかになっているため、医学・生理学・栄養学などの様々な分野で使用されている。ラット1細胞期胚の凍結保存の成功は、1本あたり数個のヒト胚凍結保存用に開発された微細なデバイスであるクライオトップを用いた方法に限られており、実験動物の凍結保存バンクでは安価で多くの胚(50-100個/本)を凍結保存できるクライオチューブでの保存が望ましい。我々は、マウスの卵子や胚を用いた研究により、凍結過程で生じた微小な氷晶が融解過程で成長することを明らかにし、ガラス化保存の成功には凍結速度よりも融解速度が重要であることを見出している。クライオチューブの凍結速度(2,613°C/min)はクライオトップ(69,250°C/min)と比べて遅いが、融解速度は最少容量ガラス化法を用いた上で高温な融解溶液を用いることで速くすることが可能である。本研究では、融解速度に着目することによって、クライオチューブを用いたラット1細胞期胚のガラス化保存方法の開発を行った。

研究方法

過剰排卵処置を施した雌ラットから採取した1細胞期胚を用いて、ガラス化溶液の毒性試験および凍結・融解実験を行い、体外培養によって胚盤胞期までの発生能を調べた。ガラス

化溶液には、耐凍剤であるエチレングリコール(EG, 10%, 20%, 30%あるいは40% Vol/Vol)、フィコール、スクロースを含むEFS10、EFS20、EFS30あるいはEFS40を用いた。毒性試験では、1細胞期胚を各EFS溶液に1分間浸した後、耐凍剤を細胞外へ流出させるために23°Cの0.3 Mスクロース溶液に5分間浸した。凍結保存では、1細胞期胚をOne-step法またはTwo-step法でガラス化した。One-step法では、1細胞期胚をEFS溶液に1分間浸している間に、1細胞期胚を含む5 μ lのEFS溶液をクライオチューブに移したのち、液体窒素に直接浸すことで凍結した(実験1)。Two-step法では、1細胞期胚を低濃度(5%)のEGに10分間浸した後、EFS溶液に1分間または40秒間浸し、One-step法と同様の方法で凍結した(実験2, 3)。融解では、クライオチューブを液体窒素から取り出したのち、フラクチャー傷害を防ぐために23°Cで1分間静置し、23°C、37°Cあるいは50°Cの0.3 Mスクロース溶液1 mlを添加した(それぞれの融解速度は6,375°C/min, 8,475°C/min, 18,467°C/min)。また、偽妊娠雌ラットの両側卵管に凍結・融解後の1細胞期胚を胚移植することで、着床痕および胎仔の数を確かめた。各実験では、ガラス化することなく体外培養あるいは胚移植した1細胞期胚をコントロールとした。

研究成績

毒性試験の結果、20%、30%、40%のEGを含むEFS溶液では、ほとんどの1細胞期胚が胚盤胞期まで発生しなかった(3-23%)だが、10%のEGを含むEFS10で処理した1細胞期胚はコントロールと同様の胚盤胞期までの発生率を示した(50.2%)。そのため、以下の凍結・融解実験は、全てEFS10を用いて行った。結果は次の通りである。

実験1. One-stepガラス化法では、融解速度に関係なく胚盤胞期までの発生率が低かった(0-5%)。単に、1細胞期胚をEFS10に浸すのみではEGの透過が不十分であると考えられた。

実験2. 1細胞期胚を予め5%EGに浸した(23°C, 10分)のち、EFS10(23°C, 1分)に浸すTwo-step法では、どの融解速度でも発生能が向上したが、コントロールと比べて胚盤胞期までの発生率が低かった(20.7%)。EFS溶液による傷害により発生能が低下していると考えられた。

実験3. Two-step法におけるEFS10の浸漬時間をより短く(40秒)することで、EFS溶液による傷害を最小限にし、融解速度を50°C(18,467°C/min)と急速にすることにより、コントロールと同様の胚盤胞期までの発生率を示した(58.1%)。さらに、凍結・急速融解後の1細胞期胚を仮親へ胚移植したところ、コントロールと同様の着床率(68.7%)および胎仔率(50.0%)を示した。

結論

あらかじめ低濃度の耐凍剤を透過させた1細胞期胚を低濃度のガラス化溶液で凍結し、急速に融解することで、ガラス化溶液の傷害を最小限にしながら細胞内氷晶形成による傷害を回避することができ、クライオチューブを用いたラット1細胞期胚の凍結保存を可能にすることが示された。

学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主 査： 田中正光

申請者： 福田康義

論文題名：Small-volume vitrification and rapid warming yield high survival of one-cell rat embryos in cryotubes (最小容量ガラス化法と急速融解によるクライオチューブを用いたラット1細胞期胚のガラス化保存)

要旨

著者の研究は、論文内容要旨に示すように、実験動物胚の凍結保存法の改良を行ったものである。特に近年、ゲノム編集動物の作出が増え、代表的な CRISPR/Cas9 システムを導入するための1細胞期胚の凍結保存の需要が高まっている。現在はヒト胚凍結保存用のデバイスであるクライオトップが主に用いられているが、高価であり、また保存可能な数もかなり限定的である問題点を有している。これに対して、申請者らは凍結保存胚の生育はむしろ融解速度が重要である事を見出し、多数の胚の保存が可能なクライオチューブを用いてラットの1細胞期胚のガラス化保存法の開発を行った。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

1) 斬新さ

ラット1細胞期胚を用いて、まず凍結保存液の比較から行っており、その結果10%のエチレングリコール(EG)を含むEPS10溶液が、毒性が少ない条件である事を見出した。次に凍結保存法は胚を予め5%EGに浸した後、EPS10溶液に移すTwo-Step法で発生能が向上し、さらにEPS10の浸漬時間を短時間にする事で、細胞傷害がより軽減する結論を導いた。

凍結胚を発生させる過程では、融解速度を急速にする(18,467°C/分)事で、ガラス化保存を経ないコントロールの1細胞期胚とほぼ同等の着床率と胎仔率を得るに至った。

これらの中で特に解凍スピードが重要である事を初めて明らかにした点で新規性が高い。

2) 重要性

需要がありながらこれまで必ずしも最良の条件が報告されていなかった、1細胞期胚の凍結保存・融解法について、大きく進歩した事は重要性が高い。予め低濃度の耐凍液を通過させ、低濃度ガラス化溶液で凍結、急速融解させるベストな条件を提示する事ができた。今後これを踏まえて、他の卵子などの保存法にも発展させる事で、ヒトの臨床にも還元される事が期待される。

3) 研究方法の正確性

ラット1細胞期胚を用いてよくデザインされた凍結保存・融解条件の比較実験を行った。保存液の検証的実験から開始し、凍結法から融解条件へと、論理的に進められている。

4) 表現の明瞭さ

研究目的、方法、実験結果の表現は適切であり、ガラス化保存の解説や、クリオバイオロジーにおける将来の展望を含めた考察に対しても、明瞭に発表したと考える。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。