博士（獣医学）　バルデス　コンラド　アントニオ

学位論文題名

Studies on the Cryopreservation of Mouse Embryos by Vitrification

（マウス胚のガラス化による低温保存に関する研究）

学位論文内容の要旨

ガラス化により低温保存したマウス胚の生存性に影響するいくつかの要因について検討し，マウス胚盤胞の低温保存に適した新しいガラス化溶液の作製を試みた。

マウス8細胞期胚，収縮桑実胚および胚盤胞を，燐酸緩衝液＋10％子牛血清(PBC＋CS)に凍害防止剤を溶解することにより作製したガラス化溶液1（VS 1；10％glycerol＋20％propylene glycol）とガラス化溶液2（VS 2；25％glycerol＋25％propylene glycol）に平衡した後に液体窒素中に直接投入することによりガラス化し，胚の生存性に影響するいくつかの要因を検討した。その結果，ガラス化－融解胚の生存率はVS 1への胚の平衡時間，VS 2の温度および胚の発育ステージの影響を受けることが示された。胚の発育ステージに関わりなく，VS 1への平衡時間が5分間および20分間と比較して，10分間の時に最も高いin vitroでの発育率が得られたが，桑実胚および8細胞期胚では4℃でVS 2に平衡した場合には，VS 1への平衡時間が5分間でも高い生存率が得られた。VS 1への平衡時間を20分間に延長した場合には，すべての発育ステージで胚の生存・発育に有害な影響が見られた。胚盤胞を4℃でVS 2に平衡した場合には，20℃でVS 2に平衡した場合よりも有意に高い生存率が得られた（71.5および43.6％）。胚の発育ステージでの比較では，VS 2への平衡温度に関わらず，桑実胚で8細胞期胚と胚盤胞と比べ高い生存率が得られた。

VS 1に室温で10分間平衡した後にVS 2に4℃および20℃で平衡し，ガラス化－融解した桑実胚を偽妊娠雌マウスの子宮内に移植したところ，正常胎子（day16－18）への高い発育率（それぞれ53.6および47.1％）が得られたが，対照胚の発育率（70.6％）と比べ有意に低い値であった（$P<0.05$）。

VS 1とVS 2でガラス化した場合，細胞内外に氷晶形成が見られないことが電子顕微鏡によるフリーズ・フラクチャー法により確認された。本実験で高い生存率が得られた原因は，ガラス

化溶液を用いたため細胞内外に氷晶が形成されなかったためであろう。しかし室温（20℃）でガラス化溶液に平衡した場合，胚盤胞の生存率は低かったため，胚盤胞に対する凍害防止剤の毒性について検討した。

マウス胚盤胞をグリセロール（GLYC），プロピレングリコール（PG），エチレングリコール（EG），ジメチルスルホキシド（DMSO），1，3ブタンジオール（1，3BD）および2，3ブタンジオール（2，3BD）に室温で暴露した後にin vitroでの発育率を調べた。30%濃度（V／V）の凍害防止剤に胚を10分間暴露した場合，EGを用いた場合にのみ高い生存率が得られた（74.6%）。20%濃度の凍害防止剤への暴露時間を40分間に延長したところ，1，3BDおよび2，3BDを用いた場合には他の凍害防止剤を用いた場合と比べ生存率は低下した。また，20%濃度の凍害防止剤に5分間暴露した後に，胚を直接PBS+CS中に入れて凍害防止剤の希釈を行ったところ，胚をGLYCに暴露した場合には他の凍害防止剤を用いた場合に比べ胚の生存率は低下した。in vitroでの発育率は，凍害防止剤の濃度，暴露時間および凍害防止剤の希釈法の影響を受けたが，その影響の程度は凍害防止剤の種類によって様々であった。一般的に，高濃度の凍害防止剤の使用および凍害防止剤への平衡時間の延長は胚の生存率を低下させた。

EGが最も高い胚の生存率を示したことから，EGを主要な凍害防止剤とし，また，ガラス化能の強いDMSOと1，3BDを組み合わせて新しいガラス化溶液を作製した。胚盤胞を室温で新ガラス化溶液1（NVS1；10%EG, 10%DMSO，5%1，3BD）と新ガラス化溶液2（NVS2：20%EG，20%DMSO，10%1，3BD）に2ステップあるいはNVS2に1ステップで平衡した後に，直接液体窒素中に投入しガラス化した。胚を2ステップ（NVS1：3min－NVS2：0.5min）あるいは1ステップ（NVS2：0.5min）で平衡した場合，in vitroで高い生存率が得られた（それぞれ92.6%および95.4%）。また，2ステップあるいは1ステップで平衡し，ガラス化－融解した胚を偽妊娠雌マウスの子宮内に移植したところ，in vivoでの正常胎子への発育率は，対照胚の発育率と比べ有意差は見られなかった（54.2，45.0および60.0%，$P>0.05$）。最適な平衡時間でガラス化溶液に平衡した後にガラス化した胚を，電子顕微鏡でフリーズ・フラクチャー法により観察した結果，細胞内外の氷晶形成，生化学的毒性および激しい細胞収縮が起こらないことが確認された。このことが高い生存率を得られた理由であろうと推察された。一方，平衡時間を延長すると，細胞膜内粒子の凝集，細胞膜内粒子の観察されない領域，膜胞の形成あるいは細胞の膨張といった細胞膜の変化が引き起こされた。これらの超微形態上の変化は生化学的毒性によるものであり，そのため氷晶が形成されないにも関わらず胚の生存率を極めて低下させると考えられる。

以上の結果から，ガラス化により低温保存された胚の生存率には，いくつかの要因が関与していることが確認された。さらに，マウス胚盤胞のガラス化低温保存に有効な新しいガラス化溶液（NVS 1 およびNVS 2 ）が確立された。

学位論文審査の要旨

主　査　　教　授　　金　川　弘　司
副　査　　教　授　　菅　野　富　夫
副　査　　教　授　　前　出　吉　光
副　査　　助教授　　高　橋　芳　幸

本研究は，ガラス化により低温保存したマウス胚の生存性に影響するいくつかの要因について検討し，マウス胚盤胞の低温保存に適した新しいガラス化溶液の作製を試みたものであり，英文119頁からなる論文に16篇の参考論文を付している。

マウス 8 細胞期胚，収縮桑実胚および胚盤胞を，燐酸緩衝液＋10％子牛血清（PBC＋CS）に凍害防止剤を溶解することにより作製したガラス化溶液 1 （VS 1 ；10％グリセロール，GLYC ＋20％プロピレングリコール，PG）とガラス化溶液 2 （VS 2 ；25％GLYC＋25％PG）に平衡した後に液体窒素中に直接投入することによりガラス化し，胚の生存性に影響するいくつかの要因を検討した。その結果，ガラス化－融解胚の生存率は VS 1 への胚の平衡時間，VS 2 の温度および胚の発育ステージの影響を受けることが示された。胚の発育ステージに関わりなく，VS 1 への平衡時間が 5 分間および20分間と比較して，10分間の時に最も高い in vitro での発育率が得られたが，桑実胚および 8 細胞期胚では 4 ℃で VS 2 に平衡した場合には，VS 1 への平衡時間が 5 分間でも高い生存率が得られた。VS 1 への平衡時間を20分間に延長した場合には，すべての発育ステージで胚の生存・発育に有害な影響が見られた。胚盤胞を 4 ℃で VS 2 に平衡した場合（71.5％）。20℃で VS 2 に平衡した場合（43.6％）よりも有意に高い生存率が得られた。胚の発育ステージでの比率では VS 2 の温度に関わらず，桑実胚で 8 細胞期胚と胚盤胞と比べ高い生存率が得られた。

VS 1 に室温で10分間平衡した後に VS 2 に 4 ℃および20℃で平衡し，ガラス化－融解した桑実胚を偽妊娠雌マウスの子宮内に移植したところ，正常胎子（day16－18）への高い発育率（そ

れぞれ53.6および47.1%)が得られたが,対照胚の発育率（70.6%）と比べて有意に低い値であった（$P<0.05$)。

VS1とVS2でガラス化した場合，細胞内外に氷晶形成が見られないことが電子顕微鏡によるフリーズ・フラクチャー法により確認された。本実験で高い生存率が得られた原因は，ガラス化溶液を用いたため細胞内外に氷晶が形成されなかったためであろう。しかし室温（20℃）でガラス化溶液に平衡した場合，胚盤胞の生存率は低かったため，胚盤胞に対する凍害防止剤の毒性について検討した。

マウス胚盤胞をGLYC，PG,エチレングリコール(EG),ジメチルスルホキシド(DMSO),1,3ブタンジオール（1,3BD）および2,3ブタンジオール（2,3BD）に室温で暴露した後にin vitroでの発育率を調べた。30%濃度（V／V）の凍害防止剤に胚を10分間暴露した場合，EGを用いた場合にのみ高い生存率が得られた（74.6%)。20%濃度の凍害防止剤への暴露時間を40分間に延長したところ，1,3BDおよび2,3BDを用いた場合には他の凍害防止剤を用いた場合と比べ生存率は低下した。また，20%濃度の凍害防止剤に5分間暴露した後に，胚を直接PBS+CS中に入れて凍害防止剤の希釈を行ったところ，胚をGLYCに暴露した場合には他の凍害防止剤を用いた場合に比べ胚の生存率は低下した。in vitroでの発育率は，凍害防止剤の濃度，暴露時間および凍害防止剤の希釈法の影響を受けたが，その影響の程度は凍害防止剤の種類によって様々であった。一般的に，高濃度の凍害防止剤の使用および凍害防止剤への平衡時間の延長は胚の生存率を低下させた。EGが最も高い胚の生存率を示したことから，胚への障害が少なかったEGと，ガラス化能の強いDMSOおよび1,3BDを組み合わせて新しいガラス化溶液を作製した。胚盤胞を室温で新ガラス化溶液1（NVS1；10%EG，10%DMSO，5%1，3BD）と新ガラス化溶液2（NVS2：20%EG，20%DMSO，10%1,3BD）に2ステップあるいはNVS2に1ステップで平衡した後に，直接液体窒素中に投入しガラス化した。胚を2ステップ（NVS1：3min－NVS2：0.5min）あるいは1ステップ（NVS2：0.5min）で平衡した場合，in vitroで高い生存率が得られた（それぞれ92.6%および95.4%)。また，2ステップあるいは1ステップで平衡し，ガラス化－融解した胚を偽妊娠雌マウスの子宮内に移植したところ，in vivoでの正常胎子への発育率は，対照胚の発育率と比べ有意差は見られなかった（54.2，45.0および60.0%，$P>0.05$)。最適な平衡時間でガラス化溶液に平衡した後にガラス化した胚を,電子顕微鏡でフリーズ・フラクチャー法により観察した結果,細胞内外の氷晶形成,細胞膜の超微形態上の変化および激しい細胞収縮の起こらないことが確認された。このことが高い生存率を得られた理由であろうと推察された。一方，平衡時間を延長すると，細胞膜内粒子の

凝集，細胞膜内粒子の観察されない領域，膜小胞の形成あるいは細胞の膨張といった細胞膜の変化が引き起こされ，胚の生存率が低下した。これらの超微形態上の変化は生化学的毒性によるものであろうと考えられ，そのため氷晶が形成されないにも関わらず胚の生存率が低下したものと推察された。

以上のように申請者は，ガラス化により低温保存された胚の生存率には，いくつかの要因が関与していることを確認し，さらに，マウス胚盤胞のガラス化低温保存に有効な新しいガラス化溶液（NVS1およびNVS2）を開発した。これらの成果は，この分野の発展に寄与するところが大きいので，審査員一同は，申請者，バルデス・コンラド・アントニオ氏が博士（獣医学）の学位を受ける資格があるものと認める。