

—総説—

特集：管理胚培養士セッション～日ごろのラボ業務からもう一步先へ～

胚培養士として工夫している胚凍結と培養のあれこれ Protocols and concerns for the preservation and cultivation of embryos

熊迫 陽子*・宇津宮 隆史

Yoko Kumasako* and Takafumi Utsunomiya

セント・ルカ産婦人科 〒870-0823 大分市

St. Luke Clinic, 1-4-5 Higashi-Omichi, Oita 870-0823, Japan

要旨：胚培養士の業務で要となる胚凍結と胚培養に関し、普段行っている工夫や留意点を述べる。ガラス化法を用いた胚凍結で成績を左右するのは、耐凍剤の種類とデバイスである。耐凍剤は細胞内に透過しやすく毒性の弱いものである必要があるが、毒性を考慮してDMSOが含まれていないものを選択している。また、液体窒素から胚へのコンタミネーションを極力抑えた閉鎖系のデバイスを用いることで安全な医療を提供する原則を守っている。胚培養に用いる培養液の扱いは、施設に届いたときから始まっているため、瓶を開けてからの取り扱いや使用前の確認事項を定め、問題発生時には追跡できるようにする。また、患者の胚を2種類の培養液に分け培養するSplit培養をし、定期的に培養成績の振り返りを行い患者背景もふまえ問題がないか検討している。また、採卵時から個別で培養を行い、由来する卵胞が把握できるようにしている。体外培養終了から10日経過した妊娠結果に真の培養結果が反映されていると考え、ラボの品質維持に努める必要がある。

キーワード：ガラス化法、閉鎖系デバイス、single medium、split培養、品質管理

はじめに

筆者が生殖補助医療の業務に就いてから5年目の2002年に第1期の胚培養士認定を受け、当院より6人の胚培養士が誕生した。資格を取得したことで個々のモチベーションが高まり、従来までの先輩の技術をまねて習うという姿勢から、もっと理論的にものごとを捉え理解したうえで作業する姿勢が必要だと感じるようになった。私たち胚培養士が行う技術には必ず小さな工夫が必要であり、技術者の「作業のやりやすさ」の追求から生まれた工夫もあれば、この工夫なくしては患者さんの求める結果には繋がらないだろうと思われるようなものもある。

ここでは、胚凍結と胚培養に絞って妊娠に繋がると考えている「こだわり」や「工夫」について紹介したいと思う。

胚凍結

1972年にWhittinghamら¹⁾は、低温生物学の理論に基づき考案したマウス初期胚の凍結保存法を報告した。1983年にTrounsonら²⁾によって初めてヒト緩慢凍結胚で妊娠が成功した。1985年、Rallら³⁾がガラス化法を成功させて以来、実用化に向けた研究が進みガラス化の条件が模索された。そして1990年、Gordtsらにより初めてヒト胚のガラス化法により妊娠が得られ⁴⁾、今ではその成績と簡便性、高価な機械を用いる必要がないことなどから本邦では主流の凍結法となっている。細胞内の大部分を占める水分が、受精卵という大きな細胞塊を生きのまま凍結する際の大きな障害となる(細胞内氷晶)。そのため、いかに細胞内を脱水し、かわりに毒性の少ない耐凍剤を細胞内に置換するかが、融解後の成績を向上させるために重要である。

現在いくつかのメーカーから凍結液が販売されているが、凍結液に含まれる成分の詳細な組成を開示しているところは多くはないであろう。しかし、Dimethyl sulfoxide (DMSO)は細胞内へ取り込まれやすい一方で細胞への毒性が高いということ、一方エチレングリコールは細胞への取り込みはゆっくりであるが細胞毒性は低いこと⁵⁾を知っていれば、メーカーの担当の方に耐凍剤に何が使われている

(受付 2020年7月27日／受理 2020年8月18日)

別刷請求先：〒870-0823 大分県大分市東大道1-4-5

セント・ルカ産婦人科 セント・ルカ生殖医療研究所

*To whom correspondence should be addressed.

e-mail: ykumasa@st-luke.jp

かのポイントは確認できるはずである。むしろ、細胞毒性を最小限に抑えるべくガラス化と融解のプロトコールが厳密に定められているが、使用する立場の我々がどの部分を重要視して、凍結・融解液を選定するかが重要である。さらに、凍結・融解液のロットを記録し、どの患者の胚がどのロットの凍結液を用いて保存されたか追跡できる管理が必要である。

デバイスについて触れる。2000年、Yokotaら⁶⁾は本邦で最初にヒト胚をガラス化・融解・培養した後患者に胚移植し出産に成功した。その方法は、現在多くの施設で採用されているガラス化法にはない、非常にユニークなものであった。内容量0.25 mlのプラスチックストローの中央部分に10 µlのガラス化液とともに平衡化が完了した胚が位置するようにローディングし、その両端を少量の空気で隔て、融解液で挟み込むかたちをとり、シールして液体窒素に投入するというものである(0.25 mlストロー法、図1)。それから、Kuwayamaら⁷⁾によって胚の冷却速度を極限まで高めることに特化した開放系デバイスが考案され、この方法(開放系超急速ガラス化法)は、融解後に最も高い生存率を誇るため多くの施設で採用されている。その一方で、閉鎖系の急速冷却デバイスも開発され始めた。これは、胚を一度も液体窒素に直接触れさせることなく気相中で急速にガラス化させるため、あらかじめ冷却速度をできるだけ高めるべくストローを液体窒素に浸け十分に冷却しておき、そのストローのなかに平衡化した胚を挿入しシールするという方法(閉鎖系急速ガラス化法、図2⁸⁾)である。ここで紹介した3種のガラス化法で用いるデバイス別の長所・短所は表1の通りである。これらを熟知したうえでどのタイプのデバイスを採用するか自施設で十分に検討することになるが、液体窒素からのウィルス等のコンタミネーションについては現在も議論が続いている。ウィルスが存在する可能性はあるが、その証拠を示すことは困難である、という理解が正しいであろう⁹⁾。動物を対象とする畜産分野とは異なり、ヒトを対象とする私たちが携わる「医療」であれば、「安全性」が第一であり「有効性」はその次になることは論を俟たない。当院では、安全性を最優先させた医療という方針を貫いているため、液体窒素からの何らかのコンタミネーションの危険性がゼロと言い切れない以上、開放系デバイスは胚凍結の選択肢には挙がっていない¹⁰⁾。

最近、自然災害や新型ウィルスの脅威などが相次ぎ、しばしば物流や人の移動が制限されたり滞ったりすることが危惧される。今後、凍結・融解液が入手できなくなる危険性を想定し、凍結時に融解液も封入できる0.25 mlストロー法を選択することも、ラボの工夫として挙げられるだろう。

胚培養

培養液は大きく分けて2種類に分類できる。Sequential mediaとSingle mediumである。前者は「the “back to nature” approach」という考え方を基に*in vivo*の環境を模倣し体外培養のために考案された培養液、後者は「the “let

the embryo choose” approach」という考え方を基に胚盤胞期まで交換せずに培養するために考案された培養液である¹¹⁾。近年、タイムラプス撮影装置で胚培養を行うことが多く、その利点を生かすために培地交換をせずに受精から6日目まで培養できるSingle mediumを採用することが多くなった。

胚培養に欠かすことのできない成分としてヒト血清アルブミン(HSA)が挙げられる。HSAには毒性物質の作用を中和し浸透圧やpHを調整する作用などの培養に良い影響をもたらす成分が含まれるが、同時にエンドトキシンやフタル酸エステル等の悪影響を及ぼす成分が含まれる危険性もある¹¹⁾。当院では、培養液と同様にHSAのロットも管理しており、胚培養の成績が思わしくないときは直ちにロットを変更することにしていく。

信頼して使用している培養液であっても、施設内で瓶から分注し、HSAを添加し冷蔵保存し、インキュベーターで平衡化し、培養前にディッシュにドロップを作成しオイルカバーをする、といった一連の作業のなかで、ひとつでも間違いに気づかず行われている行程があれば、それだけで患者の妊娠成績を大きく損なうことになる。気付かないこととはつまり改善することができず、培養成績の不調を培養液のせいにしてしまい、意味のない培養液の採用の変更を招いてしまう。培養液が施設に届いてから使用するまで、行う作業と留意する点を表2に挙げる。開封してからの使用日数や瓶の蓋を開ける回数については、裏付ける実験データはないがラボ内で一定のルールを作るのが望ましい。

当院では、常に2種類の培養液を採用し、2個以上媒精できた場合はSplit培養を行っている。そして、週に一度培養成績の振り返りを行い、患者別の初期胚の発育状況、移植および凍結することができた胚利用率を培養液のロット別に算出しており(表3)、培養成績に偏りがあった場合、胚利用率が30%に満たないような場合は何らかの原因があると考え、スタッフの作業の見直し、培養液やHSAのロット変更などを検討している。また、患者によっては片方の培養液で培養した胚しか発育しないことがまれにある。それは、Split培養した卵子が偶発的に偏ってしまったのか、あるいはその患者の特性なのか、あるいは培養液の不調なのか等を分析し、患者の特性であると判断した場合は、以後その患者の胚培養はSplit培養をせず片方のみ使うという決断もやむを得ない。しかし、その決断はハードルが高いため、信頼した培養液が能力を最大に発揮できるための適切な管理が必要であり、患者背景等の十分な分析が必要である。当院では、どの卵胞から採れた卵子なのかまでわかるように記録し個別培養を行っているが、そうすることにより、培養卵子に偏りがあったのかを分析することができる。

胚培養を行うには、患者の体内より採卵された卵子が再び患者の子宮に戻るまで体外で存在する6日間、viabilityを低下させることなく維持させることが重要である。その期間で卵子～胚には劇的な変化が起こっているが、その変化

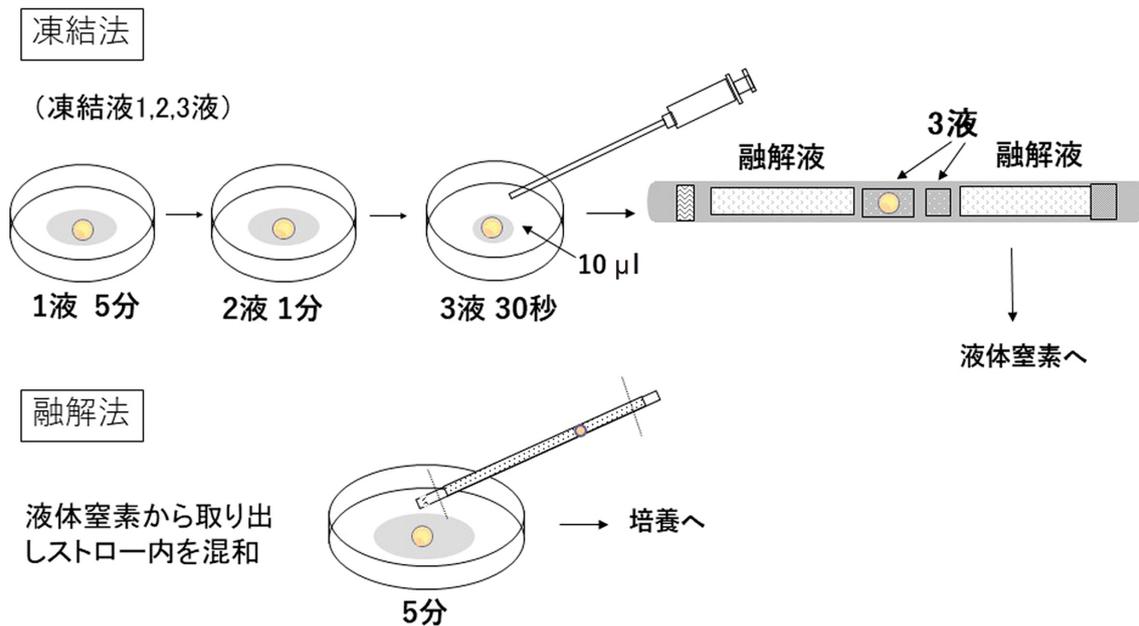


図1 0.25 mlストロー法のプロトコール

平衡化液 (1液) に胚を5分, 2液に1分, 3液に30秒浸ける. ガラス化液と胚の両側に融解時使用する融解液をストローに吸引し, ヒートシールで密封し, 液体窒素に投入する. 融解は, ストロー内の液が完全に融けたら直ちにストローの片側を保持して振ることによって混和し, ディッシュに出して5分後, 培養液に移し回復培養を行う.

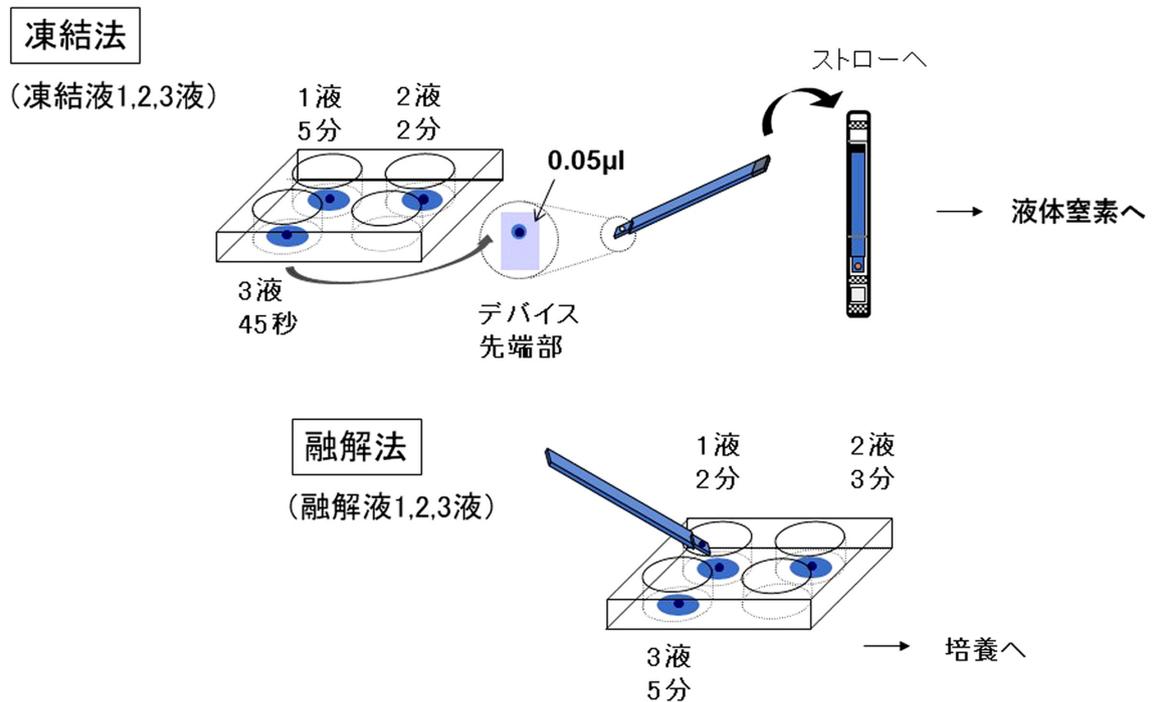


図2 閉鎖系急速ガラス化法のプロトコール

1液に5分, 2液に2分, 3液に45秒胚を浸け, デバイスの先端の孔に極少量の3液とともに胚を載せる. 直ちにあらかじめ液体窒素で冷却しておいたストローのなかにデバイスを入れ, シールで密封し, 液体窒素に投入する. 融解は, ストローの片側を切り取り, デバイスを取り出し, 1液に2分, 2液に3分, 3液に5分浸けた後, 培養液に移し回復培養を行う.

表1 3種のガラス化法によるデバイスの比較

ガラス化法の種類	胚と共に封入するガラス化液の量	長所	短所
0.25ml ストロー法 ⁶⁾	10 μ l	<ul style="list-style-type: none"> 液体窒素保管中のコンタミネーションの危険がほぼない 容易で安価 融解液と共にストロー内に封入でき、融解時に準備が不要 一度に複数個の胚を容易に封入できる 	<ul style="list-style-type: none"> 冷却速度が小さいため、融解後の生存率がやや劣る
開放系超急速ガラス化法 ⁷⁾	約0.05 μ l	<ul style="list-style-type: none"> 冷却速度が最も大きい 融解後の生存率が最も高い 	<ul style="list-style-type: none"> 液体窒素保管中のコンタミネーションの懸念がある 複数個の胚の封入が困難
閉鎖系急速ガラス化法 ⁸⁾	約0.05 μ l	<ul style="list-style-type: none"> 液体窒素保管中のコンタミネーションの危険がほぼない 冷却速度が非常に大きい 融解後の生存率が高い 	<ul style="list-style-type: none"> 複数個の胚の封入が困難

表2 培養液が施設内に届いてから胚培養に使うまでの留意点

培養液の扱い	留意点
施設に届き、冷蔵庫まで	<ul style="list-style-type: none"> 冷蔵庫に入れる直前まで保冷剤を離さない ロットの確認、記録。ロット変更の時はpH、浸透圧、真菌・細菌検査を行う
瓶を開封して分注まで	<ul style="list-style-type: none"> 分注前に、取り分ける空スピッツに使用期限等の記載を済ませてから冷蔵庫より瓶を取り出す 分注後は速やかに蓋をし冷蔵庫へ。分注したスタッフ名を記録 分注は5本までとする 開封してから1か月を過ぎた瓶は使用しない 10回以上蓋を開けた瓶は使用しない
使用前日の準備	<ul style="list-style-type: none"> 分注から5日を過ぎたスピッツは廃棄する 終業時に冷蔵庫より取り出し平衡化開始
使用当日の作業	<ul style="list-style-type: none"> 培養ディッシュにドロップ作成しオイルカバーするまでウォーマーの上にディッシュを置かない クリーンベンチ上で作業し上流に何も物を置かない カバーするオイルは培養液の浸透圧上昇を抑えるためヘビーオイルを使用

を最良な環境で見守りながらもこちらからは余計な変化を決して与えないという、ラボの品質管理が重要である。

おわりに

胚凍結、胚培養について、筆者が行っている工夫あるいは重要視している点について述べた。胚培養士の業務のなかでも培養や凍結は、妊娠に直結する要の仕事であり患者か

らの相談も多い。胚移植してから10日後、患者を目の前に妊娠結果を告げることになる医師に意見を求められたときには、培養状況の説明や、問題点があれば適切に提起することも必要である。それだけに、ラボ内の品質維持がものなのであることを心に留め、業務にあたりたいと思っている。

表3 ロット別毎週の振り返り表

name	date	.	A培養液 (~ 2020/8/31) + HSA					B培養液 (~ 2020/5/28)					2PN数	利用数	妻年齢	ART回数	ET回数	妊娠		
			1	2	3	day3割球	グレード	1	2	3	day3割球	グレード								
〇〇〇〇	2020/〇/〇	割球数	7	6		6.5		2	0	8			8.0		1	1	36	1	0	〇
		グレード	2	2			2.0			2			2.0							
〇〇〇〇	2020/〇/〇	割球数	8	4		6.0		2	1	7			7.0		1	0	44	1	0	
		グレード	2	2			2.0			3			3.0							
〇〇〇〇	2020/〇/〇	割球数	8			8.0		1	1	8	10		9.0		2	1	39	2	0	〇
		グレード	2				2.0			2	3		2.5							
〇〇〇〇	2020/〇/〇	割球数	9	8	6	7.7		3	1	5			5.0		1	0	35	1	0	
		グレード	3	2	3		2.7			2			2.0							
〇〇〇〇	2020/〇/〇	割球数	7			7.0		1	0	7			7.0		1	0	41	7	4	
		グレード	3				3.0			3			3.0							
〇〇〇〇	2020/〇/〇	割球数	8	8		8.0		2	1	10			10.0		1	0	41	7	5	
		グレード	3	3			3.0			2			2.0							
〇〇〇〇	2020/〇/〇	割球数	12	16	12	13.3		5	2	14	12	9	11.7		4	1	38	7	6	
		グレード	1	1	2		1.3			2	2	2	2.0							
〇〇〇〇	2020/〇/〇	割球数	7	7	6	6.7		5	0	7	7	7	7.0		5	3	30	2	1	〇
		グレード	3	3	3		3.0			3	3	3	3.0							
〇〇〇〇	2020/〇/〇	割球数	10	8	9	9.0		3	2	12			12.0		1	1	31	10	6	
		グレード	2	2	3		2.3			2			2.0							
〇〇〇〇	2020/〇/〇	割球数	7	5		6.0		2	0	8	4		6.0		2	1	42	3	0	
		グレード	2	3			2.5			2	2		2.0							
average			7.8	2.4			30.8%		average			8.3	2.4	42.1%	37.7	4.1	2.2			
S.D.			2.2	0.6			(8/26)		S.D.			2.4	0.5	(8/19)	4.7	3.3	2.7			

name	date	.	A培養液 (~ 2021/1/31) + HSA					B培養液 (~ 2020/7/8)					2PN数	利用数	妻年齢	ART回数	ET回数	妊娠		
			1	2	3	day3割球	グレード	1	2	3	day3割球	グレード								
〇〇〇〇	2020/〇/〇	割球数	12	10		11.0		2	2	6			6.0		1	0	36	2	1	
		グレード	2	2			2.0			2			2.0							
〇〇〇〇	2020/〇/〇	割球数	9	9		9.0		2	0	12	10	9	10.3		3	0	36	2	1	〇
		グレード	3	3			3.0			3	3	3	3.0							
〇〇〇〇	2020/〇/〇	割球数	10			10.0		1	0	12	7		9.5		2	1	42	18	12	
		グレード	3				3.0			2	3		2.5							
〇〇〇〇	2020/〇/〇	割球数	7	7		7.0		2	1	8			8.0		1	0	42	1	0	
		グレード	2	2			2.0			2			2.0							
〇〇〇〇	2020/〇/〇	割球数	10			10.0		1	0	8			8.0		1	1	42	12	9	
		グレード	2				2.0			3			3.0							
〇〇〇〇	2020/〇/〇	割球数	8			8.0		1	1	13	9		11.0		2	1	41	8	4	
		グレード	2				2.0			2	2		2.0							
〇〇〇〇	2020/〇/〇	割球数	4			4.0		1	0	8	7	7	7.3		4	1	36	1	0	
		グレード	2				2.0			1	2	2	1.7							
〇〇〇〇	2020/〇/〇	割球数	8	5		6.5		3	1	8			8.0		1	0	35	2	1	
		グレード	2	3			2.5			3			3.0	3.0						
〇〇〇〇	2020/〇/〇	割球数	8			8.0		1	1	5			5.0		1	0	39	1	0	
		グレード	2				2.0			2			2.0							
〇〇〇〇	2020/〇/〇	割球数	8	10	8	8.7		4	2	8	10	10	9.3		4	2	38	1	0	〇
		グレード	1	2	2		1.7			1	2	2	1.7							
〇〇〇〇	2020/〇/〇	割球数	8			8.0		1	1	10	9		9.5		2	2	34	1	0	〇
		グレード	3				3.0			3	3		3.0							
〇〇〇〇	2020/〇/〇	割球数	8			8.0		1	1	6			6.0		1	0	38	14	11	
		グレード	2				2.0			3			3.0							
〇〇〇〇	2020/〇/〇	割球数	8	12	12	10.7		3	2	8	8		8.0		2	1	28	1	0	〇
		グレード	3	2	2		2.3			2	2		2.0							
〇〇〇〇	2020/〇/〇	割球数	8	8		8.0		2	0	7	8		7.5		2	1	38	1	0	
		グレード	2	2			2.0			3	2		2.5							
〇〇〇〇	2020/〇/〇	割球数	8			8.0		0		10			10.0		1	0	44	3	2	
		グレード	2				2.0			2			2.0							
〇〇〇〇	2020/〇/〇	割球数	4			4.0		1	0	8			8.0		0		46	4	0	
		グレード	2				2.0			2			2.0							
average			8.1	2.2			46.2%		average			7.9	2.3	35.7%	38.4	4.5	2.6			
S.D.			2.0	0.4			(12/26)		S.D.			2.1	0.5	(10/28)	4.4	5.5	4.2			

文 献

- 1) Whittingham, D.G., Leibo, S.P. and Mazur, P. (1972): Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science*, 27, 411–414.
- 2) Trounson, A. and Mohr, L. (1983): Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight – cell embryo. *Nature*, 35, 707–709.
- 3) Rall, W.F. and Fahy, G.M. (1985): Ice – free cryopreservation of mouse embryos by vitrification. *Nature*, 313, 573–575.
- 4) Gordts, S., Roziers, P., Campo, R. and Noto, V. (1990): Survival and pregnancy outcome after ultrarapid freezing of human embryos. *Fertil. Steril.*, 53, 469–472.
- 5) Mukaida, T., Wada, S., Takahashi, K., Pedro, P.B., An, T.Z. and Kasai, M. (1998): Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos. *Hum. Reprod.*, 13, 2874–2879.
- 6) Yokota, Y., Sato, S., Yokota, M., Ishikawa, Y., Makita, M., Asada, T. and Araki, Y. (2000): Successful pregnancy following blastocyst vitrification. *Hum. Reprod.*, 15, 1802–1803.
- 7) Kuwayama, M. and Kato, O. (2000): All round vitrification of human oocytes and embryos. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 17, 477.
- 8) Larman, M.G. (2017): Appendix E: Rapid-iTM: Closed vitrification device by Vitrolife. *Methods Mol. Biol.*, 1568, 335–342.
- 9) Joaquim, D.C., Borges, E.D., Viana, I.G.R., Navarro, P.A. and Vireque, A.A. (2017): Risk of contamination of gametes and embryos during cryopreservation and measures to prevent cross-contamination. *Biomed. Res. Int.*, 2017, 1–11.
- 10) 城戸京子・熊迫陽子・大津英子・宇津宮隆史 (2014) : 新たな閉鎖系 vitrification 法を用いた胚盤胞の凍結融解胚移植における臨床成績の比較. *受精着床学会雑誌*, 31(2): 226–230.
- 11) Yao, T. and Asayama, Y. (2016): Human preimplantation embryo culture media: past, present, and future. *J. Mamm. Ova Res.*, 33, 17–34.