

— 総説 —

特集：第 64 回日本卵子学会学術集会 教育講演

哺乳動物の卵子と胚の凍結保存のメカニズムと 融解後の生存性に関わる要因

Factors affecting the survival of mammalian oocytes and embryos after cryopreservation

枝重 圭祐

Keisuke Edashige

高知大学農林海洋科学部 〒783-8502 南国市

*Laboratory of Animal Science, College of Agriculture and Marine Science, Kochi University,
200 Otsu, Monobe, Nankoku, Kochi 783-8502, Japan*

要旨：哺乳動物の卵子と胚の細胞膜の水と耐凍剤に対する透過性は、細胞内氷晶形成による傷害、耐凍剤の毒性による傷害、浸透圧的膨張/収縮による傷害などの主要な凍結傷害と密接に関係しており、高濃度の耐凍剤を含む保存液を用いるガラス化法では特に重要である。マウスでは、耐凍性が比較的低い卵子や初期卵割胚では、主に単純拡散によって水と耐凍剤がゆっくりと透過し、耐凍性が高い桑実期以降の胚では、主にアクアポリンを介した促進拡散によって速やかに透過している。このような水と耐凍剤の主要な透過経路の転換は哺乳動物全般にみられたが、種による違いも存在する。近年、我々はマウスの卵子/胚に有効な新しいガラス化法を開発した。この方法は、低濃度の耐凍剤を含む保存液を用いながらも卵子/胚への十分な耐凍剤の浸透と細胞の脱水/濃縮が可能で、細胞内氷晶が形成しにくい緩慢凍結法の長所と、簡単に短時間で保存できるというガラス化凍結法の長所を併せ持つ。

キーワード：卵子, 胚, 細胞膜透過性, アクアポリン, ガラス化凍結法

Abstract: The permeability of the plasma membrane to water and permeating cryoprotectants is important for the survival of mammalian oocytes and embryos after cryopreservation because it is closely related to major types of cryoinjuries: damages caused by intracellular ice formation, the toxicity of cryoprotectants, and osmotic shrinkage/swelling. Mammalian oocytes and embryos at early cleavage stages have low permeability to water and cryoprotectants and the movements across the plasma membrane are principally dependent on simple diffusion through the lipid bilayer. On the other hand, late stage embryos have high permeability to water and cryoprotectants and the movements across the plasma membrane are principally dependent on diffusion facilitated by aquaporins. Recently, we developed a new equilibrium vitrification method in which mouse embryos at multiple stages were vitrified in a highly dehydrated/concentrated state using solutions containing low concentrations of permeating cryoprotectants. Mouse embryos can be vitrified using this method without skilled techniques, miniature devices and a programmable freezer, and they can be transported with dry ice.

Key words: Oocyte, Embryo, Membrane-permeability, Aquaporin, Vitrification method

はじめに

(受付 2023年9月7日/受理 2023年10月2日)
別刷請求先：〒783-8502 高知県南国市物部乙200
高知大学農林海洋科学部
e-mail: keisuke@kochi-u.ac.jp

いくつかの哺乳動物種では未受精卵(卵子)と胚の凍結保存が実用化され、実験動物の系統保存、家畜の改良増殖、ヒトの不妊治療などに用いられている。しかし、卵子/胚の「凍結保存」とは呼ばれているが、細胞内が凍結すると、細胞は

破壊されて死滅してしまう。細胞を凍結保存後も生存させるためには、細胞内に氷晶を形成させることなくガラス転移温度以下まで冷却し、細胞質を固化（ガラス化）させなければならない。多くの細胞では、凍害保護物質（耐凍剤）を添加した保存液に細胞を浸し、細胞内へ耐凍剤を浸透させ、細胞を脱水/濃縮し、細胞内のガラス化を促進することにより凍結保存を可能にしている。しかしながら、凍結/融解過程では、0°C以上の低温で起こる低温傷害、耐凍剤の毒性による傷害、過度な浸透圧的膨張/収縮による傷害、フラクチャー傷害、細胞外氷晶形成による物理的傷害など、細胞内氷晶形成以外にも様々な傷害を受ける可能性がある。卵子と胚の凍結保存の成功には、これらの傷害すべてをクリアする工夫が必要である。卵子や胚の凍結保存後の生存性（耐凍性）は、動物種や系統、ステージによって異なる。この耐凍性の違いは、細胞の大きさ、低温感受性、細胞膜の水と耐凍剤に対する透過性、細胞の固形分含量、耐凍剤毒性に対する感受性、浸透圧的膨張/収縮に対する耐性などの低温生物学的特性の違いに起因すると考えられる。

マウスの卵子と胚における水と耐凍剤に対する細胞膜透過性

低温生物学的特性のなかで、細胞膜の水と耐凍剤に対する透過性は、細胞内氷晶形成による傷害、耐凍剤の毒性による傷害、浸透圧的膨張/収縮による傷害などの主要な傷害と密接に関係しており、凍結保存の成否を左右する重要な特性である（図1）。特にガラス化法は、高濃度の耐凍剤を含む比較的毒性の高い保存液を用いるため、極めて重要な特性である。細胞内外への水と耐凍剤の移動は、リン脂質二重膜を介した単純拡散とチャンネルを介した促進拡散によって行われている。単純拡散による透過は、リン脂質のアシル鎖の運動に依存しているため、透過性は低いとその温度依存性が高い。一方、促進拡散は、透過性は元々高く、温度による違いが小さい。したがって、水と耐凍剤が主にどちらの経路で細胞膜を透過しているかは、透過性とその温度依存性から知ることができる。これまでの研究から、水透過性（ L_p ）が4.5 mm/min/atm以上と高く、その温度依存性（ E_a ）が6 kcal/mol以下と非常に低い場合は、水は主にチャンネルを介した促進拡散によって細胞膜を透過しているのに対し、水透過性が低く、温度依存性が10 kcal/mol以上と非常に高い場合は、主に単純拡散によって細胞膜を透過していることが知られている¹⁾。20～25°Cのスクロースを含む高張液中にマウスの卵子と胚を浸漬した場合、卵子と初期卵割胚（2～8細胞期胚）では、水透過性は0.4～0.8 mm/min/atmと低く、温度依存性が10～13 kcal/molと高い²⁾。したがって、水は主に単純拡散によって細胞膜を透過していると推定される。一方、桑実期と胚盤胞期の胚では、水透過性は4～5 mm/min/atm高く、温度依存性が5～6 kcal/molと低いことから、主にチャンネルを介した促進拡散によって透過していると推定される³⁾。水の細胞膜内外への移動に関わるチャンネルは、生理的発現レベルでは水チャンネルであるアク

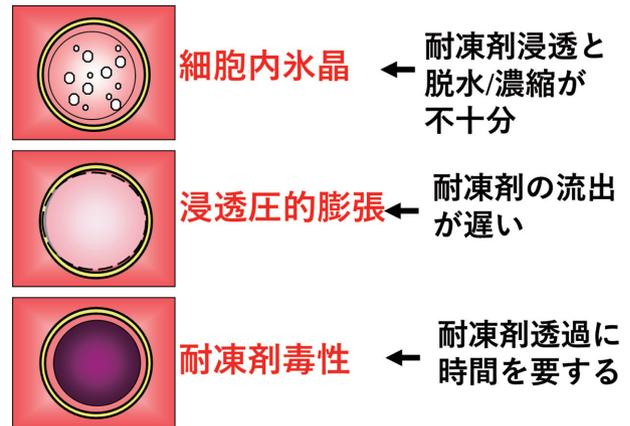


図1 細胞膜の水と耐凍剤に対する透過性に関わる主な傷害

アポリンのみと考えられている。実際、マウス胚では、初期卵割期におけるアクアポリンのタンパク質としての発現量は微量で細胞膜にはほとんど発現していないが、桑実期になるとアクアポリン3などが割球の頂端面側の細胞膜で強く発現するようになる⁴⁾。これが桑実期における水と耐凍剤に対する高い透過性に関わっている。さらに、マウス桑実胚で人為的にアクアポリン3の発現を抑制すると、水透過性は大きく低下する⁵⁾。したがって、桑実期以降の胚では、水は主にアクアポリン3を介して速やかに透過している。

耐凍剤透過性も、水透過性と同様に、卵子と初期卵割胚では低く、桑実期以降に大きく向上する。したがって、胚の発生ステージによる水透過経路の転換と同様の機構が耐凍剤透過経路にも働いていると考えられる。アクアポリン3は水だけでなく、耐凍剤を含む中性の低分子を透過する。そこで、マウス桑実胚におけるアクアポリン3の発現を抑制すると、水だけでなく、エチレングリコールとグリセロールに対する透過性が大きく低下する⁵⁾。一方、DMSOに対する透過性は低下しない。したがって、卵子と初期卵割胚では、耐凍剤も主に単純拡散によってゆっくり透過するのに対し、桑実期以降の胚では、アクアポリン3を含む複数の水チャンネルの発現が高くなり、耐凍剤は速やかに透過している。

耐凍剤存在下での細胞膜の水透過性はやや複雑である。グリセロール存在下では、桑実胚の水透過性は高いが、スクロースを添加した高張液中での透過性と比べると低い⁵⁾。エチレングリコール存在下では、桑実胚の水透過性は大きく低下し、温度依存性が著しく高くなる。したがって、桑実胚ではエチレングリコール存在下ではアクアポリン3が強く発現しているにも関わらず、水は主に単純拡散で透過していると推定される。また、プロピレングリコール存在下ではプロピレングリコール透過性と水透過性のいずれも温度依存性が高いことから、主に単純拡散で透過していると推定される。これらの結果は、上記の耐凍剤がアクアポリン3を透過する際に水と強い相互作用をしており、その結果とし

て水透過性に大きな影響を与えることを強く示唆している。一方、アクアポリン3をあまり透過しないと考えられるDMSO存在下では、桑実胚の水透過性はかなり高い。したがって、桑実期以降の胚のガラス化法用の保存液をデザインするには、水チャンネルを介した水と耐凍剤の相互作用について考慮する必要がある。

他の哺乳動物の卵子と胚における 水と耐凍剤に対する細胞膜透過性

ウシにおいても、卵子と初期卵割胚の水透過性は低く、桑実期以降の胚では大きく高くなる⁶⁾。しかしながら、卵子におけるスクロース添加高張液中での水透過性はマウスより高く、その温度依存性もやや低い。また、マウスと同様に桑実胚では水透過性は非常に高く、人為的にアクアポリン3の発現を抑制すると大きく低下する。したがって、ウシ胚では、マウスと同様に桑実期になるとアクアポリン3の発現量が上昇して、水透過性が向上している。しかしながら、マウスとは異なり、卵子と初期卵割胚では、単純拡散が主ではあるが、チャンネルを介した促進拡散が一部関与していると考えられる。耐凍剤透過性についても、マウスと同様に卵子や初期胚では低い。しかしながら、マウスの卵子と比べると透過性はやや高い。このようなウシ卵子におけるやや高い細胞膜透過性には、水と耐凍剤のいずれも透過するアクアポリン7の発現が関与していることが示唆されている⁷⁾。桑実胚では、マウスと同様にグリセロールとエチレングリコールに対する透過性は大きく向上する。一方、マウスの場合と異なり、DMSOの透過性はあまり向上しない。桑実胚でのアクアポリン3の発現を人為的に抑制すると、スクロース添加高張液中での水透過性、グリセロール透過性およびエチレングリコール透過性のいずれも大きく低下する。したがって、ウシにおいても桑実期以降の胚での水透過性と耐凍剤透過性の向上は、主にアクアポリン3を介した促進拡散による。

ブタにおいても同様の結果が得られている。卵子と初期卵割胚では、水透過性と耐凍剤透過性はマウスと同様にかなり低く、主に単純拡散によって透過していると推定される⁸⁾。しかしながら、桑実期においても、細胞膜透過性の向上はみられない。ブタ胚では、胚盤胞期、特に拡大胚盤胞期において、水透過性、グリセロール透過性およびエチレングリコール透過性が大きく向上する。しかしながら、ウシ胚と同様にDMSO透過性の向上はあまりみられない。アクアポリン3のmRNAの発現がこの時期に大きく向上することから、後期胚での水透過性と耐凍剤透過性の向上は主にアクアポリン3の発現によると推定される。

以上のように、マウス以外の哺乳動物の卵子や胚においても、卵子および初期卵割胚では水と耐凍剤は主に単純拡散によって細胞膜を透過しているが、後期胚においてアクアポリン3などの水チャンネルの発現の上昇により、主に促進拡散によって細胞膜透過性が大きく向上する(表1)。したがって、基本的には一つの動物種で開発された卵子と胚の凍結保存法は、他の動物種の卵子と胚の凍結保存に応用で

表1 哺乳動物の卵子/胚における水と耐凍剤の主な透過経路

水/耐凍剤	卵子	初期卵割胚	後期胚
Water	—	—	AQP3
Glycerol	—	—	AQP3
Ethylene glycol	—	—	AQP3
DMSO	—	—	±
Propylene glycol	—	—	—

—, 単純拡散; AQP3, アクアポリン3を介した促進拡散; ±, アクアポリン3以外の水チャンネルによる促進拡散が部分的に関与。

きると考えられる。しかしながら、種特異性は確かに存在することも考慮する必要がある。

凍結保存した卵子の胚の融解速度の重要性

-70°Cまで緩慢に冷却するオリジナルの緩慢法では、卵子や胚はほぼ平衡状態で脱水/濃縮がかなり進んだ状態で凍結されているため、緩慢に融解しても細胞内に氷晶が形成されにくいので、融解速度にあまり気を遣う必要はない。一方、ガラス化法で凍結する場合は、非平衡状態で脱水/濃縮が不十分な状態で凍結されるため、急速な冷却/融解が必須である。しかしながら、冷却速度と融解速度とでは重要度が異なる。SekiとMazurは、ガラス化法でマウス卵子を凍結した場合、冷却速度が比較的遅くても融解速度が十分速ければ、融解後の生存性は高いことを明らかにした⁹⁾。これは、たとえ冷却/融解過程で細胞内に氷核が形成されても、再結晶化速度より速く融解すれば致命的な傷害が起らないためであると考えられている。

耐凍性が低い卵子の凍結保存法として超急速ガラス化法がよくつかわれている。冷却/融解速度を上げるために、冷却時に卵子と胚が直接液体窒素と接触するオープンな方法がしばしば用いられているが、液体窒素は無菌ではなく、何らかの物質によって汚染されている可能性もある。凍結した卵子と胚の安全性を重視し、液体窒素と直接接しないクローズド法の開発が進んでいるが、しばしば高い冷却速度の維持が問題となっている。冷却速度が遅くなっても、再結晶化が抑制されるのに十分な速度で融解すれば高い生存性が得られるので、汚染防止のために冷却時だけサンプルをケース等に入れても、融解時にサンプルを融解液に直接浸漬すれば、生存性の低下を防ぐことができると考えられる。凍結保存用器具や容器をデザインするうえで、重要なファクターである。

平衡ガラス化法

哺乳動物の胚と卵子を凍結する方法には、従来から緩慢法が用いられている。オリジナルの緩慢法では、-70°Cまで冷却してから液体窒素で冷却して細胞をガラス化させる。この方法では、細胞の内外は平衡に保たれており、また-70°Cまで冷却するため細胞の脱水/濃縮度が高く、融解時

に氷晶が形成されにくいので、 -80°C で一時的に保存したり、ドライアイス (-79°C) 入りの簡易容器で輸送したりすることができる。しかしながら、冷却過程に非常に時間がかかるうえに、細胞外氷晶形成による傷害を受けて生存率が低下する可能性がある。また、低温感受性が高い細胞には使用できない。一方、近年主流になっているガラス化法では、非常に高濃度の耐凍剤を含む保存液に浸漬して液体窒素等で急速に冷却する。この方法は緩慢法と比べて極めて短い時間で凍結保存でき、細胞外氷晶が形成されないので融解後に高い生存性が期待できる。また、低温感受性が高い細胞に適用することができる。しかしながら、この方法で凍結された細胞は非平衡状態で凍結されており、細胞の脱水/濃縮が不十分なため、融解時に細胞内氷晶が形成されやすい。そのため、融解は必ず急速に行う必要がある。また、凍結した卵子と胚の輸送には液体窒素が必要で、大型で高価な容器が必要となる。もし、通常のガラス化法と同様の手順を用いて、オリジナルの緩慢法と同様に細胞を脱水/濃縮度が高い状態で凍結保存できれば、緩慢法とガラス化法の両者の利点を併せ持つ優れたガラス化法が開発できると考えた。

まず、細胞の脱水/濃縮を高めるために、我々はガラス化保存液中のスクロースの濃度を高めた高浸透圧の保存液を開発した^{10, 11)}。この方法では、20% (v/v) エチレングリコールを添加したFSa液 (0.5 M スクロース, 30% (w/v) Ficol PM-70を含むPB1液) で前処理した後、ガラス化保存液 (35~40% (v/v) エチレングリコールを添加したFSc液 (1.5 M スクロースと30% (w/v) Ficol PM-40を含むPB1液) で処理する。この方法で、マウスの2細胞期~桑実期の胚をガラス化凍結すると、 -80°C で4日間保持しても高い生存性が維持され、*in vitro*および*in vivo*のいずれにおいても高い発生能を維持していた。我々は、この方法を「平衡ガラス化法」と名付けた。この方法は持田らにより改良され¹²⁾、理化学研究所のマウスの遺伝資源保存に用いられている。

しかしながら、この方法に用いる保存液の浸透圧が極めて高いことから、高浸透圧や耐凍剤毒性に対する感受性が高い細胞では有効でないと考えられた。最近、我々は耐凍剤濃度が低く浸透圧も比較的低い保存液を用いる新しい平衡ガラス化法を開発した¹³⁾。この方法では、低濃度の耐凍剤を含む前処理液 (5% (v/v) エチレングリコールと5% (v/v) DMSOを添加したPB1液 (ED5/5)) と比較的low濃度の耐凍剤とスクロースを含む保存液 (エチレングリコール10% (v/v) とDMSO10% (v/v) を添加したFSa液 (EDFS10/10a)) を用い、適切な時間処理することによって、細胞への十分な耐凍剤の浸透と細胞の十分な脱水/濃縮を行う (表2)。この方法は、保存液の浸透圧と毒性のいずれもが低く、細胞内氷晶が形成しにくい緩慢凍結法の長所と、簡単に短時間で保存できるというガラス化凍結法の長所を併せ持つ。この方法はマウスの2細胞期胚、4細胞期胚、8細胞期胚および胞胚腔を潰した胚盤胞で有効で、 -80°C で4日間保持しても高い生存性と発生能を維持した状態で保存することができる¹⁴⁾。しかしながら、桑実胚では、直接液体窒素から急速に融解する場合の

表2 低濃度の耐凍剤を用いた平衡ガラス化法用保存液 (EDFS10/10a)

使用する溶液の名称	EG+DMSOの濃度 (v/v)	Diluent
ED5/5	10%	PB1
EDFS10/10a	20%	FSa

EG, Ethylene glycol; D, DMSO; FSa, PB1 medium containing 30% Ficol (w/v) + 0.5 M Sucrose

生存性は高かったが、脱水/濃縮は不十分で、 -80°C で数日間保持することはできなかった。おそらく細胞膜透過性が高いためと考えられる。

本方法は、今後、耐凍剤毒性や高浸透圧に対する感受性が高い動物種の卵子と胚への応用が期待される。

まとめ

哺乳動物の卵子と胚の細胞膜の水と耐凍剤に対する透過性は、細胞内氷晶形成による傷害、耐凍剤の毒性による傷害、浸透圧の膨張による傷害などの主要な凍結保存による傷害と密接に関係しており、高濃度の耐凍剤を含み毒性と浸透圧が高い保存液を用いるガラス化法では特に重要な特性である。卵子や初期卵割胚では、主に単純拡散によって水と耐凍剤はゆっくりと透過するのに対し、耐凍性が高い後期胚では、主にアクアポリン3を介した促進拡散によって水と耐凍剤が速やかに透過している。近年、我々はマウス胚に有効な新しい平衡ガラス化法を開発した。この方法は、低濃度の耐凍剤を含む比較的浸透圧が低い保存液を用いながらも胚を十分脱水/濃縮でき、細胞内氷晶が形成しにくい緩慢凍結法の長所と、簡単に短時間で保存できるというガラス化凍結法の長所を併せ持っている。

文献

- 1) Verkman, A.S., van Hoek, A.N., Ma, T., Frigeri, A., Skach, W.R., Mitra, A., Tamarappoo, B.K. and Farinas J. (1996): Water transport across mammalian cell membranes. *Am. J. Physiol.*, 270, C12-30.
- 2) Edashige, K. and Kasai, M. (2016): The movement of water and cryoprotectants in mammalian oocytes and embryos: membrane permeability and aquaporins. In: *Vitrification in Assisted Reproduction*, second edition (Tucker, M.J. and Lieberman J., eds.), pp. 47-59, CRC Press, Boca Raton.
- 3) Edashige, K., Tanaka, M., Ichimaru, N., Ota, S., Yazawa, K., Higashino, Y., Sakamoto, M., Yamaji, Y., Kuwano, T., Valdez, D.M. Jr., Kleinhans, F.W. and Kasai, M. (2006): Channel-dependent permeation of water and glycerol in mouse morulae. *Biol. Reprod.*, 74, 625-632.
- 4) Barcroft, L.C., Offenber, H., Thomsen, P. and Watson, A.J. (2003): Aquaporin proteins in murine trophectoderm mediate transepithelial water movements during cavitation. *Dev. Biol.*, 256, 342-

- 354.
- 5) Edashige, K., Ohta, S., Tanaka, M., Kuwano, T., Valdez, D.M. Jr., Hara, T., Jin, B., Takahashi, S., Seki, S., Koshimoto, C. and Kasai M. (2007): The role of aquaporin 3 in the movement of water and cryoprotectants in mouse morulae. *Biol. Reprod.*, 77, 365–375.
 - 6) Jin, B., Kawai, Y., Hara, T., Takeda, S., Seki, S., Nakata, Y., Matsukawa, K., Koshimoto, C., Kasai, M. and Edashige, K. (2011): Pathway for the movement of water and cryoprotectants in bovine oocytes and embryos. *Biol. Reprod.*, 85, 834–847.
 - 7) García-Martínez, T., Martínez-Rodero, I., Roncero-Carol, J., Vendrell-Flotats, M., Gardela, J., Gutiérrez-Adán, A., Ramos-Ibeas, P., Higgins, A.Z. and Mogas T. (2022): The role of aquaporin 7 in the movement of water and cryoprotectants in bovine *in vitro* matured oocytes. *Animals (Basel)*, 12, 530.
 - 8) Jin, B., Higashiyama, R., Nakata, Y., Yonezawa, J., Xu, S., Miyake, M., Takahashi, S., Kikuchi, K., Yazawa, K., Mizobuchi, S., Niimi, S., Kitayama, M., Koshimoto, C., Matsukawa, K., Kasai, M. and Edashige K. (2013): Rapid movement of water and cryoprotectants in pig expanded blastocysts via channel processes: its relevance to their higher tolerance to cryopreservation. *Biol. Reprod.*, 89, 87.
 - 9) Seki, S. and Mazur, P. (2009): The dominance of warming rate over cooling rate in the survival of mouse oocytes subjected to a vitrification procedure. *Cryobiology*, 59, 75–82.
 - 10) Jin, B., Mochida, K., Ogura, A., Hotta, E., Kobayashi, Y., Ito, K., Egawa, G., Seki, S., Honda, H., Edashige, K. and Kasai, M. (2010): Equilibrium vitrification of mouse embryos. *Biol. Reprod.*, 82, 444–450.
 - 11) Jin, B., Mochida, K., Ogura, A., Koshimoto, C., Matsukawa, K., Kasai, M. and Edashige, K. (2012): Equilibrium vitrification of mouse embryos at various developmental stages. *Mol. Reprod. Dev.*, 79, 785–794.
 - 12) Mochida, K., Hasegawa, A., Li, M.W., Fray, M.D., Kito, S., Vallelunga, J.M., Lloyd, K.C., Yoshiki, A., Obata, Y. and Ogura, A. (2013): High osmolality vitrification: a new method for the simple and temperature-permissive cryopreservation of mouse embryos. *PLoS One*, 8, e49316.
 - 13) Qiu, J., Hasegawa, A., Mochida, K., Ogura, A., Koshimoto, C., Matsukawa, K. and Edashige, K. (2021): Equilibrium vitrification of mouse embryos using low concentrations of cryoprotectants. *Cryobiology*, 98, 127–133.
 - 14) Qiu, J., Matsukawa, K., Koshimoto, C. and Edashige, K. (2021): Equilibrium vitrification of mouse embryos at various developmental stages using low concentrations of cryoprotectants. *J. Reprod. Dev.*, 67, 109–114.