

ヒト卵子および胚のガラス化保存について

Vitrification of human oocytes and embryos

桑山 正成

Masashige Kuwayama

加藤レディースクリニック、研究開発部

〒160-0023 東京都新宿区西新宿 7-20-3

R & D division, Kato Ladies Clinic

7-20-30, Nishishinjyuku, Shinjyuku, Tokyo 160-0023 Japan

Recent drastic advance in cryobiology/cryotechnology has made possible for preservation of various types of cells with little viability loss. Vitrification, the alternative cryopreservation method seems to be a powerful tool to any biological specimens, which can not be preserved by the conventional slow freezing method so far. We recently reported an efficient vitrification procedure for mammalian oocytes/blastocysts (minimum volume cooling; MVC method). Human oocytes/embryos were first equilibrated in 15% ethylene glycol (EG) for 5-10min followed by introducing vitrification solution(30% EG + 0.5M sucrose; S) for 30 s. Oocytes were then put on the top of Cryotop, the vitrification container with minimum volume VS, and immediately submerged in filter sterilized LN2. VS drops were thawed by plunging the top of the container into 1M S at 37C, and kept in 0.5M S for 5 min. After the recovery culture, oocytes were inseminated by ICSI, and cultured for 6 days. Vitrified PN embryos were culture and transferred on the next day, and blastocysts were transferred to the patients on the same day. Survival, 2PN and blastocyst rates of MII oocytes after vitrification were 91, 90 and 50%, respectively. Cleavage and blastocyst rates of 2PN oocytes after vitrification were 99 and 46%. survival rate after vitrification of blastocysts was 90%, and pregnancy rate after single transfer was 45%, respectively.

These results suggest high efficiency of the MVC method for cryopreservation of human MII oocytes, 2PN oocytes and blastocysts in human ART.

Key Words: Human, IVF, Vitrification, oocyte, embryo

緒言

体外受精を中心とした ART (Assisted Reproductive Technology: 生殖補助技術) は現在、不妊治療の主流となっており、我が国においても年間 70,000 件を越える IVF/ICSI 治療が行われ、すでに新生児の 100 人に 1 人は、いわゆる IVF ベビーとなっている。

このヒト IVF 周期における基幹技術の一つとして、採卵に関わる患者の身体的、精神的、経済的負担を軽減し、胚を治療に有効利用することを主目的として、緩慢冷却法を用いた胚の凍結保存法が日常利用されてきた。

一方近年、哺乳動物胚の新しい凍結保存技術として、氷晶を発生させずに細胞内外溶液を固化し、細胞を超低温保存する Vitrification (ガラス化保存) 法が利用されはじめ、これまで従来の緩慢凍結法では保存が困難であった低温感受性の高い卵子や低グレード胚の凍結保存が可能となっている。

生殖医療分野におけるヒト卵子および胚の凍結保存においても最近、ガラス化保存のアプローチが開始され、先進的な施設においては、すでに素晴らしい臨床的成果が得られている。

本講演では、我々のクリニックで行っているヒト卵子および胚のガラス化保存法を中心に、そのプロトコル、

臨床成績や将来展望について紹介する。

1. 最少容量冷却法 (Minimum Volume Cooling; MVC 法)

我々の Vitrification (MVC 法) は、以下の 6 つのステップから構成される。

(1) CPA (Cryoprotective Agents; 凍結保護物質) の細胞内浸透 (ローディング)

平衡液に胚を投入することにより、細胞に致死的な毒性の影響が出ない低濃度の細胞膜透過性 CPA (エチレングリコール; 7.5% EG + 7.5% DMSO) を浸透させる。平衡に必要な卵子/胚の CPA 曝露時間は細胞体積と膜透過性により異なるため、胚の発育ステージ、グレードや溶液温度により 5 ~ 20 分間の範囲内で適宜、修正する。

(2) ガラス化液による細胞内の濃縮

ガラス化液 (15% EG + 15% DMSO + 0.5M sucrose) への投入により、平衡液との浸透圧差を利用して細胞内自由水を脱水し、Cytogel の相対的な CPA 濃度を 50% 以上に濃縮する。このステップでは、同時に細胞外溶液をガラス化液に置換するため、凍結時の細胞外氷晶形成も防止可能となる。

(3) 液体窒素投入による急速冷却

超急速冷却法によるガラス化保存のために独自に開発した凍結用コンテナ、Cryotop(北里サプライ製)を用いてガラス化保存を行う。

最少容量のガラス化液とともに卵子/胚を Cryotop 先端部のシート上にのせ、直ちに液体窒素中に直接投入して急速冷却する(最少容量冷却法; MVC 法)。この MVC 法により、 $-23000^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 以上の超急速冷却が可能である。冷却速度が早いほど氷晶形成時間を短縮できるため、ガラス化液濃度を低下させることが可能である。

(4) ガラス化転移点以下の温度域での保存

液体の水が固化するガラス化転移点(約 -120°C)以下では、水分子を含め、卵子/胚を構成する物質分子は運動エネルギーを失うため、細胞は劣化しない。実際には、さらに低温である液体窒素中(-196°C)で保存するため、卵子/胚は活力を維持したまま半永久的に保存することが可能である。

(5) 急速加温法による融解

凍結細胞を加温中、特に -20°C ～ -80°C の温度域は氷晶成長速度が早いため、移動再結晶による細胞内凍結により細胞が破壊されやすい(Devitrification; 脱ガラス化)。溶液の加温時の脱ガラス化は、冷却時のガラス化失敗よりもはるかに発生しやすいため、ガラス化保存卵子/胚の融解には、さらに急速な加温速度が必要で

ある。MVC 法では、 37°C の希釈液(1M sucrose)で卵子/胚を直接融解することにより、 $+43000^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の超急速な加温が得られ、氷晶形成による細胞の物理的損傷が発生しない。

(6) 細胞内 CPA の希釈、洗浄

融解直後の卵子/胚細胞内は冷却時同様、収縮により高度に濃縮されており、細胞内浸透圧は 4500mmOsmol 以上に上昇している。胚細胞膜は細胞体積の急激な増加による膨張に弱く、一般にその 1.3 倍程度が細胞膜維持の限界とされている。そこで、浸透圧緩衝剤であるシュクロースを希釈液に添加し、かつ 3 段階のステップワイズ(1M, 0.5M シュクロース溶液)を用いることで、細胞内への一時的な過復水を緩和し、細胞の極度の膨張を抑制しながら CPA を希釈、洗浄し、浸透圧を等張へと調整する。

2. 「ヒト卵子/胚への Vitrification 法の応用」

当クリニックでは、年間 10000 症例を越える IVF/ICSI 周期を行っている。IVF 治療方針において、凍結保存は、未受精卵(成熟卵子)、前核期および胚盤胞期のステージにおいて行われている。現在では、凍結保存が必要とされる全ての症例において、クライオトップを利用した MVC 法によるガラス化保存法を用いている。以下、各ステージの卵子/胚の Vitrification に関する特徴と結果について述べる。

(1) 未受精卵のガラス化保存

この技術によって、放射線および化学療法による医源性不妊の回避、すなわちあらかじめ卵子を凍結保存しておき、治療後に融解、IVF/ETを行うことにより、未婚女性の妊孕性を維持することが可能である。また将来的には、職業的理由や晩婚により高齢となった女性が挙児を希望する場合、若年のうちに自己の卵子を保存しておく、いわゆるセルフ卵子バンクにより卵子の老化による不妊を回避できる。さらに本技術は、ドネーションを目的とした卵子バンクの確立を技術的に可能とする。

未受精卵は、胚や他の体細胞に比べて細胞体積が極度に大きいばかりでなく、球形であるため、単位体積あたりの表面積が最小となり、浸透圧変化による物理的影響を最も受けやすい。受精前の卵子は受精卵と比べて原形質膜透過性が低いいため、凍結・融解過程での脱水および復水による細胞内の障害が発生しやすい。しかしながら低濃度(30%v/v in total)のガラス化液を用いる MVC 法により、保存後の高い生存率 (91%) や移植後の妊娠例も得られている。

(2) 前核期卵子のガラス化保存

IVF 周期において重要な前核期卵子の凍結保存は、当クリニックにおいても最近まで、プロパンジオールを用いたコンベンショナルな緩慢凍結法で行われていた。しかし、膜透過性の高いこのステージの胚では、

Vitrification 法がより優れた凍結保存効果を発揮し、MVC 法により、融解後ほぼ 100%(343/344)の生存率が得られた。我々が技術指導を行っている他の6施設においても、昨年よりすでにルーチンワークにおいて、前核期卵子を Vitrification 法で凍結保存し、従来の緩慢凍結法よりも優れた良好な臨床成績が得られている。

(3) 胚盤胞のガラス化保存

近年、子宮環境に同調する胚盤胞にまで胚を体外培養してから移植する、Blastocyst Transfer (BT)法により高い妊娠率が国内外で相次いで報告されている。同調した子宮への BT により高妊娠率が得られることは、これまでに報告されている全ての哺乳動物種に共通した事実でもある。我々も最近、胚盤胞の1胚移植により約 40%の高い妊娠率を得ており、このステージの移植胚数は1胚で十分であると考えている。そこで通常の場合、移植後の余剰胚盤胞を凍結する必要性が生じ、Vitrification 法の適応を検討した。すでに最初の分化が完了し、また細胞体積が極めて小さく、膜透過性の高い胚盤胞は、他の動物種同様、凍結保存後の高い生存率が得られた。すなわち、MVC 法により 90%以上の生存率が得られ、Vitrification 胚移植後の妊娠率(45%)は、非凍結胚移植群とほぼ同様の高い値であった。

3. 「Vitrification 法の将来展望」

Vitrification 法は、従来の緩慢凍結

法では凍結保存することが困難であった様々な哺乳動物種由来の卵子や胚、あるいは凍結が困難であったステージの生殖細胞やさらには卵巣組織の一部を、その手法の若干の修正によってそれぞれの細胞にプロトコールを最適化させることにより、可能としてきた。

生殖医療分野においては、今後さらに未成熟卵子、体外成熟卵子など活力の低い卵子、あるいは高齢患者由来の老化卵子のように耐凍性の極めて低

い卵子を、凍結保存後の生存性の損耗を最小化して保存するために、さらなる技術開発が必要である。そのストラテジーとして、植物や酵母等で報告されている、低高温感作や磁気処理により細胞自身に耐凍性を付加する物理的前処理、ガラス化液環境を改善する天然の抗酸化剤、氷核形成阻害剤や、また最近その有効性が注目されている極魚由来非凍結蛋白質などの氷晶成長抑制剤の利用などが考えられる。

文献

1. 森 崇英、辰巳賢一： 生殖補助医療の現状、生殖補助医療、武谷雄二編、中山書店、東京、64-72, 1999.
2. Trounson A, Mohr: Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of eight-cell embryo. *Nature* 305, 707-709, 1983.
3. Rall, W.F. and Fahy, G.M Ice-free cryopreservation of mouse embryos by vitrification. *Nature* 313, 573-575, 1985.
4. 桑山正成：Vitrification 法の展開、体外受精 Update、鈴木秋悦編、メジカルビュー、東京、230-234、2001.
5. Kuwayama. M., Osamu, Kato. All round vitrification of human oocytes and embryos. *J. Assist. Reprod. Gentic.* 17(8) P477, 2000.