

第 53 回日本哺乳動物卵子学会
2012.05.26-27 大阪

次世代型凍結法への模索
—閉鎖型超急速凍結保存法の検討—
**The search for the next-generation of
cryopreservation system**
—Examination of the closed vitrification
device—

大住 哉子・濱 聡子・橋本 周・天羽 杏実
佐藤 学・赤松 芳恵・中岡 義晴・森本 義晴
Kanako OHSUMI, Satoko HAMA,
Shu HASHIMOTO, Ami AMO, Manabu SATOH,
Yoshie AKAMATSU, Yoshiharu NAKAOKA,
Yoshiharu MORIMOTO

IVF なんばクリニック

【目的】現在、多くの ART 施設で導入されている凍結方法は、胚が液体窒素に直接曝露される超急速凍結保存法であるが、この方法では液体窒素内での胚へのウィルス感染の危険性が指摘されている。これを回避するためには、胚が液体窒素に直接接触しないことが必須である。今回、胚の安全性を考慮した閉鎖型の超急速凍結保存法である Rapid-i を用い、従来の開放型超急速凍結保存法である Cryotop との比較検討を行った。

【方法】

《凍結融解方法》凍結保存液および融解液には Rapid-i, Cryotop とともに Vitrification Media および Thawing Media (KITAZATO BioPharma Co.,Ltd)を用いた。胚を平衡溶液に 10 分間浸漬した後、凍結溶液へ移し 1 分間で以下のそれぞれの方法で凍結を行った。Rapid-i の場合、Rapid-i™ (Vitrolife)の先端の穴 (直径 400 μ m) に少量の凍結溶液とともに胚を注入し、あらかじめ液体窒素内で冷却した外筒に挿入し封入した。Cryotop の場合、ガラス化保存容器 Cryotop(KITAZATO BioPharma Co.,Ltd)のシート先端に少量の凍結溶液とともに胚を載せ、液体窒素内へ投入しキャップをした。融解は融解液に 1 分、希釈液に 3 分、洗浄液に 5 分浸漬することで行った。

《実験①》研究用に同意が得られた前核期凍結保存胚を融解した後 10 時間で分割した胚を Rapid-i

群と Cryotop 群にランダムに配位し、再凍結、融解を行い、融解後の生存率を調べた。生存した胚を受精後 6 日目まで培養を続け、5 日目での胚盤胞到達率、6 日目での胚盤胞到達率、6 日目での胚盤胞の細胞数を調べた。

《実験②》研究用に同意が得られた胚盤胞期凍結保存胚を融解した後、ランダムに以下の 3 群に配位した。再凍結を行わなかった Control 群の胚、再凍結、融解を行った Rapid-i 群と Cryotop 群に分けた胚を、Hoechst と Propidium Iodide を用いた二重染色によりダメージを受けた細胞の割合を比較した。

【結果】《実験①》研究に用いた胚のドナー年齢は、Rapid-i 群 34.4 ± 0.5 歳、Cryotop 群 33.9 ± 0.6 歳で差はなかった。融解後の生存率、5 日目での胚盤胞到達率、6 日目での胚盤胞到達率、6 日目での胚盤胞の細胞数は Rapid-i 群それぞれ 100.0%、 $50.0 \pm 8.7\%$ 、 $67.6 \pm 8.1\%$ 、 136.9 ± 13.6 細胞、Cryotop 群それぞれ 96.9% 、 $50.0 \pm 9.0\%$ 、 $56.3 \pm 8.9\%$ 、 138.1 ± 18.3 細胞となり、両群間に統計的な差は認められなかった。

《実験②》研究に用いた胚盤胞のドナー年齢は、Control 群 32.4 ± 0.8 歳、Rapid-i 群 33.3 ± 0.7 歳、Cryotop 群 33.2 ± 0.9 歳で差はなかった。胚盤胞の全細胞数は Control 群 60.4 ± 6.0 細胞、Rapid-i 群 64.0 ± 4.7 細胞、Cryotop 群 57.8 ± 4.6 細胞であり、ダメージをうけた細胞の割合は Control 群 $32.4 \pm 3.3\%$ 、Rapid-i 群 $30.8 \pm 5.1\%$ 、Cryotop 群 $38.1 \pm 3.9\%$ でそれぞれ 3 群間に統計的な差は認められなかった。

【結論】本実験の結果から、閉鎖型の超急速凍結保存法の凍結融解後の生存性は従来の開放型超急速凍結保存法と同等であることが明らかにされた。液体窒素等を介した感染のリスクを考慮すると閉鎖型の Rapid-i を使用することにより、より安全な医療技術の提供につながると考えられる。今後、臨床への応用も検討していく予定である。