

マウス着床前胚の新規密閉培養法の開発と
ライブセルイメージング技術への応用

山梨大学大学院
医工農学総合教育部
博士課程学位論文

2024年3月

菊池 康之

目次

序章	3
1. 従来の受精卵体外培養.....	3
2. ライブセルイメージング技術.....	5
3. 培養技術の課題.....	5
第1章 CO₂最適化培地を用いたマウス初期胚の密閉培養	7
1-1. 序論.....	7
1-2. 材料及び方法.....	8
1-2-1. マウス.....	8
1-2-2. 培地.....	8
1-2-3. 体外受精 (IVF).....	12
1-2-4. 体内受精二細胞期胚の採取.....	12
1-2-5. CO ₂ 最適化 (Optimised CO ₂ -containing; OptC)培地の準備.....	12
1-2-6. 密閉容器での胚培養.....	15
1-2-7. 胚移植.....	15
1-2-8. 免疫染色.....	15
1-2-9. 統計解析.....	15
1-3. 結果.....	16
1-3-1. OptC 培地の作製.....	16
1-3-2. OptC 培地を用いた密閉系での培養.....	16
1-3-3. 完全に CO ₂ インキュベーターを使用しない密閉培養.....	25
1-4. 考察.....	28
第2章 Ops 培養法を用いた着床前胚の簡易輸送法の確立	29
2-1. 序論.....	29
2-2. 材料及び方法.....	31
2-2-1. 登山用水筒内での胚培養.....	31
2-2-2. 登山用水筒を用いた胚輸送.....	31
2-3. 結果.....	33
2-3-1. 登山用水筒内の温度変化.....	33
2-3-2. 登山用水筒での胚培養.....	35
2-3-2. 登山用水筒を用いた胚輸送.....	39
2-4. 考察.....	43
第3章 Ops 培養法を用いたマウス受精卵の新規ライブセルイメージング技術の開発	45

3-1. 序論.....	45
3-2. 材料及び方法.....	47
3-2-1. ガラスキャピラリー内での胚培養.....	47
3-2-2. Glass Capillary Time-lapse observation (GCT)法によるタイムラプス撮影.....	49
3-2-3. mRNA の準備.....	49
3-2-4. 受精卵への mRNA のマイクロインジェクション.....	49
3-2-5. 卵子細胞質内精子注入法 (ICSI).....	49
3-2-6. GTC 法による蛍光ライブセルイメージング.....	50
3-2-7. 統計解析.....	50
3-3. 結果.....	51
3-3-1. ガラスキャピラリー内の胚の観察方法.....	51
3-3-2. 培養に最適なガラスキャピラリーの検討.....	53
3-3-3. サーモプレートは胚の正常な胚発生に十分な温度を与える.....	56
3-3-4. 新規タイムラプス撮影技術の開発.....	63
3-3-5. GCT 法による蛍光ライブセルイメージング.....	70
3-4. 考察.....	73
総括.....	75
論文内容の要旨.....	78
SUMMARY OF DISSERTATION.....	81
謝辞.....	84
参考文献.....	85

序章

1. 従来 of 受精卵体外培養

哺乳類は胎生であるため、次世代を得るために受精から個体形成までの発生過程の全てを胎内で行う。哺乳類のモデル動物であるマウスでは卵管で成熟卵子が排卵されたのち、卵管までたどり着いた精子と受精することで受精卵となり、桑実胚に発生しながら子宮に流れる¹。子宮到着後は胚盤胞へと発生し、着床することで個体形成が始まる。このように哺乳類初期胚の発生は全て胎内で行われるため、発生過程の詳細な理解は非常に困難である。さらに哺乳類の発生メカニズムは他の動物種と大きく異なりゲノムインプリンティング機構²や哺乳類特異的な臓器である胎盤での母体とのコミュニケーションによって発生が進行する³。このような機構の解明は再生医療や不妊治療などに貢献できると考えられている。

胎内で行われる哺乳類の胚発生の理解のために体外培養を行う研究は1950年代から現在も進められている。マウスでは1968年に体外受精が成功し⁴、初期胚の体外培養は同年に着床前最後のステージである胚盤胞期までの培養に成功している⁵。他の哺乳類においても、ウサギ^{6,7}、ヒト^{8,9}、ウシ¹⁰、ブタ¹¹など多くの動物種で高い受精率、発生率での体外受精や体外培養が可能となっている。これにより初期胚解析が可能になるだけでなく、処理した胚を胚移植することにより個体形成能の評価が可能になる。個体形成可能な胚を体外培養できることにより遺伝子組み換え動物の作出やヒトにおける不妊治療にも臨床利用される。このように受精卵の体外培養技術は発生学の基盤技術になっている。

現在行われている体外培養系ではCO₂インキュベーターを用いて胎内環境を再現することで行なっている。CO₂インキュベーターは37°C、CO₂分圧5%、飽和水蒸気下を槽内に供し培養環境の維持を可能にする。プラスチックディッシュに培養培地のドロップを作り、ミネラルオイルで覆い培養ディッシュを作製し受精卵をドロップ内で培養する。このような開放系での培養により培養した胚の観察や操作を自由に行いつつ安定した発生を維持することができ、広く使用されている(図0)。

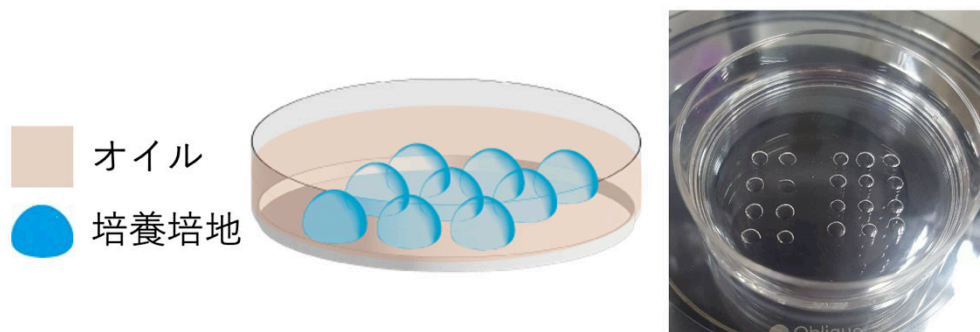


図 0 ディッシュを用いた胚培養

胚培養はディッシュに培養培地のドロップを作製し、オイルを張り CO₂ インキュベーター内で培養する。これにより CO₂ を取り込むことで pH を維持し最適な培養環境を維持している。(左) 模式図、(右) 実際の培養ディッシュ。

2. ライブセルイメージング技術

着床前胚の解析は、発生生物学のメカニズムを研究する上で重要であるがその多くが胚への侵襲性の高いものである。ライブセルイメージング技術は侵襲性が低く、多くの解析に使用される重要な技術として使用されている。化学固定を必要とする免疫染色や胚を溶解して解析する RNA シーケンスなどでは、解析した胚の発生率と連関したデータを得ることは困難である。最も簡易な解析は培養中の胚の顕微鏡による発生ステージの観察があげられるが、観察を行うために CO₂ インキュベーターから胚を取り出す必要があり、温度や気相、光が胚へのストレスとなる。低温での胚培養では発生率やアポトーシスを誘起し胚盤胞率の低下^{12,13}を招くことや、光照射により DNA 損傷や ROS 産生が増加し、産仔率が低下してしまうことが報告されている¹⁴。さらに、CO₂ インキュベーターのドアの開閉は槽内の培養環境を悪化させ、胚盤胞発生率が低下してしまう¹⁵。そこで胚の質を損ねずに詳細な解析が可能であるライブセルイメージング技術が開発された。

1929 年、哺乳類胚のライブセルイメージング解析が初めてウサギ胚で成功した¹⁶。しかし観察期間は短く、生体内から採卵した胚を用いる必要があった。それ以来ライブセルイメージングは細胞や胚へのダメージを抑えることで培養期間を伸ばし、現在では多くの動物種で用いられている。さらに、ヒトの生殖補助医療における胚の発生速度や形態解析で一般的に使用されており、着床前段階でクオリティを評価できるため、胚移植に適した胚の選択を可能にしている。

3. 培養技術の課題

胚培養は前述されている通りほとんど完成された技術であるが、コストと導入が困難な点が課題となっている。近年では体細胞核移植胚のような発生が困難である胚の培養においても改善が進められており、脱イオン化ウシ血清アルブミン、トリコスタチン A とビタミン C を培地中に添加することで大幅な改善をすることができた¹⁷。しかし安定した培養を行うことは難しく、使用する試薬や機器の種類やロットによって培養に大きな影響が出てしまう。オイルは培地の蒸発を防ぐために使用されるがロットやメーカーや種類、さらには洗浄の有無で胚発生に大きな影響を与える¹⁸⁻²⁰。CO₂ インキュベーターはドライ型と加湿型があり胚発生には加湿型が良いとされる²¹がコンタミネーションのリスクが上がってしまうため選択が難しい。一番影響が大きいとされる培地は動物種ごとにも複数種類あり、既製品もある一方実験動物の胚培養であれば研究室ごとに調整することも少なくはない。その場合においても水の種類²²、試薬のロットやメーカーによって培養できるものが決まっており、特に BSA はロットごとに発生率に差が出やすい²³。培養実験を始めるためにはすでに培養ができていく機関の知見は必須である。さらに培養コストの高さも問題となっている。CO₂ の供給コスト、既製品の培地や培養に最適なオイルや専用のディッシュは単価が高い上に消耗していくため培養の度に必要となる。さらには、CO₂ インキュベーターは槽内

の環境維持のために大きいサイズのを少人数で使うことが胚発生には良いとされるが本体のコストが高いためこれも困難である。このように経験がない人が始めるには胚培養は未だにハードルの高い技術のままである。

本研究では胚培養の課題であるコストと技術を削減するために CO₂ インキュベーターを用いない新規胚培養法の開発を試みた。さらに新規技術を使用することで新規胚輸送法とライブセルイメージング技術の開発を行い、胚培養に関わる関連技術の低コスト化、簡便化を目指した。

第1章 CO₂最適化培地を用いたマウス初期胚の密閉培養

1-1. 序論

従来の胚培養の問題の原因の一つにCO₂インキュベーターを使用するため装置本体のコストや維持費が必要となることが挙げられる。さらには培養中に故障や停電が起きることで培養中の胚発生が停止してしまうことが懸念される。これらを解決するために本章ではCO₂インキュベーターを用いない新規胚培養方法の開発を試みる。

これまでもCO₂インキュベーターを用いない培養方法(インキュベーターフリー)が開発されているが現在も広く使用されているものは少ない。Vajtaらによって混合ガスと胚の入ったディッシュをアルミホイルバッグに入れウォーターバス内で行うSubmarine incubation systemがインキュベーターフリーの先駆けとなっている²⁴。しかしながら発生率や胚盤胞細胞数など培養の質の低下が報告されている²⁵。またOzawaらはpH緩衝剤を培養培地に加え密閉したガラスチューブ内でのブタ胚の培養を試み発生率はわずかに低下したが平衡化した培地を使用することで密閉容器内での胚培養できることを示した²⁶。同様な研究はマウス胚でも報告されている^{27,28}。しかしこれらの研究ではいずれもCO₂インキュベーターを使用しており根本的な解決にはなっていない。SwainはCO₂を化学合成することで供給ができる特殊な装置を開発し報告した²⁹。さらに彼らはHEPES、MOPSなどのpH緩衝培地を用いることでCO₂インキュベーターの外であっても胚発生が可能であることを報告した³⁰。しかしながらpH緩衝剤の毒性もありHatchingや胚盤胞細胞数が減少してしまう。したがって、これらの研究はより簡易な胚培養が可能であることを示しているが、未だに改善が必要とされている。

これまでのインキュベーターフリーはいずれもCO₂を供給し続け密閉した容器の中で培養を行っていた。それにより培養系が複雑になり必要な機器や手間が増え高効率および低コストでの培養が難しくなっていた。そこで本研究では予め培地中のCO₂分圧を胚培養に最適に調整することで培養中のCO₂供給が不要になりよりシンプルな培養系になると考えた。供給をその培地を胚と共に空気の出入りが無い密閉容器に入れ培養に必要な温度を維持するだけで胚培養に必要な条件を満たし³¹⁻³⁵簡易かつ安定した培養が可能であると考えた。またこの系を用い密閉容器や保温機器を自由に選択することができれば必要な培養状況に応じ応用が効く系になると考えた。

本章では、マウス胚の新規インキュベーターフリー培養法の開発を試みた。最適なCO₂分圧を含む培養培地(CO₂最適化培地; Optimised CO₂-containing medium; OptC培地)と密閉可能なチューブ、および恒温槽を使用することで胚の最適な培養環境を維持できると考えた。本方法により胚培養が可能になれば、胚培養コストが大幅に削減されるうえ停電などの事故に対するリスクを削減することができる。

1-2. 材料及び方法

1-2-1. マウス

ICR 系統はメスマウスとオスマウスともに、日本エスエルシー株式会社より購入、一部は自家繁殖により得られたマウスを使用し、特筆されていない限り ICR 系統を用いた。B6D2F1、C57BL/6N 系統のメスマウスとオスマウスは、日本エスエルシー株式会社より購入した。メスマウスは 8-12 週齢、オスマウスは 10 週齢以上の個体を使用した。胚移植のレシピエントとして用いた偽妊娠マウスは精管結紮により不妊処理を行なったオスマウスと交配させることにより用意した。全てのマウスは実験に使用したその日のうちに頸椎脱臼もしくは二酸化炭素の吸引により安楽死させた。全ての実験は、「動物の保護及び管理に関する法律」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」および山梨大学の定める規程により設置されている動物実験専門委員会の審査を経たのち、動物愛護と安全について細心の配慮をもって行った。全てのマウスは室温 25°C、湿度 50%、日長 14 h に管理し、特定病原体除去環境下で飼育した。市販の飼料を与え、蒸留水を自由摂取させた。

1-2-2. 培地

体外受精での精子前培養と媒精に HTF 培地³⁶(表 1-1)を用いた。受精卵の体外培養では CZB 培地³⁷(表 1-2)を用いた。体内受精胚を取り出すための卵管灌流では HEPES-CZB 培地³⁸(表 1-3)を用いた。

表 1-1 HTF 培地組成

Reagent		mg /100 ml
(ストック)		
NaCl	[Wako] #191-01665	581.7
KCl	[Wako] #163-03545	35.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	[nacalai tesque] # 21002-85	5.0
KH ₂ PO ₄	[Wako] #169-04245	5.0
NaHCO ₃	[Wako] #191-01305	210.0
Phenol red	[Sigma-Aldrich] #114537	適量
(エナジーソース)		
D(+)-Glucose	[Wako] #049-31165	50.0
Pyruvic acid, sodium salt	[MP Biomedicals, Inc.] #194734	3.6
Sodium DL-lactate solution	[Sigma] #L7900	400 (μl)
Penicillin G Potassium Salt	[MP Biomedicals, Inc.] #194536	10.0
Hypotaurine	[Sigma-Aldrich] #H1384	11.0
CaCl ₂ · 2H ₂ O	[Wako] #038-19735	30.0
Albumin, Bovine Serum, Fraction V, Crystalline	[Millipore] #12657-5GM	300.0

表 1-2 CZB 培地組成

Reagent		mg /100 ml
(ストック)		
NaCl	[Wako] #191-01665	476.0
KCl	[Wako] #163-03545	36.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	[nacalai tesque] # 21002-85	29.0
KH ₂ PO ₄	[Wako] #169-04245	16.0
EDTA · 2Na	[Dojindo] #N001	4.0
NaHCO ₃	[Wako] #191-01305	211.0
D Glucose	[Wako] #049-31165	100.0
Penicillin G Potassium Salt	[MP Biomedicals, Inc.] #194536	5.0
Streptomycin	[MP Biomedicals, Inc.] #194541	7.0
Sodium DL-lactate solution	[Sigma] #L7900	0.53 (ml)
Phenol Red sodium salt	[Sigma-Aldrich] #114537	適量
(エナジーソース)		
L-Glutamine	[Sigma] #G8540	15.0
Pyruvic acid, sodium salt	[MP Biomedicals, Inc.] #194734	3.0
CaCl ₂ · 2H ₂ O	[Wako] #038-19735	25.0
AlbuMAX™ I Lipid-Rich BSA	[Life Technologies Corporation] #11020021	500.0

表 1-3 HEPES-CZB 培地

Reagent		mg /100 ml
NaCl	[Wako] #191-01665	476.0
KCl	[Wako] #163-03545	36.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	[nacalai tesque] # 21002-85	29.0
KH ₂ PO ₄	[Wako] #169-04245	16.0
EDTA · 2Na	[Dojindo] #N001	4.0
NaHCO ₃	[Wako] #191-01305	42.0
Sodium DL-lactate solution	[Sigma] #L7900	0.53 (ml)
HEPES sodium salt	[Sigma] #H7006	520.0
D(+)-Glucose	[Wako] #049-31165	100.0
Pyruvic acid, sodium salt	[MP Biomedicals, Inc.] #194734	3.0
L-Glutamine	[Sigma] #G8540	15.0
Penicillin G Potassium Salt	[MP Biomedicals, Inc.] #194536	5.0
Streptomycin	[MP Biomedicals, Inc.] #194541	7.0
CaCl ₂ · 2H ₂ O	[Wako] #038-19735	25.0
Phenol Red sodium salt	[Sigma-Aldrich] #114537	適量
Poly(vinyl alcohol)	[Sigma-Aldrich] #341584	10.0

1-2-3. 体外受精 (IVF)

ICR、C57BL/6N、B6D2F1 系統メスマウスの過排卵処理を行った。妊馬血清性腺刺激ホルモン (動物用セロトロピン、あすかアニマルヘルス株式会社) を 7.5 IU、48 h 後にヒト絨毛性ゴナトロピン (hCG、2413402X2053、あすかアニマルヘルス株式会社) を 7.5 IU 腹腔内注射し、過排卵を誘起した。hCG を注射した 16 h 後に卵管を摘出し採卵を行った。

3.5 cm ディッシュ(430588、コーニング)を 3 枚用意しそれぞれ媒精用ディッシュ、精子前培養用ディッシュ、培養用ディッシュとした。媒精用ディッシュは 200 μ l の HTF 培地の媒精用ドロップと 20 μ l の洗浄用ドロップを 10 個作製した。精子前培養ディッシュは 100 μ l の HTF 培地の楕円形ドロップを作製した。培養用ディッシュは CZB 培地を用いた 20 μ l の培養用ドロップを 15 個作製した。いずれのディッシュもドロップ作製後に流動パラフィン (26114-75、ナカライテスク) で完全に覆い、37°C、5%CO₂ の CO₂ インキュベーター (APN-30DR, ASTEC CO) に 6 h 以上入れ平衡化を行なった。

過排卵処理を行ったメスと同系統のオスマウスから精巣上体尾部を摘出しワイプにより洗浄後 26G 注射針 (NN-2613S、テルモ) により穿刺し精液をピンセットで回収し精子前培養ディッシュに移し 1 h 以上キャパシテーションを行なった。その間に過排卵処理を行ったメスマウスから卵管を摘出し媒精用ディッシュのオイル下で卵管膨大部をピンセットで割き卵子卵丘細胞複合体 (COC) を獲得し媒精用ドロップに入れた。

精子の前培養が終了した後、前培養ドロップから 5 μ l を媒精用ドロップに移し媒精を行った。媒精 5 h 後に洗浄用ドロップに移すことで受精卵を洗浄し、培養ドロップに移した。その後 2 つの前核 (2PN) と第 2 極体の放出を確認し正常な受精卵のみを選別しその後の実験に使用した。

1-2-4. 体内受精二細胞期胚の採取

ICR 系統のメスマウスを前述のように過排卵処理し hCG 注射後に ICR 系統のオスマウスとつがいにし同ケージで飼育した。翌朝にメスマウスの膣栓 (プラグ) を確認し、交配を確認した。プラグを確認した翌日に卵管を摘出し、HEPES-CZB 培地を入れ 30G 針を取り付けたシリンジで卵管内を灌流することによって二細胞期胚を回収した。回収した胚は培養ディッシュに移し、実験に使用するまで CO₂ インキュベーター内で培養した。

1-2-5. CO₂ 最適化 (Optimised CO₂-containing; OptC) 培地の準備

CZB 培地を 5 mL プラスチックチューブ (60.9921.530S、ザルスタット) に分注し、密閉して 4°C で保存した。5 ml の CZB 培地を入れたチューブの蓋を緩め、CO₂ インキュベーター内に 0、3、6、12、18、24、48 h 静置し、液中の CO₂ 分圧と pH を測定した (図 1-1 a)。i-stat アナライザー (12B1X00001000020、アボットジャパン合同会社) の校正確認モードで G3 + カートリッジ (03P78-25、アボットジャパン合同会社) に約 100 μ l 加え、培地の CO₂ 分圧と pH を計測した。次に CO₂ インキュベーターを使用せずに OptC 培地を作製するために嫌

気性細菌培養で用いられる炭酸ガス発生剤のアネロパウチ (図 1-1b、A-63、スギヤマゲン株式会社)を用いて作製した。ガスバリアフィルム (AP-1522、ISO)の中に 5 ml の CZB 培地を入れたプラスチックチューブを 3 本、アネロパウチ 1 つと同封し、37°C の恒温槽内に入れたにいれ、クリップでフィルムを閉じた (図 1-1 c)。これにより OptC 培地の作製を試みた。CO₂分圧と pH 測定方法は同様に行い、処理開始から 0、1、3、6、12、18、24、48 h 後に測定を行なった。



図 1-1 OptC 培地の準備

(a) 培養培地を平衡化するために蓋を緩めた状態で CO₂ インキュベーター内に静置した。(b, c) 炭酸ガス発生剤であるアネロパウチを用い Opt C 培地を作製するためにガスバリアフィルムと専用のクリップを使用した。培地の入ったチューブの蓋を緩めた状態でアネロパウチとともにフィルム内に入れ 37°C で保温し培地中の CO₂ 分圧を上昇させた。

1-2-6. 密閉容器での胚培養

IVF 由来の一細胞期胚あるいは体内受精二細胞期胚を OptC 培地で満たしたプラスチックチューブに封入した。蓋をしっかりと閉めパラフィルムで密閉した。37°C に設定した恒温槽 (0040534-000、タイテック) に一細胞期胚は 96 h、二細胞期胚は 72 h 静置し、培養を行った。ネガティブコントロールとして OptC 培地の代わりに未処理の CZB 培地を用い、同様にプラスチックチューブに入れ培養を行った。培養後、チューブ内の培地を 60 mm ディッシュに注ぎ培地中の胚を回収した。胚の質を評価するために培養培地に受精卵を移した。ポジティブコントロールとして受精卵を培養ディッシュに入れ CO₂ インキュベーターの槽内で培養した。

1-2-7. 胚移植

それぞれの培養法から得られた胚盤胞を、膣栓を確認して 2 日後の偽妊娠マウスの子宮に移植した。レシピエントは麻酔薬であるドミトール、ミタゾラム、ブトルファノールの腹腔内注射により麻酔し、手術を行なった。それぞれの子宮角に 5 個から 8 個の胚を移植した。産仔は交配後 18.5 日後に帝王切開により獲得した。

1-2-8. 免疫染色

胚盤胞の免疫蛍光染色を行った。胚盤胞は 1% パラホルムアルデヒドを含む PBS で 1 h 処理し固定した。固定した胚は 1% (w/v) ポリビニルアルコール-PBS (PVA-PBS) で 2 回洗浄した後、0.1% (v/v) TritonX-100 (35501-15、ナカライテスク)-PBS で 4°C で一晩処理した。使用した一次抗体は TE 細胞検出には抗 CDX2 マウスモノクローナル抗体 (1:500、MU392A-UC、BioGenex)、ICM 細胞の検出には抗 NANOG ウサギポリクローナル抗体 (1:500、ab80892、Abcam) である。使用した二次抗体は Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗マウス IgG (1:500、A11001、Molecular Probes)、Cy5 標識ヤギ抗マウス IgG (1:500、ab97077、Abcam)、Alexa 568 標識ヤギ抗ウサギ IgG (1:500、A11004、Molecular Probes) である。

1-2-9. 統計解析

細胞数は tukey 検定で評価した。胚発生率、着床率、産仔率は tukey 検定あるいは χ^2 検定で評価した。いずれの検定も、 $P < 0.05$ のとき、統計的に有意な差があるとみなした。

1-3. 結果

1-3-1. OptC 培地の作製

CZB 培地を入れたプラスチックチューブを 5%CO₂ インキュベーターに入れたところ、処理時間とともに培地の CO₂ 分圧が上昇し、24 h 後には約 4%の平衡状態に達した (図 1-2)。この間に培地中の pH は低下し、最終的な pH は 7.4 となった。これはこれまでのマウス初期胚の培養中の培地と同等な数値³⁹であった。この平衡化された CZB 培地を OptC 培地とし、以降の実験で使用した。

1-3-2. OptC 培地を用いた密閉系での培養

37°C に温めた未処理の CZB 培地あるいは OptC 培地を入れた密閉容器内で IVF 由来の一細胞期胚の培養を CO₂ の供給がない恒温槽内で行った。未処理の培地で培養すると、従来法である CO₂ インキュベーター内のディッシュで培養した対照区と比較して、胚盤胞への発生率は有意に減少した (47.9%、 $P < 0.001$ 、図 1-3、表 1-4)。しかしながら OptC 培地入れた密閉容器内で同様に培養を行ったところ、ほとんどの胚は胚盤胞へと発生し、発生率は対照区と同等であった (97.4% vs. 97.9% $P = 0.771$ 、図 1-3、表 1-4)。さらに OptC 培地を使用した密閉系での培養を近交系である C57BL/6N 系統、あるいは交雑種である B6D2F1 (C57BL/6N x DBA/2)を行ったところ、従来法で培養した対照区と同等の高い発生率での培養が可能であることがわかった (表 1-4)。

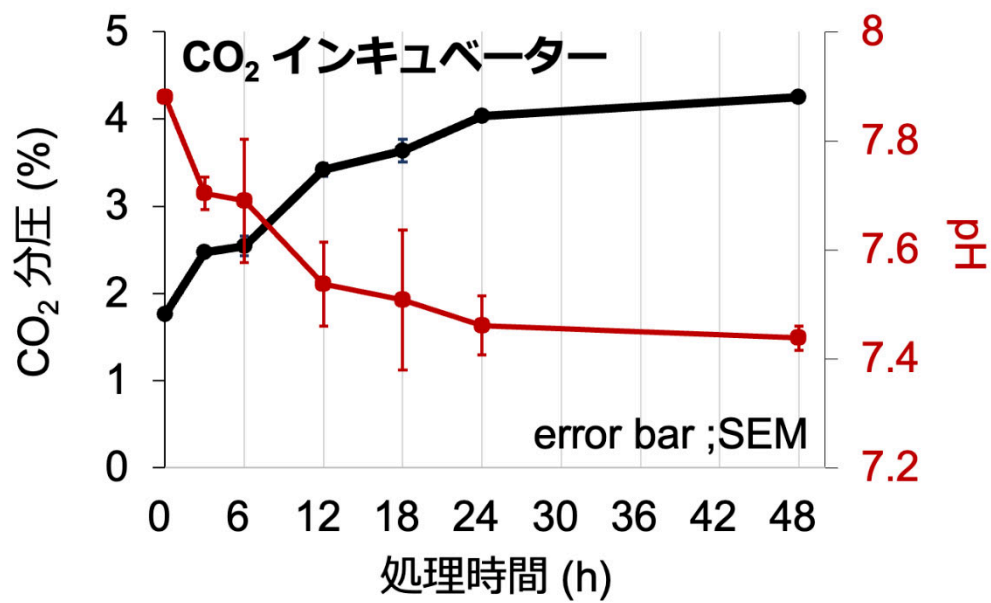


図 1-2 CO₂ インキュベーター中の培地中 CO₂ 分圧の変化

CO₂ インキュベーターを用いて、培地の CO₂ 分圧と pH を 48 h まで測定した。黒線は CO₂ 分圧、赤線は pH を示した。エラーバー; 標準誤差。

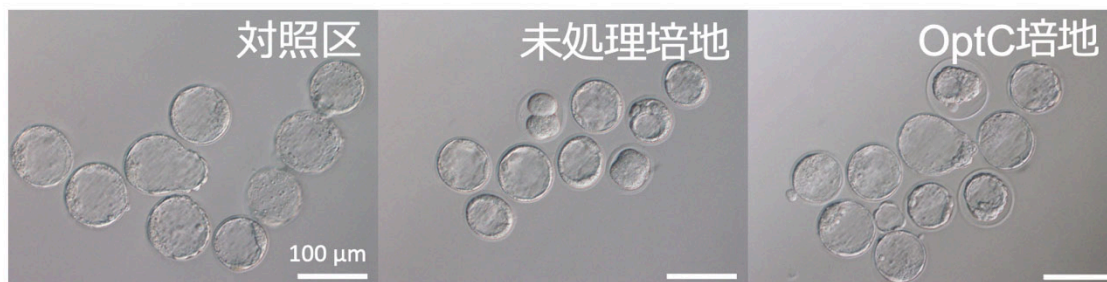


図 1-3 密閉容器内で培養した胚盤胞

従来法による培養 (左)を対照区とした。密閉したチューブ内で未処理培地 (中央)あるいは、OptC 培地 (右)で 96 h 培養を行った。スケールバー; 100 μm。

表 1-4 密閉容器内の受精卵の発生

系統	培養法	封入胚数	断片化 (%)	1細胞期 (%)	2細胞期 (%)	4-8細胞期 (%)	桑実期 (%)	胚盤胞期 (%)
	対照区	141	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (2.1)	0 (0)	138 (97.9) ^a
ICR	未処理培地	121	2 (1.7)	9 (7.4)	24 (17.0)	7 (5.8)	21 (17.4)	58 (47.9) ^b
	OptC 培地	151	0 (0)	0 (0)	1 (0.7)	0 (0)	3 (2.0)	147 (97.4) ^a
B6D2F1	対照区	49	0 (0)	1 (2.0)	0 (0)	0 (0)	1 (2.0)	47 (95.9)
	OptC 培地	55	0 (0)	1 (1.8)	0 (0)	2 (3.6)	0 (0)	52 (94.5)
C57BL/6	対照区	33	2 (6.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (3.3)	30 (90.9)
	OptC 培地	50	4 (8.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (6.0)	43(86.0)

^{a, b} は胚盤胞への発生率の有意差を示す (tukey 検定、 $P < 0.05$)。対照区; 従来法であるミネラルオイルで覆ったディッシュ内での培養。未処理培地; 温めただけの平衡化処理をしていない CZB 培地を用い、密閉容器内で培養を行った。

胚培養前の OptC 培地の CO₂ 分圧と pH は 4.85%、7.40 であったが、96 h の培養後に再び測定したところそれぞれ 2.38%、7.71 と平衡化前の状態に近づいた。OptC 培地のみを 37°C で 96 h 静置した際も同様な結果が得られた (CO₂ 分圧; 4.86% → 2.44%、pH; 7.40 → 7.70)。これらのことからプラスチックチューブは空気の移動を完全に遮断するわけではないが、その環境でも胚を培養することができることが示唆された。

次に本密閉培養系で得られた胚盤胞を評価するために免疫染色と子宮移植を行い比較した。37°C に加温した未処理培地で得られた胚盤胞の細胞数は少なかった (総細胞数; 46.4、 $P < 0.001$ 、ICM; 4.8、TE; 41.2)。しかし、OptC 培地で培養した胚の ICM 細胞数および TE 細胞数は対照区と同等であり (総細胞数; 73.8、 $P = 0.11$ 、ICM; 8.5、TE; 65.0) 正常な培養ができていたことが示唆された (表 1-5、図 1-4a)。ICM/TE 比を全群間で比較すると未処理培地と OptC 培地で培養した胚盤胞は同様であり (0.14 vs 0.13、表 1-5)、コントロールより高い値となった (0.08、表 1-5)。また、ICM 細胞数と TE 細胞数の比率を見ると、対照区では ICM/TE 比が低いのに対し密閉培養を行った 2 区では ICM 細胞数の割合が増えている (表 1-5、図 1-4b)。さらに確率楕円を見ると対照区と OptC 培地は TE 細胞が多いほど ICM 細胞が多いことがわかるが、未処理培地での培養では TE 細胞が多いほど ICM 細胞が少ないことが明らかであり (図 1-4b)、異常な胚盤胞が多いことが明らかである。

最後に子宮への胚移植による産仔への影響を評価した。未処理培地で培養して得られた胚盤胞は産仔を得ることができたが、産仔率は有意に低下した (10.5%、 $P < 0.001$ 、表 1-6)。しかし OptC 培地で培養して得られた胚盤胞では多くの産仔が得られ産仔率も従来法で培養した対照区と有意な差は無かった (34.5% vs 43.5% $P = 0.35$ 、表 1-6、図 1-5a)。また得られた産仔体重や胎盤重量も対照区と同等であった。さらに OptC 培地で培養し得られた産仔同士を交配させることで次世代を得ることも可能であり健康な産仔が得られる事が明らかになった (図 1-5b)。

表 1-5 密閉容器内で培養した胚盤胞の細胞数

培地	解析卵数*	総細胞数 (DAPI)	TE 細胞数 (Cdx2)	ICM 細胞数 (Nanog)	ICM/TE 比 ^A
対照区	41	84.1 ^a ± 5.1	77.1 ^a ± 4.9	6.4 ^b ± 0.5	0.10
未処置培地	19	46.4 ^b ± 4.0	41.2 ^b ± 4.0	4.8 ^b ± 0.7	0.16
OptC 培地	40	73.8 ^a ± 4.3	65.0 ^a ± 4.1	8.5 ^a ± 0.6	0.16

細胞数の分散は標準誤差で示した。

* 解析した胚は表 1-4 の ICR 系統のものから無作為に選択したものを使用した。対照区; 従来法であるミネラルオイルで覆ったディッシュ内での培養。未処理培地; 温めただけの平衡化処理をしていない CZB 培地を用い、密閉容器内で培養。

^{a, b} それぞれの細胞数に有意差がある事を示している (P < 0.05、tukey 検定)。

^A 解析した胚盤胞それぞれの ICM/TE 比の平均

表 1-6 密閉容器内で培養した胚盤胞から得られた産仔

培地	移植胚数* (レシピエント数)	着床数 (%)	産仔数 (%)	産仔体重 (g)	胎盤重量 (g)
対照区	46 (5)	26 (56.5) ^a	20 (43.5) ^a	1.69±0.26	0.14±0.03
未処理培地	38 (4)	11 (28.9) ^b	4 (10.5) ^b	1.99±0.13	0.19±0.04
OptC 培地	58 (6)	42 (72.4) ^a	20 (34.5) ^a	1.71±0.20	0.14±0.04

産仔体重、胎盤重量の分散は標準偏差で示した。

* 解析した胚は表 1-4 の ICR 系統のものから無作為に選択したものをを使用した。対照区; 従来法であるミネラルオイルで覆ったディッシュ内での培養。未処理培地; 温めただけの平衡化処理をしていない CZB 培地を用い、密閉容器内で培養を行った。

^{a-b} 着床数、産仔数に有意差がある事を示している (P < 0.05、tukey 検定)。

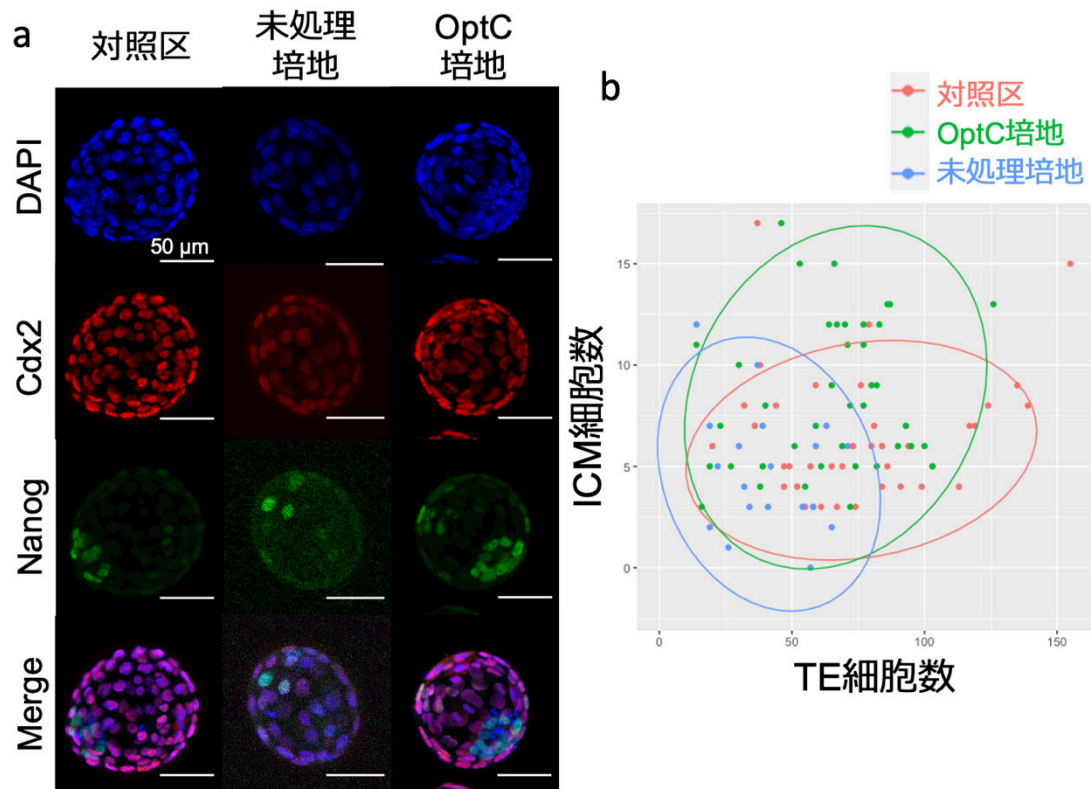


図 1-4 密閉容器内で培養した胚盤胞の解析

(a) 对照区、未処理の CZB 培地 (密閉培養)、および OptC 培地 (密閉培養) で培養した胚盤胞を免疫染色し、内部細胞塊 (ICM) および栄養外胚葉 (TE) の細胞数を測定した。青; DNA (DAPI)、赤; TE 細胞 (Cdx2)、緑; ICM 細胞 (Nanog)。(b) ICM 細胞数と TE 細胞数の各区の確率楕円。赤; 对照区、緑; OptC 培地、青; 未処理培地。

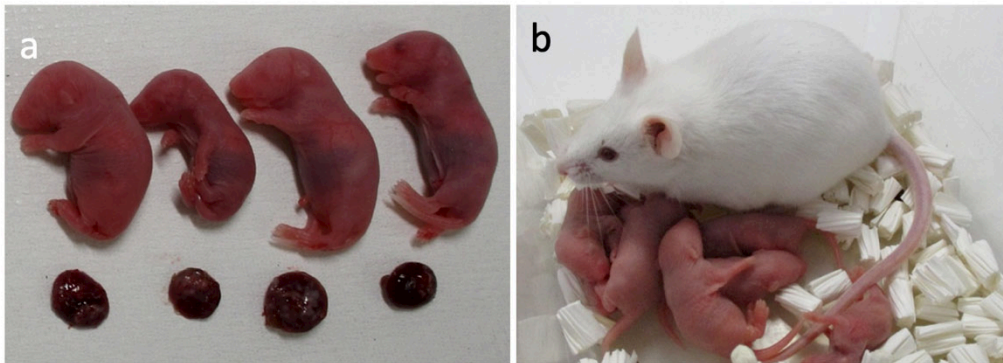


図 1-5 密閉容器内で培養した胚盤胞の解析

(a) OptC 培地を用いて培養した胚から得られた健康な産仔。(b) OptC 培地から得られた産仔は正常に成長し、次世代を得ることができた。

1-3-3 完全に CO₂ インキュベーターを使用しない密閉培養

OptC 培地を作製するために CO₂ インキュベーターを使用していたため、根本的な解決には至っていない。そこで CO₂ インキュベーターを完全に使用せずに培養が行えるようにするため、CO₂ インキュベーターの代わりに嫌気性細菌培養用の CO₂ ガス発生剤であるアネロパウチを用いて OptC 培地が作製可能かを検討した (図 1-6)。アネロパウチを用いた場合、培地中の CO₂ 分圧の上昇速度と pH の下降速度は CO₂ インキュベーターに比べ早かった。処理 24 h 後、培地中の CO₂ 分圧は 12% まで上昇し、pH は 7 まで低下してしまった。従って培地中の CO₂ 分圧が約 5%、pH が約 7.4 となった 3 h で処理したものを OptC 培地として実験に使用した。

また、IVF を行うためにも CO₂ インキュベーターを用いる必要があるため、今回の実験では体内受精の二細胞期胚を用い、アネロパウチで作製した OptC 培地での密閉培養を行った。どちらの OptC 培地であっても正常な胚発生を示しほぼ全ての胚は胚盤胞までの発生し (95.2% vs 97.4%、表 1-7)、その胚盤胞を子宮に胚移植した産仔率も同等であり正常な発生能を確認した (35.2% vs 30.2%、表 1-7)。

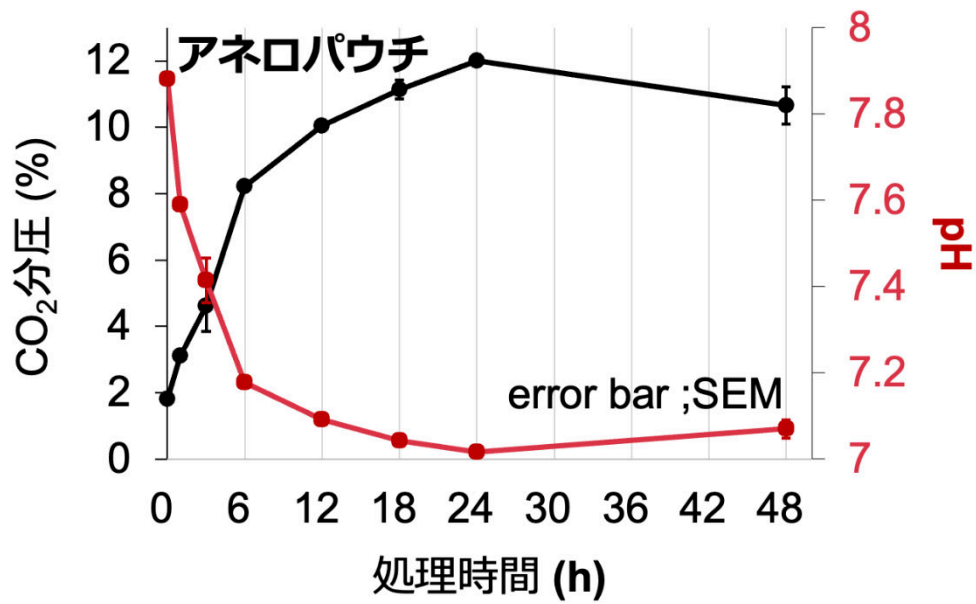


図 1-6 アネロパウチ処理による培地中 CO₂ 分圧の変化

アネロパウチを用いて、培地の CO₂ 分圧と pH を 48 h まで測定した。黒線は CO₂ 分圧、赤線は pH を示した。エラーバー; SEM。

表 1-7 アネロパウチで作製した OptC 培地による密閉系培養による胚発生

OptC 培地の種類	回収 胚数	断片 化胚	2 細 胞期	4-8 細 胞期	桑実胚	胚盤胞	移植胚数 (レシピエント数)	産仔数 (%)
CO ₂ インキュベーター	63	1 (1.6)	2 (3.2)	0 (0)	0 (0)	60 (95.2)	54 (4)	19 (35.2)
アネロパウチ	76	2 (3.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	74 (97.4)	69 (5)	21 (30.4)

それぞれの実験区での発生率に有意な差はなかった ($P > 0.05$ 、 χ^2 検定)。

1-4. 考察

本章では従来の胚培養法より必要な機器やランニングコストを抑えた新規胚培養法の開発に成功した。本培養法を **Optimized CO₂ Pressure and Sealed tube culture method (Ops 培養法)** と命名し、以下の章でも使用した。

従来の培養では大気圧下では上がってしまう培地中の pH を、培養に最適な状態で維持するために 5%CO₂ 下での培養を行っていた。CO₂ の供給がない状態で培養を行うと pH は 8.1 まで上昇してしまい、胚盤胞に発生することができない²⁹。Ops 培養法では培養後でも pH は 7.7 で胚培養が可能な範囲内に抑えることができた^{40,41}。

Ops 培養法は従来法と同等の発生率での培養が可能なシンプルな培養法である。また、得られた胚盤胞の細胞数や産仔率は従来法で得られたものと差はなく得られた産仔も繁殖能力を持つ健康な個体であった。しかし密閉培養では ICM 細胞と TE 細胞の割合が変化し、ICM 細胞の割合が増加した。未処理培地を用いると TE 細胞が少ない時に ICM 細胞が多い負の相関を示しており、異常胚が多いことを指している。Ops 培養法では従来法に比べても ICM 細胞数が増加したうえ TE 細胞数と正の相関があり高い質の胚盤胞が多いことが示されている。

CO₂ インキュベーターフリーはこれまでいくつも開発されてきたが、本培養系がアネロパウチを使用した最初の胚培養系となった。アネロパウチは炭酸ガス要求菌を安価に培養するために一般的に販売されている試薬であり、本章では CO₂ インキュベーターを用いずに OptC 培地を作製するために使用した。アネロパウチを用いた培地の平衡化は本来の使用用途と培地量が異なるため胚培養に最適な CO₂ 分圧を維持することは困難であった。そのためアネロパウチを用いてガスバリアフィルム内で培養ディッシュでの培養を行うことは困難であったが、OptC 培地の作製においては短時間で作製できる利便性と CO₂ インキュベーターを用いないコスト面で優れている。インキュベーターフリーの問題点として発生率と特殊な機器を用いることが挙げられているが、アネロパウチを用いた Ops 培養法は他のどの方法よりも使用機器が少なく高い発生率を維持している。

Ops 培養法の必要要素は OptC 培地と分圧を維持することができる密閉容器と保温機器であり、密閉容器と保温機器は変更可能であると考えられる。本章では密閉容器として研究室で培地の保管に使用しているため胚への毒性がないことが明らかであるプラスチックチューブと安定した温度を供給可能であり遮光が可能な恒温槽を用い、Ops 培養法を行ううえで最も実現性が高い条件で実験を行った。密閉容器としてプラスチックチューブでは必要な培地量が大きく培養系のコストの大部分をしめている。さらにその培地量と素材から培養中の胚を観察することは難しい。保温機器として恒温槽はインキュベーターフリーの利点の一つであるの胚輸送に適しておらず、輸送中の使用は想定されてなく危険なうえ電力供給も必要となってしまう。次章では Ops 培養法の密閉容器と保温機器を変更することでより利便性の高い培養法になるよう試みた。

第2章 Ops 培養法を用いた着床前胚の簡易輸送法の確立

2-1. 序論

遺伝子組み換え個体などの貴重な実験動物の輸送には生体へのストレスや外界への拡散防止の側面から胚の状態で輸送することが一般的であり、胚の輸送には液体窒素を使用した凍結胚での輸送が主流となっている。凍結胚での輸送は保存期間に際限が無く余裕を持った輸送ができるうえに融解後の発生率も高いまま維持される。しかしながら輸送中も液体窒素温度を維持する必要があるため輸送にはドライシッパーと呼ばれる特殊な機器が必要となってしまう。さらには胚の凍結融解は凍結方法によって定められた融解方法を使用する必要があるため輸送の際には送り手と貰い手が共通した凍結融解が可能である必要があり凍結、融解の両方の技術を身につける必要である。そのため胚輸送を目的とした新しい技術が開発されている。

近年では非凍結での輸送により簡易でありコストを削減することに成功している。2020年に Mukunoki らは冷蔵温度で4日間の二細胞期での保存が可能であることを報告している⁴²。体外操作用培地に抗酸化剤の N アセチルシステインを添加することで保存期間の延長に成功し、3日間の国内輸送にも成功している。操作が簡易であり必要な機器も少なく凍結を伴う胚輸送の欠点を克服している。しかし保存期間とともに発生率が低下してしまうことや冷蔵保存に弱いブタなどの動物種では使用できない課題が残っており^{43,44}、使用には留意する必要がある。また、様々な発生ステージでの冷蔵保存が可能であるが、発生ステージや報告するグループにより保存期間や保存方法が異なる⁴⁵⁻⁴⁷。

本研究グループは以前胚培養に最適な温度を維持することができる小型でバッテリーを搭載したウォームボックスを開発し、培養を伴う胚輸送に成功している⁴⁸。胚をマイクロチューブに入れそのチューブを混合ガス (5%CO₂、5%O₂)が入ったプラスチックバッグに入れウォームボックス内で培養を行った。宅配便での輸送が可能であり、チューブから胚を回収するだけで胚を獲得することができる。この培養系では4日間の輸送にもかかわらず高い胚盤胞率と産仔率を維持することができる点が冷蔵輸送より優れている点である。しかしウォームボックスは市販品ではなく普遍性の低い方法である。また、ウォームボックスには胚毒性がありプラスチックバッグの破損などで胚をロストしてしまう可能性もある。

本章では Ops 培養法による胚輸送方法の確立を試みた。Ops 培養法は 37°C に保温することができれば保温機器を自在に選択することができる。そこで動力を必要とせず 37°C を維持できる機器として登山用水筒の使用を試みた。登山用水筒にお湯を入れることで長時間 37°C という調整が困難な温度を維持することが可能であると考えた。さらに市販品である登山用水筒を用いることで再現性やコスト面からこれまでの胚輸送に比べ利用しやすい輸送方法となると考えられる。密閉容器もマイクロチューブに変更し培地量を減らし、コストの削減を試みた。また、もし Ops 培養法が保温機器と密閉容器を変更しても培養することが可能な方法であれば、さらに多くの状況に合わせた胚培養が可能になると示唆すること

ができる。胚と OptC 培地を密閉したチューブをお湯の入った水筒内に入れ、培養が可能かを検討した。さらに実際に胚輸送を行い実用することが可能かを検討した。そしてこれまでの胚輸送で問題であった技術やコスト、発生率の低下を抑えた新規胚輸送法の開発を行った。

2-2. 材料及び方法

マウス、培地、体外受精 (IVF)、体内受精二細胞期胚の採取、CO₂ 最適化 (Optimized CO₂ containing; OptC)培地の準備、胚移植、統計解析は1章と同様に行なった。

2-2-1. 登山用水筒内での胚培養

胚輸送のために本研究では登山用水筒 (FFX-901, Thermos)に 38.5°C のお湯を入れ、培養を試みた。本章では以前の研究で毒性がないことを確認した 500 µl の PCR チューブ⁴⁹を用い Ops 培養法を使用した培養を試みた、水筒内の水温はスーパーサーモクロン温度ロガー (1922T, KN Laboratories)を専用の防水ケース (DS9507, KN Laboratories)に入れ 10 分間隔で 2 日間の測定を行なった。温度測定は独立した 3 回の測定をした。培養実験では IVF 由来の一細胞期胚あるいは二細胞期胚、体内受精由来の二細胞期胚を約 10 個と 500 µL の OptC 培地を PCR チューブに入れた。PCR チューブは、38.5°Cの水を入れた登山用水筒に入れた。その後、登山用水筒内で培養したチューブから胚を回収し、体外での胚盤胞までの発生能を確認し、その胚を偽妊娠マウスに子宮移植することで体内での発生能を解析した (図 2-1)。水筒内の温度測定あるいは培養の間は水筒を室温で静置した状態で行った。また、測定や培養の際には予め 38.5°C のお湯を入れておき、使用時に改めて 38.5°C のお湯を入れ替えることで保温した。

2-2-2. 登山用水筒を用いた胚輸送

30-50 個の IVF 由来の一細胞期胚または、IVF あるいは体内受精由来の二細胞期胚を PCR チューブに移し、上記のように登山用水筒内で培養した。この実験では、研究室間の実際の輸送を模倣するため、多数の胚を使用した。胚を入れた登山用水筒は茨城県つくば市あるいは山梨県甲府市内に持ち運び往復し、次の日に山梨大学発生工学研究センターで胚の回収を行った。回収した胚は 3 日間あるいは 4 日間 CO₂ インキュベーター内で追加培養後、得られた胚盤胞を偽妊娠マウスに子宮移植を行った。

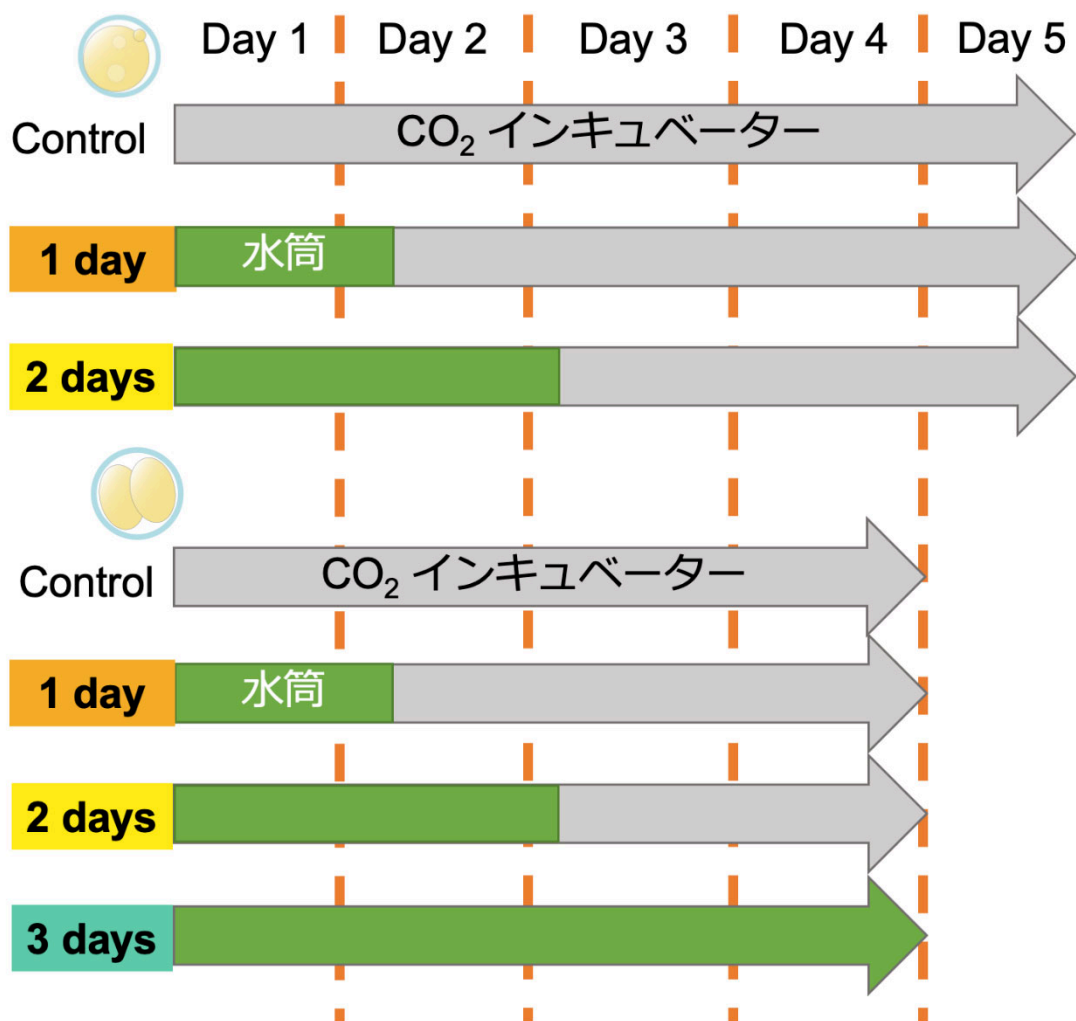


図 2-1 登山用水筒での胚培養モデル

登山用水筒内で3日間までの胚培養を試みた。一細胞期胚は2日間まで、二細胞期胚は3日間まで水筒内で培養しその後の培養は従来法と同様にCO₂インキュベーター内で行った。

2-3. 結果

2-3-1. 登山用水筒内の温度変化

登山用水筒の保温力を検討した。水筒内に 38.5°C に保温したお湯を入れ室温で静置させ温度測定を行った (図 2-2a,b)。水温は 1 日後には約 33°C、2 日後には約 28°C にまで低下してしまった (図 2-2c)。先行研究で 35°C で 5 日間の培養を行うと胚盤胞率が約 30%まで低下してしまうこと³⁵や、25°C で 24h 保存した卵子を用いても胚盤胞へ発生することが報告されており⁵⁰、短期間での培養あるいは極端に低温でなければ胚発生が可能である。そこで、国内の研究室間の輸送期間を模倣するため、登山用水筒で 2 日間の胚培養を試みた。

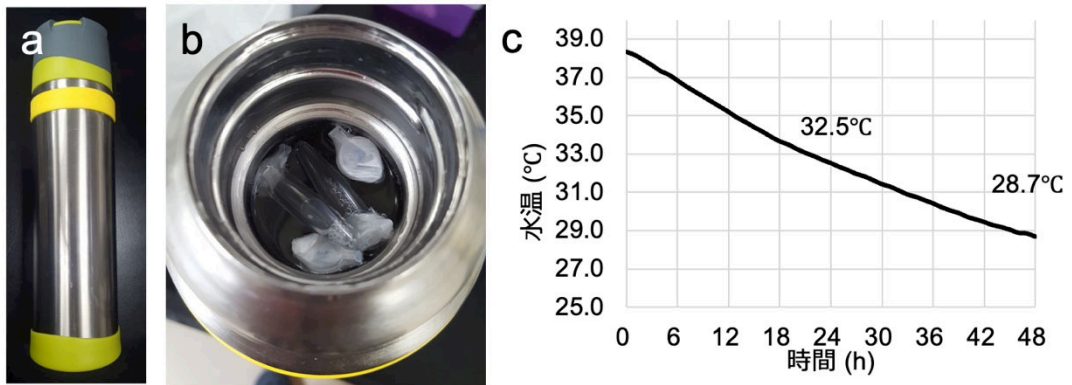


図 2-2 登山用水筒内の温度変化

(a, b) 水筒内に 38.5°C のお湯を入れ、胚を封入した 500 µl チューブを入れることで水筒内での培養を行った。(c) 48 h 間の水筒内の水温の変化。

2-3-2. 登山用水筒での胚培養

この実験では、培地量を軽減するためにパラフィルムで密封した 500 μ L マイクロチューブを用いた。IVF で得られた一細胞期胚は、OptC 培地で 1 日間水筒内培養した後、胚を回収し、その後 CO₂ インキュベーターで 72 h 間の追加培養を行っても発生に遅延は見られなかった (図 2-3、表 2-1)。ほとんどの胚が胚盤胞まで発生し (88.3%、図 2-3)、その胚を子宮に移植した際の産仔率は対照区と同等であった (28.3% vs 30.5%、表 2-2)。しかし、水筒内で 2 日間培養した胚は、発生に遅延が生じ二細胞期で発生が停止した (95.9%)。その後の CO₂ インキュベーターでの追加培養では、桑実胚までの発生を確認できたが、胚盤胞にはほとんど発生しなかった (表 2-1、図 2-3)。さらに水筒内で培養後の桑実胚を移植したところ産仔は 1 匹のみ得られ産仔率は有意に低下した (3.3%、図 2-3)。IVF 由来の二細胞期胚を OptC 培地に入れ水筒内で培養したところ、1 日および 2 日間の水筒内での培養が可能であり、その後 CO₂ インキュベーターで 72 h または 48 h 間の追加培養をすると、ほとんどの胚が胚盤胞に発生した (100% vs 91%、2-1、図 2-3)。また、胚盤胞移植では産仔率に優位な差はなく産仔を得ることができた (31.3% vs 17.5%、 $P > 0.05$ 、図 2-2)。同様に、体内受精由来の二細胞期胚を用いた場合、水筒での培養期間は胚盤胞までの発生率に影響はなく (96.3% vs 93.2%、表 2-1)、水筒で 2 日間培養した場合でも、従来法と同程度の高い産仔率を示した (26.2%、表 2-2)。しかし二細胞期胚であっても 3 日間の培養は不可能であり、多くの胚は桑実胚まで発生したが、その後の胚発生はほとんど不可能であり (5.2%、表 2-1)、産仔は得られなかった (表 2-2)。

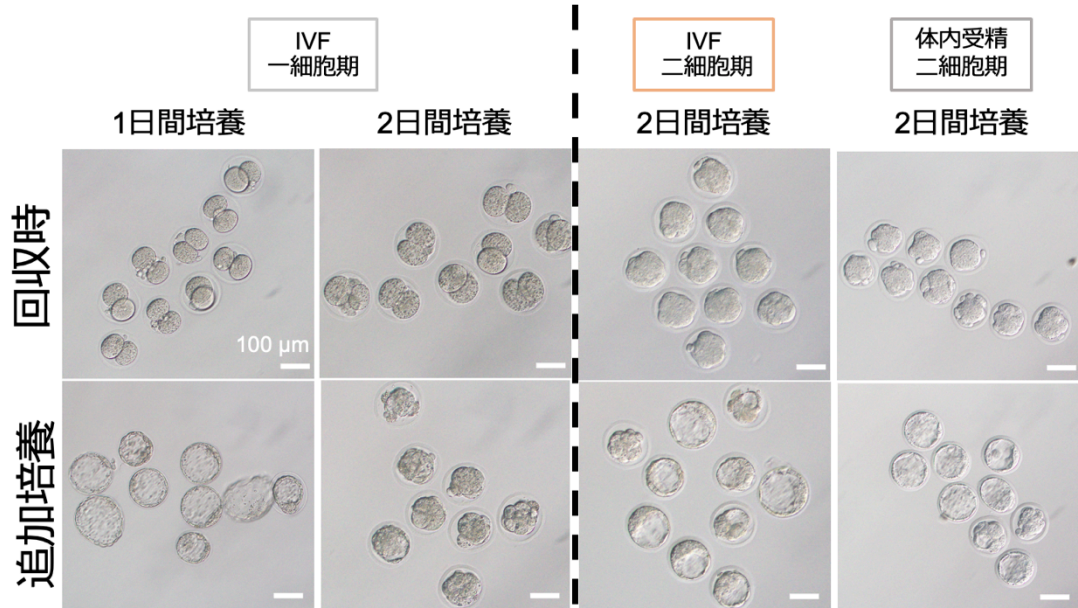


図 2-3 登山用水筒内の胚発生と追加培養

登山用水筒内で培養し回収時の胚の様子 (上)と追加培養後の胚の様子 (下)。スケールバー; 100 μm。

表 2-1 登山用水筒内の胚発生と追加培養

胚の種類	培養法	培養期間	追加培養	供試胚数	断片化	一細胞期	二細胞期	四細胞期	桑実期	胚盤胞
IVF 一細胞期胚	対照区	-	-	111	1 (1.0)	0 (0)	2 (1.8)	0 (0)	2 (1.8)	106 (95.5) ^a
	水筒	1 day		60	0 (0)	2 (3.3)	58 (96.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		3 days			1 (1.7)	2 (3.3)	2 (3.3)	0 (0)	2 (3.3)	53 (88.3) ^b
		2 days		49	0 (0)	2 (4.1)	47 (95.9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		2 days			1 (2.0)	2 (4.1)	9 (18.4)	7 (14.3)	29 (59.2)	1 (2.0) _b
IVF 二細胞期胚	水筒	1 day		67	0 (0)	-	0 (0)	37 (55.2)	30 (44.8)	0 (0)
		2 days			0 (0)	-	0 (0)	0 (0)	0 (0)	67 (100) ^a
		2 days		89	0 (0)	-	1 (1.1)	1 (1.1)	87 (97.8)	0 (0)
		1 days			6 (6.7)	-	1 (1.1)	1 (1.1)	0 (0)	81 (91.0) ^a
体内受精 二細胞期胚	対照区	-		122	0 (0)	-	0 (0)	2 (1.6)	2 (1.6)	118 (96.7) ^A
	水筒	1 day		62	0 (0)	-	0 (0)	23 (37.1)	39 (62.9)	0 (0)
		2 days			1 (1.6)	-	0 (0)	1 (1.6)	0 (0)	60 (96.8) ^A
		2 days		44	0 (0)	-	0 (0)	0 (0)	44 (100)	0 (0)
		1 days			1 (2.3)	-	0 (0)	0 (0)	2 (4.5)	41 (93.2) ^A
3 days	-	116	1 (0.9)	-	1 (0.9)	2 (1.7)	106 (91.4)	6 (5.2) ^B		

^{a, b} IVF 胚において追加培養後の胚盤胞率において有意差があることを示している (tukey 検定、 $P < 0.05$)。

^{A, B} 体内受精胚において追加培養後の胚盤胞率において有意差があることを示している (tukey 検定、 $P < 0.05$)。

表 2-2 登山用水筒内での培養により得られた産仔

胚の種類	培養法	培養期間	移植胚数* (レシピエント)	着床数 (%)	産仔数 (%)	産仔体重 (g)	胎盤重量 (g)
IVF 一細胞期胚	対照区	-	105 (11)	77 (73.3) ^a	32 (30.5) ^a	1.74±0.24	0.16±0.09
	水筒	1 day	53 (6)	40 (75.5) ^a	15 (28.3) ^a	1.72±0.22	0.13±0.06
		2 days	30 (4)	10 (33.3) ^c	1 (3.3) ^b	1.48	0.17
IVF 二細胞期胚	水筒	1 day	67 (6)	43 (64.2) ^{a, b}	21 (31.3) ^a	1.74±0.20	0.12±0.02
		2 days	80 (8)	44 (55.0) ^a	14 (17.5) ^a	1.76±0.32	0.14±0.04
体内受精 二細胞期胚	対照区	-	70 (7)	57 (81.4) ^A	24 (34.3) ^A	1.76±0.16	0.13±0.03
		水筒	1 day	60 (5)	51 (85) ^A	27 (45.0) ^A	1.73±0.21
	水筒	2 days	42 (4)	22 (52.4) ^B	11 (26.2) ^A	1.83±0.16	0.16±0.05
		3 days	112 (8)	7 (6.3) ^B	0 (0) ^B	-	-

* 表 2-1 で得られた胚盤胞あるいは桑実胚を胚移植に使用した。

産仔体重、胎盤重量の分散は標準偏差で示した。

^{a, b} IVF 胚において着床率、産仔率において有意差があることを示している (tukey 検定、 $P < 0.05$)。

^{A, B} 体内受精胚において着床率、産仔率において有意差があることを示している (tukey 検定、 $P < 0.05$)。

2-3-2. 登山用水筒を用いた胚輸送

登山用水筒での保温によって胚培養が可能であることが明らかになったため、登山用水筒の軽さと遮熱性を生かし胚輸送への使用を試みた。二細胞期胚を入れた水筒を山梨県と茨城県の間（約 150km）を往復輸送あるいは山梨県内で輸送し、翌日に胚を回収した（図 2-4a）。12 月から 3 月の間の冬季も本実験を行ったが、登山用水筒単体での輸送に関わらず、内部の水温の変化は室内での変化と同様であった。輸送により水筒内は揺れが生じ壁への衝突などのストレスによる影響が考えられたが、ほぼ全ての IVF 胚および体内受精胚は回収時に次のステージへと発生し（IVF 胚; 98.2%、体内受精胚; 98.6%）、それらの胚を追加培養することで高率で胚盤胞を得ることができた（IVF 胚; 96.3%、体内受精胚; 93.3%、図 2-4b、表 2-3）。さらにこれらの胚を移植した際の産仔率も、輸送を行わないコントロールと同程度であった（IVF 胚; 28.6%、体内受精胚; 33.3%、図 2-4c、表 2-4）。

表 2-3 登山用水筒内による胚輸送の培養結果

胚の種類	培養期間	追加培養	供試胚数	断片化 (%)	一細胞期 (%)	二細胞期 (%)	四細胞期 (%)	桑実期 (%)	胚盤胞期 (%)
IVF 一細胞期胚	1 day		109	0 (0)	2 (1.8)	107 (98.2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
		3 days		1 (1.0)	2 (1.8)	0 (0)	0 (0)	1 (1.0)	105 (96.3)
体内受精 二細胞期胚	1 day		210	2 (1.0)	-	1 (0.5)	130 (61.9)	77 (36.7)	0 (0)
		2 days		6 (2.9)	-	0 (0)	5 (2.4)	3 (1.4)	196 (93.3)

表 2-4 登山用水筒内による胚輸送から得られた産仔

胚の種類	培養期間	移植胚数* (レシピエント)	着床数 (%)	産仔数 (%)	産仔体重 (g)	胎盤重量 (g)
IVF 一細胞期胚	1 day	91 (7)	75 (82.4)	26 (28.6)	1.79±0.21	0.15±0.04
体内受精 二細胞期胚	1 day	99 (7)	82 (82.8)	33 (33.3)	1.67±0.20	0.11±0.03

* 解析した胚は表 2-3 の胚盤胞から無作為に選択したものを使用した。

産仔体重、胎盤重量の分散は標準偏差で示した。

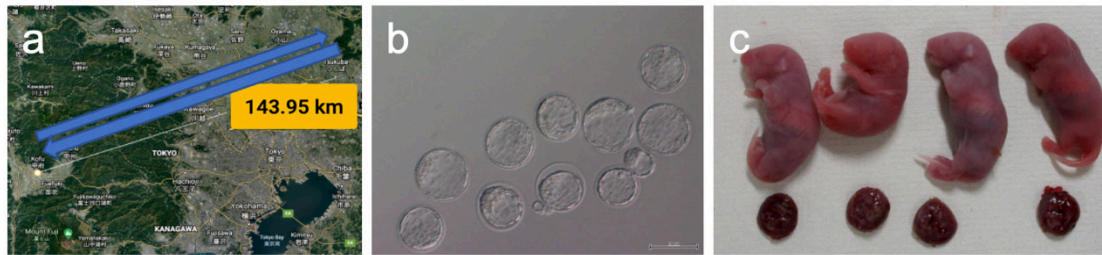


図 2-4 登山用水筒による胚輸送

(a) 登山用水筒で胚輸送が可能かを検討するため茨城県つくば市への胚輸送を行った⁵¹。(b, c) 輸送後の胚の多くは追加培養により胚盤胞まで発生を示し、その胚を移植することで健康な産仔が得られた。

2-4. 考察

本章ではこれまでの胚輸送方法と比較しても技術が必要なく、低コストな新規胚輸送法の開発に成功できた。輸送可能な期間は 2 日間と短いが市販品のみで再現することが可能なおうえ、CO₂ インキュベーターでの培養と差がない高い発生率での輸送が可能である。

本輸送方法では登山用水筒を用いることで非常に簡易な輸送を可能にした。培養に最適である 37°C は体外環境で維持することが困難であり、これまでの培養では動力を必要としていた。それにより輸送を伴う培養のためには特殊な機器が必要であり輸送は可能であったが実用性が低かった^{48,52}。水筒での温度維持では胚盤胞期までの培養が不可能であったが、二細胞期からであれば 2 日間の培養により桑実胚までの発生が可能であり(表 2-1)、マウスでは産仔率が高いとされる卵管への胚移植が可能である^{53,54}。つまり水筒内では培養期間は 2 日間のみであるが、輸送を伴う培養においては必要十分な培養期間であると考えている。

登山用水筒内で 2 日間培養した二細胞期胚は、そのほとんどが胚盤胞まで発生した。登山用水筒の水温は徐々に低下したが、この緩慢な温度低下により低温ストレスの軽減につながったと考えている。常温での輸送コストは宅配便による冷蔵輸送よりも安価であり、国内輸送であれば一般的に 2 日あれば可能であり、冷蔵輸送や凍結胚の輸送とは異なるメリットがある。マウス胚は物理的な振動によって発生に悪影響を与えることが示されている⁵⁵が、登山用水筒は水で満たされており、密閉されたチューブ内の胚への衝撃を吸収した可能性があり、登山用水筒による輸送は培養可能な温度の提供だけでなく、輸送中に発生する振動などの物理的ストレスからも胚を保護することがわかった。また、輸送は最低気温が-3°C の日に行ったこともあるが、水温には影響がなく胚発生も正常であり、培養温度が重要な培養系であるが外気温は発生に影響しない。そのため、本実験での輸送では水筒を持ち運ぶことで輸送を行ったが、宅配による輸送も十分に可能であると考えられる。

登山用水筒を用いた培養では一細胞期胚は 1 日しか培養できないが、二細胞期胚は 2 日間の培養が可能だった。一細胞期胚と二細胞期胚の発生能が培養環境によって異なる影響を受けることは報告されている⁵⁶⁻⁵⁹。登山用水筒による培養結果より発生ステージとともに胚は低温ストレス耐性が増すことがわかった。これは冷蔵保存において二細胞期胚では 4 日間が最長⁴²であるのに対し、胚盤胞期では 6 日間保存が可能⁴⁷であることとも相違がない。これらのことから胚の低温ストレス耐性は発生ステージの進行と比例していることが示唆された。

本研究で開発した新規胚輸送法は共同研究において非常に有効的な方法になると考えている。遺伝子組み換え動物の作出のためには CRISPR/Cas9 のマイクロインジェクションや ES 細胞注入によるキメラ胚作出が使用されることが多く、技術を持ったマウスファシリティーでなければ作出することができない。遺伝子組み換え動物を作出することが困難な研究施設ではマウスファシリティーからの胚輸送により入手することになるが、簡易かつ高い発生を維持した状態での受け渡しが望ましい。本法は登山用水筒の輸送で胚輸送が可能

であり、チューブからの胚を回収するだけで受け渡しは完了する。既に他の研究室への胚輸送にも成功しており、遺伝子組み換えを行った近交系マウスからも産仔が得られることもわかっている⁶⁰。本研究室がある発生工学研究センターはマイクロマニピュレーターを複数台所有しており、遺伝子組み換え動物の作出に長けているため、本胚輸送法を使用することで多くの共同研究に貢献することができると考えている。

第3章 Ops 培養法を用いたマウス受精卵の新規ライブセルイメージング技術の開発

3-1. 序論

ライブセルイメージングは胚の解析に非常に有用な技術であるが、コストと技術には課題があり胚培養を行う研究者の全てが解析可能な技術ではない。通常ライブセルイメージングには、胚へのダメージを考慮し光の強度^{14,61}、撮影時間の間隔、コンタミネーションへの配慮など様々な要素を調整する技術が必要である。使用機器の改良によりこれらの調整は自動化および簡素化されたが、必要な機器は技術革新とともにコストを上昇させている。また一細胞期胚から胚盤胞期までの観察には約1週間かかり、1回の実験で長時間機器を占有することになる。この間、実験者は培養中の室温や胚の位置に注意を払う必要があるだけでなく、週に1回しか実験ができないため、複数の異なる胚や培養条件を比較する実験のために多くの時間を必要とする。そのためライブセルイメージング機器を使用して詳細な胚の分析を頻繁に実施することができるのは、胚培養を行うクリニックや大規模な研究機関のみである。したがって、発展途上国を含む多くの研究室では、これらの実験を行うことができない。

そこで1章で開発した Ops 培養を使用したライブセルイメージング技術を開発することでこれらの課題の解決を試みた。これまでの培養で用いた密閉容器はプラスチックチューブやPCRチューブを使用しており、培地量が多く胚を見つけることが困難な点や容器内部の視認性が低かった点から培養中の胚の観察は不可能であった。そこで透明度が高くガス透過が少ないガラスに着目し培地量が少ない容器としてガラスキャピラリーが密閉容器として最適と考えた。ガラスキャピラリーはガスバーナーにより容易に加工することができ、両端を熱することで密閉することができる。またガラスキャピラリーを用いた胚培養研究は古くから行われておりガラスキャピラリーを卵管にみたくて使用しIVFや培養を行った報告^{62,63}や、培養中の培地量の検討のためにガラスキャピラリーを使用した報告⁶⁴もあり、胚への毒性がないことが明らかである。本研究ではガラスキャピラリーを密閉容器として使用し、中に封入した胚の観察と培養を試みる。

またライブセルイメージングの実施を想定し保温機器として顕微鏡下で培養する必要があるため顕微鏡用のサーモプレート上での培養を検討した。サーモプレート上で胚培養を行った研究もすでに報告があり、培養ディッシュと脱酸素剤をプラスチックバッグの中に封入しサーモプレート上で培養することでCO₂インキュベーター内での培養と同等のクオリティでの培養に成功している⁶⁵。しかし培養中の撮影では像がぼやけてしまううえ、培養中は遮光のためにアルミホイルで覆い隠す必要があった。また、プラスチックバッグで覆っているため蛍光観察も不可能であると考えられる。Ops 培養法であれば密閉容器の透明度が高ければプラスチックバックは不要であり観察が可能であるため鮮明な像で観察が可能であると考えられる。

本章では密閉容器としてガラスキャピラリー、保温機器としてサーモプレートを使用した Ops 培養法により簡易で低コストな新規ライブセルイメージング技術の開発を試みた。まず胚の密閉方法の検討を行い、市販のガラスキャピラリーから本法に最適なものを選択した。次にサーモプレートでの保温で培養が可能かを検討し、撮影を伴うライブセルイメージングの実施を試み従来機器と比較を行った。また、蛍光観察を伴うイメージングも同方法で可能であることを示した。本研究で開発したライブセルイメージング技術は簡便かつ低コストにより胚を用いる研究の効率化に貢献することができる解析方法であることを実証した。

3-2. 材料及び方法

マウス、培地、体外受精 (IVF)、CO₂最適化 (Optimized CO₂ containing; OptC)培地の準備、胚移植は1章と同様に行なった。

3-2-1. ガラスキャピラリー内での胚培養

今回の実験では市販されている6種類のガラスキャピラリーを使用した (A; 9600222、アズワン、B; 9600299、アズワン、C; 05-760-0、エルマ、D; 1-000-1000、Drummond Scientific Company、E; 2-000-050、Drummond Scientific Company、F; BF150-75-10、SUTTER INSTRUMENT、表 3-1)。これらのガラスキャピラリーを50 mm ディッシュ内に入る大きさにするためアンプルカッターを用い約45 mmに切断した。ディッシュは60 mm ディッシュ (430589、CORNING)と50 mm ディッシュ (353655、CORNING)を使用した。OptC培地をマウスピペット用のグリップを取り付けた1 ml シリンジにより吸引し、マウスピペットにより8-15個のIVF由来一細胞期胚を中央の培地の層に入れた。ガラスキャピラリーの両端をガスバーナーで熱しガラスを捻り培地と胚を密閉した。これらの胚は37°Cに設定した恒温槽あるいは38°Cに設定したサーモプレート上で加温し培養した。サーモプレートでの培養では直置きあるいはディッシュに水またはオイルを入れその中で培養する3区で行った。この実験は室温が25°Cあるいは20°Cで安定した実験室で行った。対照区は恒温槽内でキャピラリーを用い培養したものを使用した。培養後はガラスキャピラリーをペーパーで丁寧に拭き取り手を傷つけないようにアンプルカッターでガラスキャピラリーの両端を切断し胚を回収した。回収した胚は胚移植まで培養ディッシュに移しCO₂インキュベーター内で培養を行った。

表 3-1 使用したガラスキャピラリーの書類

	内径 (mm)	ガラスの厚み (mm)	培地量 (μL)	加工
A	1.89	0.31	14.0	-
B	1.39	0.28	7.6	-
C	1.20	0.20	5.7	-
D	1.05	0.20	4.3	-
E	0.93	0.22	3.4	-
F	0.75	0.38	2.2	-

3-2-2. Glass Capillary Time-lapse observation (GCT)法によるタイムラプス撮影

実体顕微鏡 (SZX16、オリンパス)を撮影時間のみ点灯させるため、スイッチボットプラグ (SP90、SwitchBot)を接続し時間によって電源の切り替えを行なった。また顕微鏡用のカメラ (EL310、wraymer)と専用アプリ (microstudio あるいは Spectoman、wraymer)を使用しタイムラプス撮影を行なった。リモートワークを想定してクラウドの Dropbox に保存した。その後、IVF 由来一細胞期胚を入れたガラスキャピラリーを 38°C のサーモプレート上でオイルを入れたディッシュ内に入れ、顕微鏡に暗幕をかけた。一細胞期から拡張胚盤胞の間を 30 分間隔で撮影した。また、顕微鏡のライトは撮影の間の 1 分間のみ点灯するように設定した。対照区として CellVoyager™ CV1000 (YOKOGAWA)を用いて明視野のみのタイムラプス撮影を行なった。培養した胚は回収し、胚盤胞のみを子宮に移植した。

3-2-3. mRNA の準備

染色体の観察には Histone H2B に mCherry を付加した融合遺伝子 (Histone H2B-mCherry)を使用した。これらの融合遺伝子は mRNA 合成用プラスミド pcDNA3.1 polyA^{66,67} のマルチクローニングサイト中に挿入した。直鎖化したプラスミド (pcDNA3.1-polyA83)をテンプレートに用いた。直鎖化には XhoI (Histone H2B-mCherry)の制限酵素を使用した。受精卵において融合タンパクを効率的に翻訳させるために mRNA の 5'末端に Ribo m7G Cap Analog (Promega)を用いてキャップを付加した。テンプレートゲノムが受精卵に混入することを防ぐために、RQ-1 RNase-free DNase I (Promega)を *in vitro* 合成した mRNA の反応液に加えた。合成した mRNA はフェノール-クロロホルムで処理し、タンパク質成分を除去した。合成した mRNA は使用するまで-80°C で保存した。

3-2-4. 受精卵への mRNA のマイクロインジェクション

蛍光ライブセルイメージングを行うために、Histone 蛍光タグを標識した卵母細胞を使用した。Histone H2B-mCherry mRNA は使用前にヌクレアーゼフリー水 (AM9937、Thermo Fischer Scientific)で 50 ng/μL に希釈し、マイクロマニピュレーション用チャンバー上に 0.5 μl のドロップとして乗せた。ヒアルロニダーゼを希釈した HEPES-CZB の 100 μl のドロップ内に採卵した COC を入れ裸化し MII卵子を獲得した。その卵子を同チャンバー上の HEPES-CZB 培地に移し、倒立顕微鏡とマイクロマニピュレーターを用いて行った。透明帯と細胞膜はピエゾドライブ (PRIME Tech)で貫通させた。マイクロインジェクションの 10 分後、卵母細胞を洗浄し、CZB 培地中で培養した。mRNA を注入した卵母細胞は、タンパク質を産生する時間を確保するため、注入後少なくとも 2 h の間 5%CO₂、37°C の CO₂ インキュベーター内に静置した。

3-2-5. 卵子細胞質内精子注入法 (ICSI)

IVF と同様に採精を行いドロップから 1-2 μl 取り出しインジェクションチャンバー内の

12%PVP/HEPES-CZB ドロップ内に加えよく攪拌した。そのドロップ内でマイクロマニピュレーターを用い ピエゾパルスによって精子尾部を切断し頭部のみを回収した。mRNA をインジェクション後に生存した卵子をインジェクションチャンバー内の HEPES-CZB ドロップ内に入れ精子頭部を卵細胞質内に注入した。10 分後に生存していた胚は、培養ディッシュに移し CZB 培地で 37°C、5%CO₂ で培養しこれらの胚を蛍光ライブセルイメージングに用いた。

3-2-6. GTC 法による蛍光ライブセルイメージング

GCT 法を使用した蛍光観察を行った。水銀灯ハウジング (U-RFL-T、オリンパス)と倒立顕微鏡用のサーモプレート (Tip-110RH26、Tokai Hit)を装着した倒立顕微鏡 (IX-71、オリンパス)を用いた。明視野光と蛍光用レーザーはスイッチボットボット (W0202200-GH、SwitchBot)を用い時間制御した。Histone H2B-mCherry を過剰発現させた卵子を ICSI してすぐにこれらの胚を従来機器である CV1000 あるいはガラスキャピラリーに入れ GCT 法によりライブセルイメージングを行った。撮影は赤色フィルター24 h 行い撮影は 30 分間隔で行った。GCT 法では明視野像のホワイトバランスを調整し、蛍光写真と重ね合わせ動画を作成した。明視野と蛍光は 5 分間ずらして撮影した。蛍光レーザーの照射は 3 秒程度とし、胚へのレーザー照射の影響を減らした。

3-2-7. 統計解析

胚の発生速度、胎児と胎盤の重量は t 検定あるいは tukey 検定で、胚の発生率、着床率、産仔率は χ^2 検定あるいは tukey 検定で評価した。いずれの検定も、 $P < 0.05$ のとき、統計的に有意な差があるとみなした。

3-3. 結果

3-3-1. ガラスキャピラリー内の胚の観察方法

ガラスキャピラリーに胚を封入してタイムラプス観察するために最適な方法を検討した。ガラスキャピラリーに OptC 培地を入れ (図 3-1a) IVF 由来の一細胞期胚をマウスピペットで挿入した (図 3-1b)。ガラスキャピラリーの両端をガスバーナーで密閉する際 (図 3-1c)、端付近が熱されてしまった。さらに胚の位置にばらつきが出てしまったためガラスキャピラリー内に 2 つの空気の層を入れた。空気の層の間に胚を入れることで胚が集まり中心によるため熱を回避することもできた (図 3-1d)。

次にガラスキャピラリー内の胚を実体顕微鏡あるいは倒立顕微鏡で観察した。ステージにガラスキャピラリーを直置きした内部の胚を観察するとどちらの顕微鏡でも胚の像はぼやけてしまった (図 3-1e 左)。胚を鮮明に観察するためにガラスキャピラリーを水あるいはオイルの入ったディッシュに入れた。これによりガラスとその周囲の屈折率を近づけることでどちらの顕微鏡を使用した際でも鮮明に胚を観察することができた (図 3-1e 中央; 水中、右; オイル中)。これらの結果よりガラスキャピラリーが Ops 培養法での胚観察が可能な密閉容器であることを示すことができた。

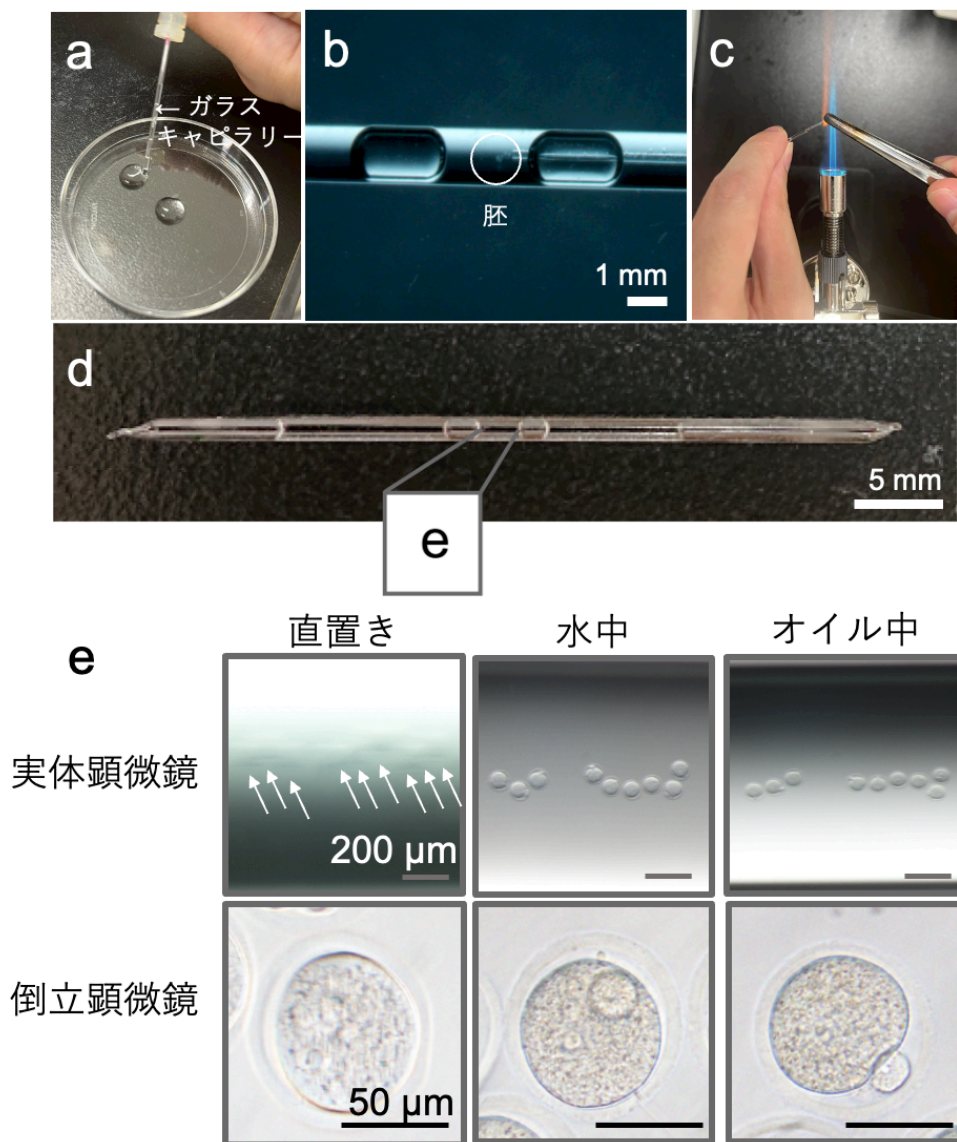


図 3-1 ガラスキャピラリーを用いた胚の観察

(a) ガラスキャピラリーに胚を封入するため、OptC 培地をシリンジでガラスキャピラリー内に吸い上げ、空気層を2つ入れた。(b) マウスピペットを用いて胚を空気層の間に挿入した。(c) 胚を入れたキャピラリーの両端をバーナーで閉じて密閉した。胚の入ったガラスキャピラリーを(d)に示す。(e) 胚を観察するために、実体顕微鏡と倒立顕微鏡を用いて観察した。しかし、直置きでガラスキャピラリー内の胚を観察すると、像がぼやけてしまった(左)。この問題に対処するため、ガラスキャピラリーを水中(中央)あるいはオイル中(右)に入れ観察した。スケールバー; (b) 1 mm、(d) 5 mm、(e) 200 μm (実体顕微鏡)、50 μm (倒立顕微鏡)。

3-3-2. 培養に最適なガラスキャピラリーの検討

胚の培養と観察に最適なガラスキャピラリーを決定するために内径の異なる市販のガラスキャピラリー6種を検討した (図 3-2a)。IVF 由来一細胞期胚のキャピラリー内での胚盤胞までの発生率および視認性を確認した。CO₂ インキュベーター内で培養ディッシュを用い培養したものを対照区とし胚を入れたガラスキャピラリーを 37°C に設定した恒温槽で 96 h 培養したものと比較した。胚盤胞までの発生率はそれぞれのガラスキャピラリーで培養したものと対照区で有意差はなかった (ガラスキャピラリー; 83.1-97.6%、対照区; 92.7%、 $P > 0.05$ 、表 3-2)。しかしガラスキャピラリーの種類によりハンドリングや胚の見え方に違いがあった。太いガラスキャピラリーでは胚に焦点を合わせるのが難しくハンドリング面でもバーナーで両端を密閉するのが困難であった (図 3-2b)。一方細いガラスキャピラリーでは胚が一行に長く並ぶため全ての胚を観察するためには低倍率にする必要があった (図 3-2c)。これらの結果から発生率が高く複数の胚を同時に観察することができるガラスキャピラリーD が最適とし以降の実験に使用した (図 3-2d)。

表 3-2 恒温槽内を用いたガラスキャピラリー内で培養した胚の発生率

内径 (mm)	封入胚数	観察胚数	それぞれのステージへの発生(%)			
			二細胞期	四細胞期	桑実期	胚盤胞期
対照区	41	41	41 (100)	41 (100)	40 (97.6)	38 (92.7)
A: 1.89	45	41	41 (100)	40 (97.6)	40 (97.6)	40 (97.6)
B: 1.39	59	59	51 (86.4)	49 (83.1)	49 (83.1)	49 (83.1)
C: 1.2	39	39	39 (100)	39 (100)	38 (97.4)	34 (87.2)
D: 1.05	86	82	81 (98.8)	81 (98.8)	80 (97.6)	79 (96.3)
E: 0.93	30	30	30 (100)	30 (100)	30 (100)	27 (90)
F: 0.75	48	46	45 (97.8)	40 (87)	40 (87)	40 (87)

それぞれの実験区間に有意な差はなかった (tukey 検定; $p > 0.05$)。

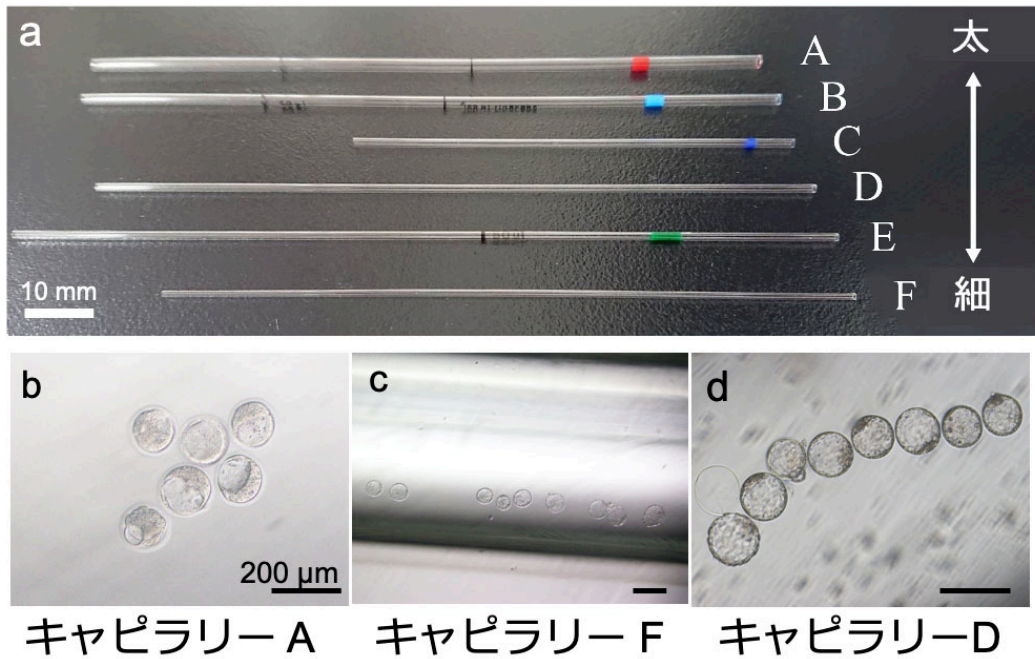


図 3-2 最適なガラスキャピラリーの決定と胚の観察

(a) 培養と観察に最適なガラスキャピラリーを決定するため、6種類の市販ガラスキャピラリーを比較した。スケールバー; 10 mm (b-d) 96 h 培養後のガラスキャピラリー内で発生した胚盤胞。スケールバー; 200μm。

3-3-3. サーモプレートは胚の正常な胚発生に十分な温度を与える

ガラスキャピラリーで観察しながら胚を培養するために、顕微鏡用のサーモプレートを置いて加温し培養を試みた。観察を想定するため、サーモプレート上に直置きあるいは 60 mm ディッシュに水またはオイルを入れその中で培養する 3 区で行った (図 3-3a)。対照区は恒温槽内でガラスキャピラリーを用い培養したものを使用した。サーモプレート上に直置きしたガラスキャピラリー内の胚は対照区に比べ低い胚盤胞率を示した (直置き; 77.8%、恒温槽; 94.7%、表 3-3)。水あるいはオイルに入れ培養した胚は直置きしたものに比べても有意に低い発生率を示した (水; 53.8%、オイル; 37.1%、表 3-3)。観察と培養を平行するために水中、オイル中でも安定した培養を行うために上下 2 枚のサーモプレートの間で加温するなど異なる保温方法を検討したが、安定した発生率での培養ができなかった (表 3-4)。

表 3-3 サーマプレートを用いたガラスキャピラリー内で培養した胚の発生率

加温方法	設定温度 (°C)	観察胚数	それぞれのステージへの発生 (%)				Min-Max
			二細胞期	四細胞期	桑実期	胚盤胞期	
恒温槽	37	57	57 (100)	55 (96.5)	55 (96.5)	54 (94.7) ^a	(78-100)
直置き	37	63	63 (100)	63 (100)	63 (100)	49 (77.8) ^b	(29-100)
サーモプレート 水中	37	39	29 (74.4)	27 (69.2)	23 (59)	21 (53.8) ^c	(33-80)
オイル中	37	97	61 (62.9)	55 (56.7)	39 (40.2)	36 (37.1) ^c	(0-96)

^{a, b, c} それぞれの文字は胚盤胞率において有意差があることを示している (tukey 検定、 $P < 0.05$)。

表 3-4 空調なしでのサーモプレート上での培養

	設定温度 (°C)	供試胚数	二細胞期	四細胞期	M/B	詳細
	37	9	9	9	9	
恒温槽 or CV1000	37	9	9	9	9	
	37	8	8	8	8	
	37	10	10	10	10	
	37	8	8	8	8	
	37	10	10	10	10	
		37(上)+37(下)	18 (N=2)	18	0	0
	37+37	9	9	0	0	サーモプレートを上下に挟む
	35.5+37.5	9	9	9	8	サーモプレートを上下に挟む
サーモ プレート	37+37	9	9	0	0	サーモプレートを上下に挟む
	37+37	8	8	8	8	空調+サーモプレートを上下に挟む
	37+37	30 (N=2)	28	2	0	空調+サーモプレートを上下に挟む

M/B; 桑実胚 or 胚盤胞

サーモプレート上での保温を安定化するために2つの変更を行なった。1つ目はディッシュの変更を行なった。60 mm ディッシュでは底に縁がありサーモプレートの熱が効率的に伝わっていなかったと考えられる (図 3-3b)。そこで顕微授精用の 50 mm ディッシュに変更した。このディッシュであれば底に縁がないためサーモプレートの熱を水やオイルに直接に伝えられると考えた (図 3-3b)。2つ目は空調を使用して室温が安定しないこともあり培養が安定しなかったことを考え、実験室を人の出入りが少ない狭い部屋で実験を行うことで室温の安定化を試みた。培養方法を変更したところ胚盤胞および産仔への発生率がより高く安定した (図 3-3c,d、表 3-5、表 3-6)。さらに室温が 20°C の部屋でも同様に実験を行ったところ検討した胚のほぼ全てが胚盤胞期までの発生を示した (表 3-5)。これらの結果から室温の安定と 50 mm ディッシュを使用することでサーモプレート上での保温が胚培養に十分な保温ができることを明らかになった。

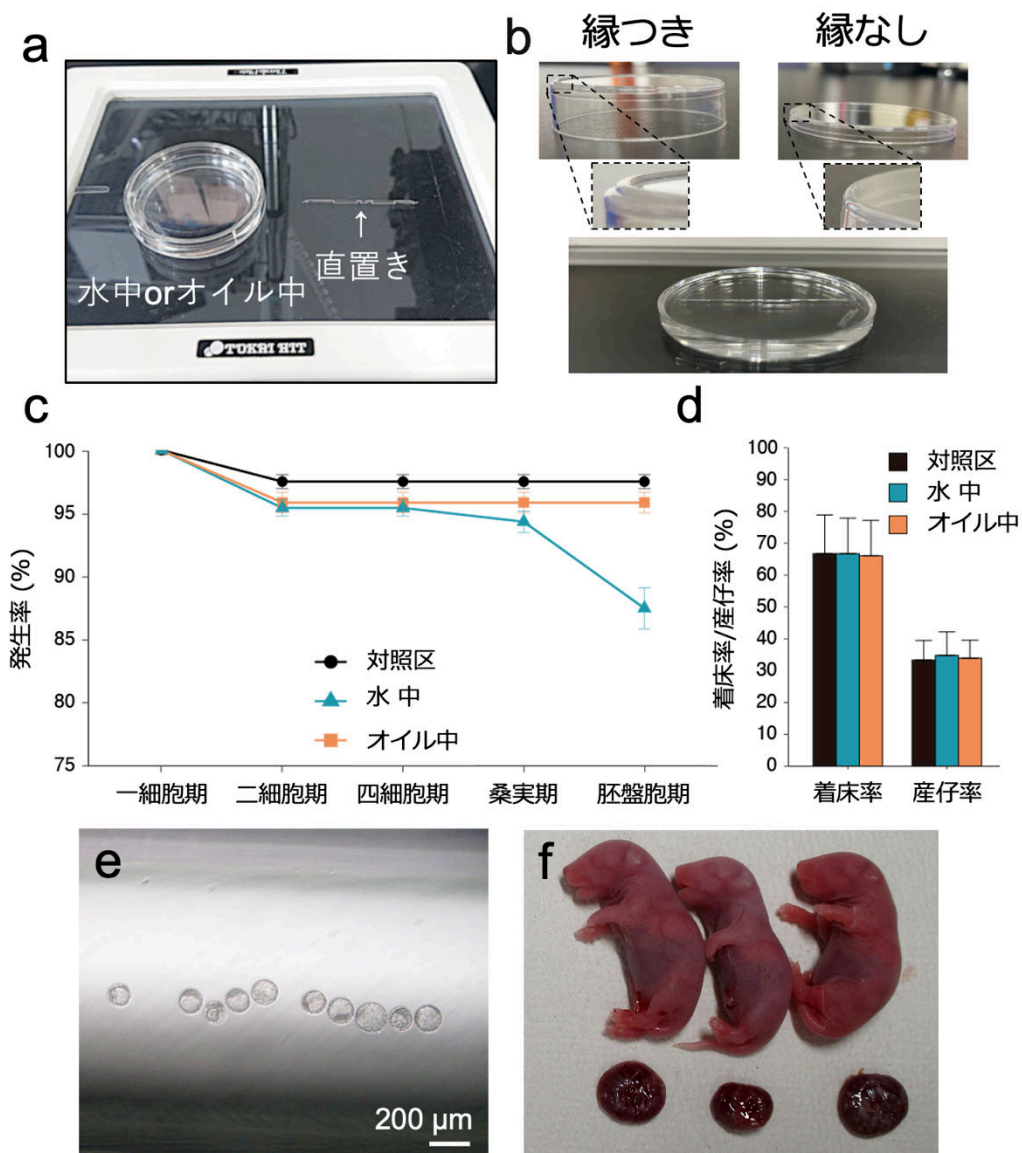


図 3-3 サーマプレートで保温したガラスキャピラリー内の胚発生

(a) サーマプレートを使ってガラスキャピラリーを保温した。プレートに直に置いたもの(右)とディッシュに水あるいはオイルを張ったもの(左)の3区で比較した。(b) まず、ガラスキャピラリーを保温するために縁のあるディッシュを使用した(左)。しかし、このディッシュでは内側に温度が効率よく伝わらなかった。そこで、代わりに縁のないディッシュを使用した(右と下)。(c) サーマプレート上で培養したガラスキャピラリー内の胚の発生率。(d) 着床率と産仔率。(c, d) 黒; 対照区(恒温槽)、青; 水中、オレンジ; オイル中、エラーバー; SEM。本方法で培養し発生した胚盤胞(e)と産仔(f)。スケールバー; 200 μ m。

表 3-5 空調とディッシュの変更後のサーモプレート上での培養

加温方法	RT (°C)	ST (°C)	観察 胚数	それぞれのステージへの発生 (%)			
				二細胞期	四細胞期	桑実期	胚盤胞期
恒温槽 (対照区)	-	37	79	77 (97.5)	77 (97.5)	77 (97.5)	77 (97.5)
サーモプレート 水中	25	38	87	83 (95.4)	83 (95.4)	82 (94.3)	76 (87.4)*
50 mm ディッシュ オイル中	25	38	72	69 (95.8)	69 (95.8)	69 (95.8)	69 (95.8)
ディッシュ オイル中	20	38	38	38 (100)	38 (100)	38 (100)	38 (100)

RT; Room Temperature (室温)、ST; Set Temperature (設定温度)。

* それぞれのステージへの発生率において有意差があることを示している (tukey 検定、 $P < 0.05$)。

表 3-6 サーマプレートでの保温培養により得られた産仔

加温方法	移植胚数 ^a (レシピエント)	着床数 (%)	産仔数 (%)	産仔体重 (g)	胎盤重量 (g)
恒温槽 (対照区)	45 (5)	30 (66.7)	15 (33.3)	1.81±0.19	0.13±0.02
水中	69 (8)	46 (66.7)	24 (34.8)	1.83±0.21	0.14±0.03
サーモプレート オイル中 (RT; 25°C)	59 (6)	36 (66.1)	20 (33.9)	1.72±0.28	0.15±0.03

^a 移植に使用した胚は表 3-4 で示した胚盤胞の一部を使用した。

産仔体重と胎盤重量の分散は標準偏差で示した。

それぞれの実験区において着床率および産仔率に有意な差はなかった (tukey 検定、 $P > 0.05$)。

それぞれの実験区において産仔体重および胎盤重量において有意な差はなかった (tukey 検定、 $P > 0.05$)。

3-3-4. 新規タイムラプス撮影技術の開発

サーモプレート上での保温でも胚発生を確認することができたため、本法を使用したライブセルイメージング技術の開発を試みた (図 3-4)。実体顕微鏡に顕微鏡用カメラ、サーモプレート、タイマー付きコンセントを接続し、観察と培養の併用を試みた。これらの機器は受精卵研究を行う多くの研究室に既にあるもの、あるいは限られた予算で購入できるもので構成している。本実験ではこれらの機器を使用することで撮影中のみ明視野光が点灯し顕微鏡下で培養中の胚をタイムラプス撮影することができる低コストで簡易な新規技術開発が可能と考えた。また個人用や共用のパソコンを使用することができる点から、リアルタイムで胚の状態を確認できるうえにリモートワークを簡易に導入できる技術とするために撮影した画像はクラウド上に保存した。この新規タイムラプス撮影技術を **Glass Capillary Time-lapse observation (GCT)**法とした。GCT 法を用いて一細胞期胚が胚盤胞まで発生する 5 日間 30 分毎の撮影を行った。撮影中は暗幕で顕微鏡を覆うことで遮光し胚へのダメージを減らすとともに保温を行った。さらにタイマー付きコンセントを用いライトの照射は撮影中の 1 分間のみに抑えた。GCT 法による発生率と発生速度、さらに得られた胚盤胞を子宮に移植した際の産仔率を従来機器である CV1000 と比較し実用可能かを検討した。

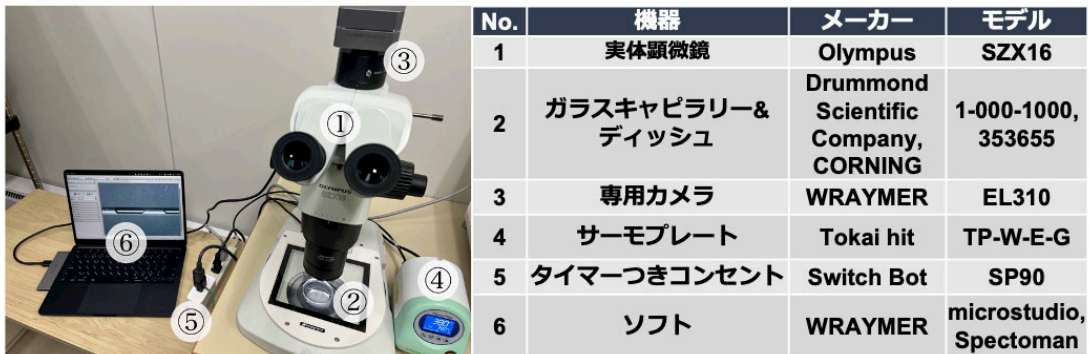


図 3-4 ガラスキャピラリー内培養によるタイムラプス技術の開発

ガラスキャピラリーを用いた新規タイムラプス撮影技術に使用した装置 (左)とその構成 (右)。

GCT法で得られた画像は画角内に2本のガラスキャピラリーを並べても卵割を評価し形態を観察するのに十分な明瞭さを確認した(図3-5a, 動画1)。GCT法ではCV1000に比べ胚盤胞率がわずかではあるが有意に低下した(81.5% vs 95.8%, $P < 0.01$, 表3-7, 図3-5b)。胚盤胞がHatchingする際にCV1000では胚が動いてしまうことが多かったがGCT法では画角内に多くの胚を捉えることができた(図3-5c, 動画2)。それぞれの方法で撮影した画像から拡張胚盤胞期までの発生速度を比較した。GCT法ではIVFから二細胞期まで15:34要したのに対しCV1000では17:49と有意差はなかったが早かった(図3-5d)。また、胚盤胞期まで発生はGCT法では82:37要したが、CV1000では84:26と同様に有意差はなかったが2hほど発生が早くなった(図3-5d)。また胚ごとの発生速度のばらつきも従来機器と同程度に収まり発生速度の解析に使用できることがわかった。さらに産仔率も従来機器と同程度であり、培養のクオリティにおいて異常がないことが明らかになった(34.5% vs 38.5% 表3-8, 図3-5b, e)。

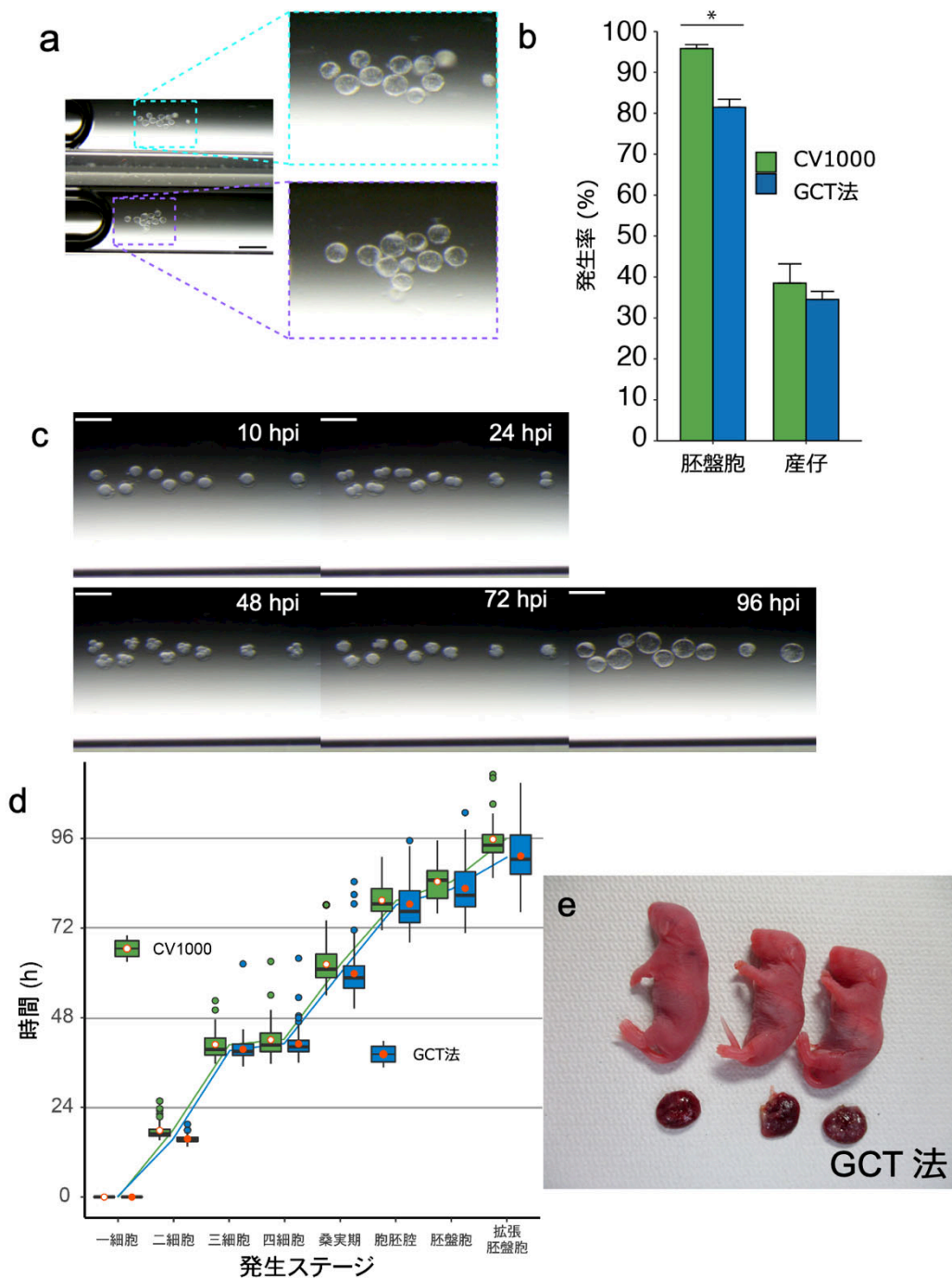


図 3-5 GCT 法によるライブセルイメージング解析

(a) IVF96h 後に GCT 法で撮影した写真。本方法では、画質を維持したまま 2 本のガラスキャピラリーを同じ画角で撮影することができる。スケールバー; 500 μm 。(b) 胚盤胞または産仔までの本法の培養結果。緑; CV1000、青; GCT 法。*は有意差を示す ($p < 0.05$)、エラーバー; SEM。(c) GCT 法により得られたタイムラプス画像。hpi; hours post insemination。

スケールバー; 200 μm 。(d) CV1000 での培養と GCT 法における胚の発生速度の比較。赤点; 平均値、各群の色点; 外れ値。(e) GCT 法で培養後に胚移植により獲得した産仔。

表 3-7 新規ライブセルイメージング技術による胚発生

	封入胚数	それぞれのステージへの発生(%)			
		二細胞期	四細胞期	桑実期	胚盤胞期
対照区 (CV1000)	143	143 (100)	143 (100)	142 (99.3)	137 (95.8)
GCT 法	168	168 (100)	164 (97.6)	152 (90.5)	137 (81.5)*

* 胚盤胞率において有意差があることを示している (χ^2 検定、 $P < 0.05$)。

表 3-8 新規ライブセルイメージング技術で得られた産仔への発生

	移植胚数 (レシピエント) ^a	着床数(%)	産仔数 (%)	産仔体重 (g)	胎盤重量 (g)
対照区 (CV1000)	65 (7)	46 (70.8)	25 (38.5)	1.70 ± 0.32	0.15 ± 0.03
GCT 法	58 (7)	49 (84.5)	20 (34.5)	1.83 ± 0.23	0.16 ± 0.05

^a 移植に使用した胚は表 3-7 で示した胚盤胞の一部を使用した。

産仔体重と胎盤重量の分散は標準偏差で示した。

対照区と実験区において着床率および産仔率に有意な差はなかった (χ^2 検定、 $P > 0.05$)。

対照区と実験区において産仔体重および胎盤重量において有意な差はなかった (t 検定、 $P > 0.05$)。

3-3-5. GCT 法による蛍光ライブセルイメージング

最後に GCT 法を用いた傾向ライブセルイメージングを試みた。今回の実験では蛍光倒立顕微鏡を用いスイッチとシャッターの切り替えは SwitchBot ボットを使用し明視野光は撮影中の 1 分間のみ、蛍光レーザーは約 3 秒間のみ照射するように設定した (図 3-6a, b)。卵子に Histone H2B-mCherry mRNA をマイクロインジェクションし ICSI により受精卵を作出しガラスキャピラリー内に密閉し 24 h 培養を行った。本法で培養した胚はレーザー照射をしたのに関わらず発生速度に影響を与えることなく前核を形成し二細胞期まで発生した (88.1% vs 81.6%、表 3-9)。撮影した画像を確認すると、前核や核の融合など正確に観察することができるほど鮮明であった (図 3-6c, 動画 3)。さらには核分裂時に生じた微小核も確認することができた。またどちらの方法でも ICSI 後の発生速度は従来機器と有意な差はなく発生速度の解析にも使用できることが明らかになった (表 3-9)。これらの結果から GCT 法でも蛍光ライブセルイメージングが可能であることを確認した。

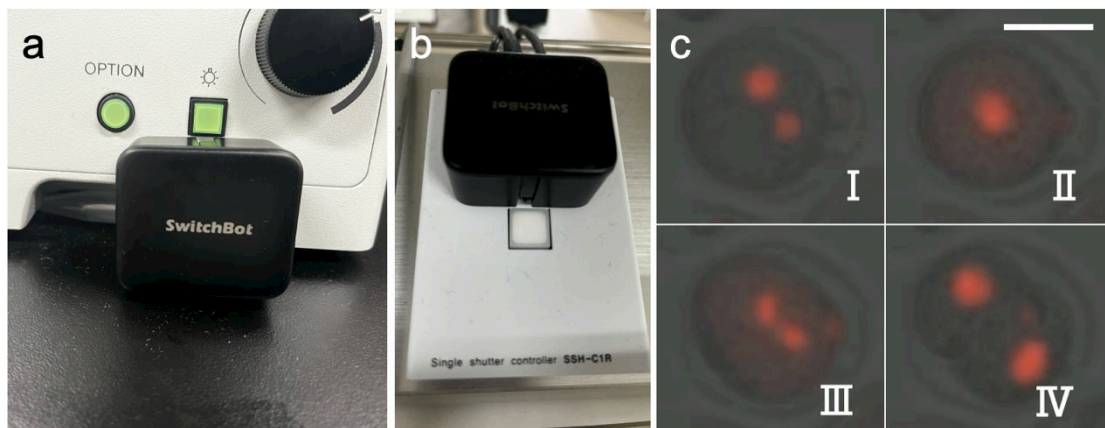


図 3-6 GCT 法での蛍光観察

(a, b)倒立蛍光顕微鏡の明暗を制御するために SwitchBot ボットを使用し明視野のボタンと蛍光制御のためのシャッターを時間で切り替えるよう設定した。(c) GCT 法で蛍光撮影した写真。胚は 2PN (I)、核融合 (II)、核分裂 (III)、二細胞期 (IV) で撮影した。赤色蛍光は Histone H2B-mCherry を示す。スケールバー; 50 μm 。

表 3-9 GCT 法での蛍光観察による胚発生

	封入胚数	蛍光陽性	それぞれのステージへの発生(%)		発生時間 ^a (hh:mm)	
			2PN	二細胞期	核融合	二細胞期
CV1000	46	45	38 (82.6)	31 (81.6)	17:05	17:56
GCT 法	49	46	42 (91.3)	37 (88.1)	17:20	18:52

2PN 二細胞期への発生率 (χ^2 検定; $p > 0.05$) および発生時間 (t 検定; $p > 0.05$) について、CV1000 と GCT 法の間には有意差は認められなかった。

^a ICSI をした時間を 0:00 とし、それぞれのステージに到達するまでの時間。

3-4. 考察

本章では、従来のライブセルイメージング機器と同等の発生率と発生速度で可能な簡易で効率的に解析が可能なライブセルイメージング法である GCT 法の開発に成功した。GCT 法は、哺乳類胚を研究している研究機関にすでに使用されている機器を多く使用するため、研究資金が限られている研究室でも利用しやすい解析方法である。さらに、GCT 法は共通機器や個人の一般的なパソコンで使用でき、得られた画像はクラウド上に保存できるため、リモートワークや実験の効率化が可能である。

従来のライブセルイメージング法では、胚の位置の調整、コンタミネーションへの配慮、ピントの調節など技術が必要だった。従来の装置で Hatching までのタイムラプス撮影を行う場合、ディッシュに窪みを作り胚が動かないように慎重に配置する必要があった。しかし、GCT 法では、胚を密閉されたガラスキャピラリーに入れるため、汚染物質の侵入を防ぐことができるだけでなく胚はキャピラリーの底に集まるため、撮影が容易である。倍率を下げることで、2 本以上のガラスキャピラリーを観察することができ、対照実験に使用することができる (図 3-5a)。この実験中に震度 3 の地震が発生し (2021 年 12 月 3 日、甲府) 従来法ではほぼすべての胚が視野から外れてしまったが、GCT 法では振動除去板がなくても影響がなく、ライブセルイメージングを継続することができた。

従来の装置で一細胞期から胚盤胞までのタイムラプス観察を行えば、より高解像度での解析を行うことが可能であるが、複数台あることは珍しく週に 1 回程度しか行うことができない。対照的に、GCT 法は解像度が低い代わりに実体顕微鏡があればどの研究室でも簡単に実施することができる。ガラスキャピラリー内の胚の位置はずれにくく、ガラスキャピラリーを元の位置に戻すことで撮影中でも顕微鏡を操作することも可能である。また、複数の実体顕微鏡があればそれぞれの実体顕微鏡を用い同時にタイムラプスが可能になり、低コスト・短期間で多くのデータを集めることができる。そのため GCT 法は複数の条件下で比較を行う場合や予備実験に有効である。例えば、マウスの系統や年齢の違いや試薬処理による発生スピードの簡単な評価などでは GCT 法による解析であれば短期間で多くのデータ収集が可能であり有効であると考えている。特に、ICR 系統のような非近交系マウスは購入が容易であるが、胚の発生速度には個体差が大きい (図 3-5d)。そのような場合、統計解析のためには多数の胚を測定する必要があり本方法は有用であると考えている。ライブセルイメージングから得られる情報は、胚の発生や質の重要な評価となるため効率的かつ低コストでデータを収集できることは、基礎発生学研究にとって非常に有益であり貢献が可能である。

GCT 法では室温の維持が重要である。空調がない部屋で培養した胚は、二細胞期で発生が停止することがある (表 3-4)。室温が不安定な場合、サーモプレートの温度センサーが加熱を制御するため、ガラスキャピラリーと胚の温度が急激かつ頻繁に変化し、胚が耐えられない可能性がある。2 章でも温度維持の重要性が示唆されていた通り一細胞期のストレスはその後の胚発生にも深刻な影響を及ぼし、温度変化が一時的あるいは短期間であったとし

でも、発生停止に至ることもある。本研究は、ガラスキャピラリー内の胚をサーモプレート上で培養しても、安定した室温条件下で胚を培養すれば胚発生が可能であることを示している。

ガラスキャピラリー内での胚培養はライブセルイメージング技術だけでなく初期胚の解析のためにも有用であると考えている。ガラスキャピラリーでの培養では細い口径のもので 2.2 μ l の培地中で正常な胚発生が可能であった。先行研究では少量の培地では発生率が低下してしまうことが報告されていたが^{68,69}、Ops 培養法による培養環境の維持により培養が可能になったと考えている。これにより細胞外小胞や細胞外 DNA を高濃度で収集できる可能性がある。

本性で開発に成功した GCT 法は、ライブセルイメージングの経験がない、あるいは哺乳類胚解析の研究者でなくても簡単に実施することができるだろう。GCT 法は、最小限のセットアップで実施可能であり容易に実施できる。GCT 法をより使いやすくし、機能性を高めるための改良にも取り組んでいきたい。

総括

哺乳類初期胚の体外培養は全能性や胚発生制御などまだ未知であり発生学に重要なメカニズムを研究するために重要な技術である。マウスをはじめヒトを含む多くの動物種で長い年月をかけて培地や培養法の成功したことで現在では普遍的な技術となり、本来胎内で起きる解析困難な現象が次々と明らかになってきている。現在の胚培養研究は卵子や精子の体外形成や胚盤胞期以降の培養に着目されている。しかし着床前胚の培養も遺伝子組み換え動物の作出などの発生工学技術においては需要が減ることはなくその技術向上は受精卵という個体を形成することができる一つの細胞群の生命現象を明らかにするために重要な枠組みとなっている。さらに発生技術は生物分野横断の技術であるため多くの施設で導入可能にすることは生物学の発展にも一役を担うと考えている。

第1章ではCO₂インキュベーターの使用が培養コストの向上に起因していると考え、インキュベーターフリーの新規胚培養技術であるOps培養法の開発を行った。試みた培養系は非常にシンプルなものでも普段の胚培養でも行われている培地のCO₂インキュベーター内での平衡化を長時間行い、上昇したCO₂分圧の低下を防ぐ密閉容器内で培養するものである。密閉容器として本研究室や一般的に使用されるプラスチックチューブを用いており、従来の胚培養研究において追加で購入可能なものだけでインキュベーターフリーの培養が可能である。これまでのインキュベーターフリーでも課題であった特殊な機器や調整が必要なガスの使用は本法では必要なく、非常に簡単に実施することが可能である。さらにもう一つの課題であった発生率の低下はOps培養法では認められず、シンプルな方法ながらインキュベーターフリーで最も実用的であると考えている。CO₂インキュベーターでの培養では停電が起きることによって温度、湿度、気相が室内に近づいてしまう。停電中はドアを開けることでその変化は急激に進むため槽内の胚のレスキューは基本的に不可能である。停電は日本では珍しいがアメリカの一部の州や発展途上国では頻度が高いため、貴重な胚の培養にはOps培養法を使用することで停電が起きても胚を取り出し2章でも使用した登山用水筒に移すことで胚へのダメージを軽減し、応急処置を行うことも可能であると考えている。

これまでの胚培養はオイルで覆った培養ディッシュをCO₂インキュベーター内で培養する開放系での培養であり胚のハンドリングや観察を行ううえで利便性が高い方法である。初期胚は単離している巨大な浮遊細胞であり顕微鏡を用い個々の胚ごとに処理や観察ができるため、開放系での培養ではその細胞特性を生かすことができる。密閉系での培養が使用されていないのはこれまでの方法の実施が困難であったことが大きく、Ops培養法の導入しやすさはこれらの胚培養系の使い分けを可能にし、培養法の多様性を提供することができた。

第2章では新規胚輸送法を開発し2日間の培養を伴う輸送を可能にした。本法も胚を扱うほとんど全ての施設で実施可能であると考えており、胚輸送のハードルを大きく下げることができたと考えている。第1章と第2章の成果は2021年にPLOS ONE誌に研究論文と

して発表した。本輸送はすでに実践されており、胚輸送を行った際に受け取り手からは「この方法ならうちでもできる」という声もあり本法が広まりつつある。しかし2日間の輸送では国内での輸送が限界であり、余裕のある輸送を行うためには保温期間の延長が必要である。今回は水筒内に水を入れたが、比熱を上げるために水筒内に保温性のポリマーを入れることでさらに長期間の培養が可能になる可能性がある。4日間の培養まで可能になれば動力が完全に不要な培養系となり、培養コストを現在の Ops 培養法よりも大幅に削減することも可能になる。また、2日目には 28°C まで低下したにも関わらず追加の培養により従来法の培養と有意な差がなく産仔が得られており、冷蔵保存と同じメカニズムによるものであったと考えている。Ops 培養法では胚にとって最適な環境を維持しており、冷蔵保存に OptC 培地は有用であると考えている。すでに桑実胚では OptC 培地による 48 h の保存を行っており⁴⁵、卵管への胚移植に使用できる二細胞期胚でも有用であると考えている。また、OptC 培地への抗酸化剤の処理によりさらに長期の冷蔵保存が可能であると考えている。第2章では登山用水筒による保温で培養を伴う輸送を行なったが、登山用水筒に冷水を入れ保冷による冷蔵保存による長期の胚輸送も可能ではないかと考えている。

第3章ではさらに Ops 培養法の応用を行い、最も低コストで行うことができるライブセルイメージング技術の開発に成功し、第3章の成果は2023年に Scientific Reports 誌に研究論文として発表した。ライブセルイメージングを行うためには高額な機器を必要としていたため、一部の研究機関では実施が困難であり、複数台所持している機関は多くないため解析可能な頻度を上げることは困難である。胚の発生スピードや蛍光観察によるタンパク質の局在解析は胚発生メカニズム解明のために重要な解析であるがその実施難度から解析が行われていない研究も多くある。胚の固定や観察をタイムコースで行い評価することで多くの胚や手間が必要な解析を行う研究も多く、本法は低コストかつ高効率での実施可能でありより詳細な解析を実施できる。これにより発生生物学に大きく貢献できると考えている。さらに今回は胚発生の観察を行ったが、その他の細胞腫でのライブセルイメージングも可能であると考えている。ガラスキャピラリー内での培養は他の細胞腫でも行われているため⁷⁰、GCT法を用いライブセルイメージングも可能になると考えている。また、GCT法はより詳細な解析が可能なようアップデートの必要がある。共焦点顕微鏡による詳細な解析や、簡便な2色以上の蛍光観察などより従来法と差がない方法にすることで普遍的な方法としていきたい。

胚を密閉かつ観察できる容器は限られており、ガラスキャピラリーに至るために多くの容器の条件検討を行った。開放系でも使用されるディッシュに OptC 培地を満たし蓋との隙間をシリコンテープで密閉を行ったがテープの毒性により培養ができなかった。培養フラスコでも同様に培養を行ったところ胚盤胞までの発生を確認できたが胚を固定することが難しく、観察は非常に困難だった。本研究で最も困難であったのは密閉容器の捜索であり、基本的には培養に用いられていないガラスキャピラリーで Ops 培養法を使用できたことが GCT 法開発のブレイクスルーとなった。

本研究は全体としてコストの削減だけでなく可能な限り研究機関にすでにあるもので実施できることに拘り開発を行った。追加購入が必要であれば実際に実施できるまでにラグが生じてしまう。すでにある物で行われていれば 1 回試してみたいと考えてからすぐに実施してもらいやすいと考えた。実際に開発した 3 つの培養法はそれぞれすぐに研究室内外で使用することができた。研究論文として投稿したことで世界中の研究者に使用されることを期待している。

Ops 培養法は輸送中やサーモプレート上での培養が可能であり、保温さえ可能であれば培養する場所を選ばない。さらに OptC 培地は密閉培養が可能な状態で作製後に 1 ヶ月間冷凍保存可能であることもわかっているため冷凍した OptC 培地を持ち運ぶことも可能である。また、家畜や野生動物の胚の採取にも実用的な培養方法になると考えている。畜産場やフィールドワークでの採卵では胚培養に十分な施設があることは珍しい。採卵後の卵子や胚は時間と共に質が劣化し発生が停止してしまう。また衛生環境も整っていない場合も多く、密閉系での培養はコンタミネーションへの対応も可能である。

どんな場所でも培養を行うことが可能である根拠として本培養系は宇宙空間での培養にも使用することができた。宇宙空間での培養では操作者が宇宙飛行士であり胚操作経験がなく、無重力であるため開放系での培養では胚をロストしてしまう可能性がある。そのため宇宙空間での培養のためには新規培養デバイスが必要であり、本研究室では ETC (Embryo Thawing and Culturing unit) というデバイスを開発した⁷¹。ETC は-80°C での保存するために機密性の高い素材を使用しているためデバイス内の胚は密閉系での培養が必要となる。ETC 内での培養では OptC 培地を使用する必要があり、Ops 培養法により培養が可能になる。2021 年には国際宇宙ステーションに ETC を輸送し宇宙空間での胚培養に世界で初めて成功した⁷²。宇宙空間での胚の初期発生の解析は人類の宇宙進出のために必要な知見であるため、Ops 培養法のさらなる応用により、さらに多くの解析に使用可能な技術開発を進める必要がある。

論文内容の要旨

論文題目

マウス着床前胚の新規密閉培養法の開発とライブセルイメージング技術への応用

氏名 菊池康之

哺乳類は胎生であるため体内で受精卵の発生が進み、着床することで胎児と胎盤へ発育し、現在の技術では多くの動物種で体外受精、着床前の段階である胚盤胞までの体外培養を行うことができる。ほとんどの動物種での体外培養では胎内環境を模倣するために CO₂ インキュベーターを用いて気相を CO₂ ; 5%、温度 ; 37°C に整えている。培養培地のドロップを作製しオイルで覆ったディッシュを CO₂ インキュベーター内に入れる開放系での培養によりヒトや実験動物の胚培養を高効率に培養することができ、ライブセルイメージングなどの解析も可能となってきた。しかしながら CO₂ 供給によるランニングコストや機器自体の価格が高いこと、培養中に故障や停電が起きてしまうことで培養中の胚発生が停止してしまうことが懸念される。

第1章では CO₂ インキュベーターを用いない低コストな培養系の開発を試みた。培地中の CO₂ 分圧を CO₂ インキュベーターで平衡化させることで培養に最適な CO₂ 分圧に調整し、密閉容器内で胚とともに封入することで CO₂ の供給が不要な胚培養法の開発が可能と考えた。マウス着床前胚の培養で使用される CZB 培地の CO₂ インキュベーター内の CO₂ 分圧を測定したところ、24 h の静置により平衡化することを確認した。この培地を CO₂ 最適化培地 (Optimized CO₂ Containing; OptC 培地) とした。OptC 培地と ICR 系統体外受精一細胞期胚をプラスチックチューブ内に入れ密閉し 37°C の恒温槽内で培養を行ったところ CO₂ インキュベーターを用いた従来法での胚盤胞率と有意差がない高効率での培養が可能であることが確認できた (97.4% vs 97.9%)。また、その胚盤胞を解析するために細胞数や胚移植した際の産仔率を確認したところ、それぞれ従来法での培養と同等のクオリティであることも確認した (胚盤胞細胞数; 73.8 vs 84.1、産仔率; 34.5% vs 43.5%)。また、近交系である C57BL/6N 系統や交雑種である B6D2F1 系統でも同様に培養可能であることがわかった。さらにここまでの方法では OptC 培地の作製のために CO₂ インキュベーターを使用する必要があったため、炭酸ガス発生剤であるアネロパウチでの作製を試みたところ、3 h の処理で OptC 培地を作製することができ、同様に密閉系での培養も可能であることがわかった。本章では従来の胚培養法より必要な機器やランニングコストが低い新規胚培養法であり、これまで不可能だった国際宇宙ステーションでマウス初期胚を培養する世界初の研究にもこの技術が用いられた。そこで本培養法を Optimized CO₂ Pressure and Sealed tube culture method (Ops 培養法) と命名し密閉系であることを利用した応用を以下の章で試みた。

第2章では Ops 培養法を用いることで胚輸送に使用可能であると考え実用を試みた。実

験動物の輸送は安全面や生体へのストレスから倦厭されるため受精卵の状態で輸送されることが多い。しかし胚輸送のためには液体窒素を用いた凍結保存した胚が使用される。それによりドライシッパーという特殊で高価な輸送機器を必要とする上、技術的に困難である凍結融解を伴う手段となっている。本章ではコストや技術を必要としない培養を伴う非凍結の胚輸送方法の確立を試みた。Ops 培養法は培養温度さえ保つことができれば培養が可能であるため、保温力の高い登山用水筒内での短期間の胚培養及び胚輸送が可能であると考えた。38.5°Cの水を入れ登山用水筒の水温を測定したところ2日後に28°Cに低下してしまっただけ2日間までの胚培養を試みた。一細胞期胚を水筒内で培養したところ24 h 培養で二細胞期胚を得られ、追加の従来法での培養により従来法と同率の胚盤胞を得ることができた (88.3% vs 95.5%) が、48 h 培養では全ての胚は二細胞期で発生が停止しており、追加の培養では多くの胚が桑実胚で発生が停止した (59.2%、 $P < 0.05$)。しかし二細胞期胚を水筒内で培養したところ48 h 培養するとほとんどの胚が桑実胚に発生し、追加の培養により胚盤胞へ発生した (91%、 $P > 0.05$)。さらに二細胞期から48 h 培養を行って発生した胚盤胞を子宮に移植した際の産仔率は従来法での産仔率との有意差はなく実用可能であることが明らかになった (17.5% vs 30.5%)。最後に実用性を検証するため山梨県甲府市から茨城県つくば市への輸送を行ったところ、同様に培養可能であることを確認した (胚盤胞率; 96.3%、産仔率; 28.6%)。これらの結果から登山用水筒を保温機器として2日間までの培養が可能であり、簡易で安価な胚輸送を確立することができた。

第3章ではOps 培養法を用いた簡易な受精卵のライブセルイメージング技術の確立を試みた。Ops 培養法ではプラスチックチューブを密閉し培養を行っていたため培養中の胚の観察が不可能であった。そこでガラスキャピラリー内にOptC 培地と胚を封入し両端を封することで培養かつ観察が可能となりライブセルイメージングに供することが可能であると考えた。ガラスキャピラリーに胚を入れ、キャピラリーを水や油に浸すと実体顕微鏡で鮮明に観察することができた。一細胞期胚の入ったガラスキャピラリーを恒温槽またはサーモプレートで加温し培養することで、ほとんど胚が胚盤胞まで発生し (恒温槽; 96.3%、サーモプレート; 95.8%、従来法; 92.7%)、サーモプレート上で培養した胚盤胞を胚移植すると健康な産仔を得ることができた (33.9%)。次に、ガラスキャピラリーおよび一般的なカメラを備えた実体顕微鏡を用いたライブセルイメージングにより、胚の発生を5日間まで観察することを試みた。その結果、本法は胚の胚盤胞までの発育速度や品質に影響を与えないことが確認された (胚盤胞率; 81.5%、産仔率; 34.5%)。さらに蛍光倒立顕微鏡を用いて同様にイメージングを行ったところ明視野と蛍光写真を両方撮影し、正常に培養可能であることも確認することができた。ライブセルイメージングを行うためには従来高額な機器を必要とし数少ない機器を用い週に1度しか行うことができなかったが、本法は複数の実体顕微鏡があれば同時に行うことも可能であるため多数の胚の解析が必要である発生速度の解析に非常に有効である。

本研究により CO₂ インキュベーターを用いない実用的な胚培養法を新たな選択肢として提供し胚輸送およびライブセルイメージングをより簡便に使用できることを明らかにした。これらの技術は発生工学という生物学の基盤となる技術を多くの研究者に使用可能であり生物学全体の発展に貢献可能な技術であると考えられる。また本技術で使用できる保温機器と密閉容器は組み合わせを任意に選択することができ、より多くの応用が可能であることが示唆される。さらに発生学において未だ研究が後進している宇宙空間での基礎研究を究めるために必要不可欠な培養技術となり、人類の宇宙進出への足がかりとなることが期待できる。

SUMMARY OF DISSERTATION

TITLE: Development of the new sealed culture method of mouse preimplantation embryo and application for Live-cell imaging technology

NAME: Yasuyuki Kikuchi

Mammals are viviparity, which means that embryos develop inside the body and implantation leads to the development of a fetus and placenta. Current technology allows *in vitro* fertilization (IVF) and *in vitro* culture to blastocyst, the pre-implantation stage, in many mammalian species. For *in vitro* culture of most mammalian species, a CO₂ incubator is used to mimic the *in vivo* environment, with a gas phase of CO₂; 5% and a temperature of 37°C. The open system, in which a drop of culture medium is prepared and a dish covered with mineral oil is placed in CO₂ incubator, allows highly efficient culture of human and laboratory animal embryo cultures, and has also enabled analysis such as live-cell imaging technology. However, there are concerns about running costs due to constant supply of CO₂ gas, the high price of the equipment itself, and the possibility of a breakdown or power failure during culture, which could halt embryogenesis in culture.

In Chapter 1, we attempted to develop a low-cost culture system without a CO₂ incubator. We thought it would be possible to develop an embryo culture method that does not require CO₂ supply by equilibrating the CO₂ partial pressure in the medium with a CO₂ incubator to achieve the optimal CO₂ partial pressure for culture and encapsulating it with the embryos in a sealed container. We measured the CO₂ partial pressure of CZB medium used in the culture of mouse preimplantation embryos and confirmed that it equilibrated after 24 h of incubation. We termed this medium Optimized CO₂ Containing (OptC) medium. OptC medium was used to culture ICR strain IVF one-cell stage embryos in plastic tubes sealed in a thermostatic chamber at 37°C.

The blastocyst rate in the conventional method using a CO₂ incubator was confirmed to be highly efficient with no significant difference (97.4% vs. 97.9%). In addition, the cell counts of the blastocysts and the offspring rate of the transferred embryos were confirmed to be comparable to those of the conventional method (blastocyst cell number; 73.8 vs. 84.1, offspring rate; 34.5% vs. 43.5%). It was also found that the inbred C57BL/6N strain and the crossbred B6D2F1 strain could be cultured as well. Furthermore, since the previous methods required the use of a CO₂ incubator to prepare the OptC medium, we attempted to prepare the OptC medium using a CO₂ gas generator, AnaeroPouch, and found that the OptC medium could be prepared in a 3 h treat and could be cultured in a closed system as well. In this chapter, we succeeded in developing a new embryo culture method that requires less equipment and running costs than conventional embryo culture methods. This method is named Optimized CO₂ Pressure and Sealed tube culture method (Ops culture method), and its application in closed systems is discussed in the following chapters.

In Chapter 2, we attempted to apply the Ops culture method for embryo transportation. Because of safety concerns and stress on the organism, laboratory animals are often transported in the embryo state. However, in embryo transportation, embryos are cryopreserved using liquid nitrogen. Embryo transportation requires special and expensive transport equipment called dry shippers and involves embryo vitrification and warming that difficult technique. In this chapter, we attempted to establish a non-frozen method of embryo transportation with culture that does not require cost or technology. Since the Ops culture method allows culture as long as the culture temperature can be maintained, we thought that short-term embryo culture and embryo transportation in a mountaineer thermal-bottle with high heat retention would be possible. When we measured the water temperature in a thermal-bottle filled with 38.5°C water, it decreased to 28°C after two days, so we attempted to culture the embryos for up to two days. We attempted to culture the embryos for up to two days. When one-cell stage embryos were cultured in the thermal bottle, two-cell stage embryos were obtained after 24 h of culture, and blastocysts were obtained at the same rate as the conventional method by subsequent culture (88.3% vs. 95.5%), but all embryos stopped developing at the two-cell stage after 48 h of culture, and many embryos stopped developing at morula stage after subsequent culture (59.2%, $P < 0.05$). However, when two-cell stage embryos were cultured in a thermal bottle for 48 h, most embryos developed to morula, and subsequential culture resulted in blastocyst development (91%, $P > 0.05$). Furthermore, when blastocysts cultured for 48 h at the two-cell stage were transferred to the uterus, the offspring rate was not significantly different from that of the conventional method (17.5% vs. 30.5%), indicating that this method is available for practical use. Finally, to verify the practicality of the method, we conducted a transport from Kofu,

Yamanashi Prefecture to Tsukuba, Ibaraki Prefecture, could use as same as without transportation (blastocyst rate; 96.3%, offspring rate; 28.6%). These results indicate that the thermal bottle can be used as heat-retention devices for up to two days of culture, and a simple and inexpensive embryo transportation method has been established.

Time-lapse observation is a popular method for analyzing mammalian preimplantation embryos, but it often requires expensive equipment and skilled techniques. We previously developed a simply and costly embryo culture system in a sealed tube that does not require a CO₂ incubator. In Chapter 3, we attempted to establish a simple live-cell imaging technology for embryos using the Ops culture method. In the Ops culture method, the embryos were cultured in sealed plastic tubes, making it impossible to observe the embryos during culture. In this chapter, we developed a new live-cell imaging technology using the Ops culture method and a glass capillary. We placed zygotes in the capillary, which could be easily observed under a stereomicroscope when submerged in water or oil. By warming the capillary with a thermostat chamber or thermoplate, we were able to achieve blastocyst development in 96.3% and 95.8% of zygotes, respectively, which was comparable to the control group developed in a dish (92.7%). Healthy offspring were also obtained after transferring the developed blastocysts into mice (33.9%). We observed embryo development for up to 5 days using the glass capillary and stereomicroscope with a general camera, confirming that this imaging system did not affect the developmental speed or quality of the embryos. This study suggests that the new system is a reasonable and affordable live-cell imaging option for studying preimplantation embryos that does not require dedicated machines or advanced techniques.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始懇篤なご指導と適切なお教示を頂きました、発生工学研究センター 若山照彦教授、同 若山清香助教、山梨大学生命環境学部生命工学科 伊藤大裕助教に深謝申し上げます。

多くの技術のご指導や研究の機会を賜りました高度生殖補助技術センター 永松 剛教授に深謝申し上げます。

終始適切なお助言、ご討論を賜りました、山梨大学大学院総合研究部生命環境学域 岸上哲士教授、幸田尚教授、鈴木堅太郎教授、大山拓次教授、望月和樹教授、石内崇士准教授に深く感謝申し上げます。

研究をはじめ多くのご指導を賜り、公私共にお世話になりました麻布大学獣医学部動物応用科学科 大我政敏講師に深く感謝申し上げます。

胚輸送実験にご協力賜りました麻布大学獣医学部動物応用科学科 伊藤潤哉教授、同 影山敦子様、東京理科大学創域理工学部生命生物科学科 前澤創准教授に深く感謝申し上げます。

本研究は、JST 次世代研究者挑戦的研究プログラム JPMJSP2133 の支援を受けたものです。

マウス管理全般についてご指導いただいた山梨大学発生工学研究センター特任助手 神田祥加さんに厚く御礼申し上げます。

そして研究全般にわたり有益な御助言を頂きました発生工学研究センターの先輩、同期、後輩の皆様に御礼申し上げます。

最後に長期の学生生活の間、経済面や精神面から支えていただきました家族に深く感謝申し上げます。

参考文献

1. Kölle, S., Hughes, B. & Steele, H. Early embryo-maternal communication in the oviduct: A review. *Mol Reprod Dev* **87**, 650–662 (2020).
2. Surani, M. A. *et al.* Genome imprinting and development in the mouse. *Development* **108**, 89–98 (1990).
3. Roberts, R. M., Green, J. A. & Schulz, L. C. The evolution of the placenta. *Reproduction* vol. 152 R179–R189 Preprint at <https://doi.org/10.1530/REP-16-0325> (2016).
4. Whittingham, D. G. Fertilization of mouse eggs in vitro. *Nature* **220**, 592–593 (1968).
5. Whitten, W. K. & Biggers, J. D. Complete development in vitro of the pre-implantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium. *J Reprod Fertil* **17**, 399–401 (1968).
6. Chang, M. C. Fertilization of rabbit ova in vitro. *Nature* **184**, 466–467 (1959).
7. Lewis, W. H. & Gregory, P. W. Cinematographs of living developing rabbit-eggs. *Science (1979)* **69**, 226–229 (1929).
8. Edwards, R. G., Bavister, B. D. & Steptoe, P. C. Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro. *Nature* **221**, 632–635 (1969).
9. Steptoe, P. C., Edwards, R. G. & Purdy, J. M. Human blastocysts grown in culture. *Nature* **229**, 132–133 (1971).
10. Ferré, L. B. *et al.* Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. (2019) doi:10.1017/S1751731119002775.
11. Romar, R., Cánovas, S., Matás, C., Gadea, J. & Coy, P. Pig in vitro fertilization: Where are we and where do we go? *Theriogenology* **137**, 113–121 (2019).
12. Moriyama, D. F. *et al.* The effects of temperature variation treatments on embryonic development: a mouse study. *Scientific Reports 2022 12:1* **12**, 1–14 (2022).
13. Walters, E. A., Brown, J. L., Krisher, R., Voelkel, S. & Swain, J. E. Impact of a controlled culture temperature gradient on mouse embryo development and morphokinetics. *Reprod Biomed Online* **40**, 494–499 (2020).
14. Takenaka, M., Horiuchi, T. & Yanagimachi, R. Effects of light on development of mammalian zygotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 14289–14293 (2007).
15. Nguyen, Q. *et al.* Effects of opening the incubator on morphokinetics in mouse embryos. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* **229**, 64–69 (2018).
16. Lewis, W. H. & Gregory, P. W. CINEMATOGRAPHS OF LIVING DEVELOPING RABBIT-EGGS. *Science* **69**, 226–229 (1929).

17. Miyamoto, K. *et al.* Reprogramming towards totipotency is greatly facilitated by synergistic effects of small molecules. *Biol Open* **6**, 415–424 (2017).
18. Morbeck, D. E., Khan, Z., Barnidge, D. R. & Walker, D. L. Washing mineral oil reduces contaminants and embryotoxicity. *Fertil Steril* **94**, 2747–2752 (2010).
19. Lee, S. *et al.* Renovation of a Drop Embryo Cultures System by Using Refined Mineral oil and the Effect of Glucose and/or Hemoglobin Added to a Serum-free Medium. *J. Vet. Med. Sci* **66**, 63–66 (2004).
20. Mestres, E. *et al.* Characterization and comparison of commercial oils used for human embryo culture. *Human Reproduction* **37**, 212–225 (2022).
21. Fawzy, M. *et al.* Humid versus dry incubator: a prospective, randomized, controlled trial. *Fertil Steril* **108**, 277–283 (2017).
22. Elsheikh, A. S., Takahashi, Y., Nagano, M. & Kanagawa, H. Manipulated Mouse Embryos as Bioassay System for Water Quality Control. *Reproduction in Domestic Animals* **38**, 204–208 (2003).
23. Rorie, R. W., Miller, G. F., Nasti, K. B. & McNew, R. W. In vitro development of bovine embryos as affected by different lots of bovine serum albumin and citrate. *Theriogenology* **42**, 397–403 (1994).
24. Vajta, G., Holm, P., Greve, T. & Callesen, H. The submarine incubation system, a new tool for in vitro embryo culture: A technique report. *Theriogenology* **48**, 1379–1385 (1997).
25. Arias, M. E., Sanchez, R. & Felmer, R. Evaluation of different culture systems with low oxygen tension on the development, quality and oxidative stress-related genes of bovine embryos produced in vitro. *Zygote* **20**, 209–217 (2012).
26. Ozawa, M. *et al.* Successful pig embryonic development in vitro outside a CO₂ gas-regulated incubator: Effects of pH and osmolality. *Theriogenology* **65**, 860–869 (2006).
27. Liu, J. *et al.* Sealed culture system for supporting mouse preimplantation embryo development in vitro. *Reprod Fertil Dev* **32**, 879–884 (2020).
28. Roh, S., Choi, Y. J. & Min, B. M. A novel microtube culture system that enhances the in vitro development of parthenogenetic murine embryos. *Theriogenology* **69**, 262–267 (2008).
29. Swain, J. E. A self-contained culture platform using carbon dioxide produced from a chemical reaction supports mouse blastocyst development in vitro. *Journal of Reproduction and Development* **57**, 551–555 (2011).
30. Swain, J. E. & Pool, T. B. New pH-buffering system for media utilized during gamete and embryo manipulations for assisted reproduction. *Reprod Biomed Online* **18**, 799–810 (2009).

31. Vajta, G., Rienzi, L., Cobo, A. & Yovich, J. Embryo culture: can we perform better than nature? *Reprod Biomed Online* **20**, 453–469 (2010).
32. Loutradis, D. *et al.* Biological Factors in Culture Media Affecting in Vitro Fertilization, Preimplantation Embryo Development, and Implantation. *Ann N Y Acad Sci* **900**, 325–335 (2000).
33. Summers, M. C. & Biggers, J. D. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: Historical perspective and current issues. *Hum Reprod Update* **9**, 557–582 (2003).
34. Swain, J. E. Optimizing the culture environment in the IVF laboratory: Impact of pH and buffer capacity on gamete and embryo quality. *Reprod Biomed Online* **21**, 6–16 (2010).
35. Walters, E. A., Brown, J. L., Krisher, R., Voelkel, S. & Swain, J. E. Impact of a controlled culture temperature gradient on mouse embryo development and morphokinetics. *Reprod Biomed Online* **40**, 494–499 (2020).
36. Quinn, P., Moinipanah, R., Steinberg, J. M. & Weathersbee, P. S. Successful human in vitro fertilization using a modified human tubal fluid medium lacking glucose and phosphate ions. *Fertil Steril* **63**, 922–924 (1995).
37. Chatot, C. L., Lewis, L. J., Torres, I. & Ziomek, C. A. Development of 1-cell embryos from different strains of mice in CZB medium. *Biol Reprod* **42**, 432–440 (1990).
38. Kimura, Y. & Yanagimachi, R. Intracytoplasmic Sperm Injection in the Mouse. *Zygote* **6**, 143–147 (1998).
39. Summers, M. C. & Biggers, J. D. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: Historical perspective and current issues. *Hum Reprod Update* **9**, 557–582 (2003).
40. Brinster, R. L. Studies on the development of mouse embryos in vitro. I. The effect of osmolarity and hydrogen ion concentration. *Journal of Experimental Zoology* **158**, 49–57 (1965).
41. Summers, M. C. & Biggers, J. D. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: Historical perspective and current issues. *Hum Reprod Update* **9**, 557–582 (2003).
42. Mukunoki, A. *et al.* Simple transport and cryopreservation of cold-stored mouse embryos. *Exp Anim* **69**, 423–429 (2020).
43. Rubio Pomar, F. J. *et al.* Development, DNA fragmentation and cell death in porcine embryos after 24 h storage under different conditions. *Theriogenology* **61**, 147–158 (2004).
44. Lin, Q. *et al.* Short-term preservation of porcine zygotes at ambient temperature using

- a chemically defined medium. *Animal Science Journal* **93**, e13711 (2022).
45. de Dios Hourcade, J., Pérez-Crespo, M., Serrano, A., Gutiérrez-Adán, A. & Pintado, B. In vitro and in vivo development of mice morulae after storage in non-frozen conditions. *Reproductive Biology and Endocrinology* **10**, 1–13 (2012).
 46. Ge, L. *et al.* Production of F0 mice from embryonic stem cells injected eight-cell stage embryos which stored at refrigeration temperature. *Cryobiology* **86**, 89–94 (2019).
 47. Herr, C. M. & Wright, R. Cold culture of different stage mouse embryos in bicarbonated and bicarbonate-free media. *Theriogenology* **30**, 159–168 (1988).
 48. Tokoro, M. *et al.* A simple method for transportation of mouse embryos using microtubes and a warm box. *PLoS One* **10**, 1–13 (2015).
 49. Tokoro, M. *et al.* A simple method for transportation of mouse embryos using microtubes and a warm box. *PLoS One* **10**, 1–13 (2015).
 50. Li, Q. *et al.* Combined inhibitory effects of pyruvate and low temperature on postovulatory aging of mouse oocytes. *Biol Reprod* **87**, 105–106 (2012).
 51. Kikuchi, Y., Wakayama, S., Ito, D., Ooga, M. & Wakayama, T. Optimised CO₂-containing medium for in vitro culture and transportation of mouse preimplantation embryos without CO₂ incubator. *PLoS One* **16**, e0260645 (2021).
 52. Fujiwara, M. *et al.* Effect of micro-environment maintenance on embryo culture after in-vitro fertilization: Comparison of top-load mini incubator and conventional front-load incubator. *J Assist Reprod Genet* **24**, 5–9 (2007).
 53. Bari, M. W., Morishita, Y. & Kishigami, S. Heterogeneity of nucleolar morphology in four-cell mouse embryos after IVF: association with developmental potential. *Anim Sci J* **94**, (2023).
 54. Ishiyama, S. *et al.* Mice derived from in vitro α MEM-cultured preimplantation embryos exhibit postprandial hyperglycemia and higher inflammatory gene expression in peripheral leukocytes. *Biosci Biotechnol Biochem* **85**, 1215–1226 (2021).
 55. Asano, Y. & Matsuura, K. Mouse embryo motion and embryonic development from the 2-cell to blastocyst stage using mechanical vibration systems. *Reprod Fertil Dev* **26**, 733–741 (2014).
 56. Lee, D. R., Lee, J. E., Yoon, H. S., Roh, S. Il & Kim, M. K. Compaction in preimplantation mouse embryos is regulated by a cytoplasmic regulatory factor that alters between 1- and 2-cell stages in a concentration-dependent manner. *Journal of Experimental Zoology* **290**, 61–71 (2001).
 57. Wakayama, T. *et al.* Development of early-stage embryos of the Japanese field vole, *Microtus montebelli*, in vivo and in vitro. *J Reprod Fertil* **101**, 663–666 (1994).
 58. Chatot, C. L., Lewis, L. J., Torres, I. & Ziomek, C. A. Development of 1-cell embryos

- from different strains of mice in CZB medium. *Biol Reprod* **42**, 432–440 (1990).
59. Davidson, A., Vermesh, M., Lobo, R. A. & Paulson, R. J. Mouse embryo culture as quality control for human in vitro fertilization: The one-cell versus the two-cell model. *Fertil Steril* **49**, 516–521 (1988).
 60. Sakashita, A. *et al.* Polycomb protein SCML2 mediates paternal epigenetic inheritance through sperm chromatin. *Nucleic Acids Res* **51**, 6668–6683 (2023).
 61. Devgan, V., Rao, M. R. S. & Seshagiri, P. B. Impact of embryonic expression of enhanced green fluorescent protein on early mouse development. *Biochem Biophys Res Commun* **313**, 1030–1036 (2004).
 62. Van Der Ven, H. H., Hoebbel, K., Al-hasani, S., Diedrich, K. & Krebs, D. Fertilization of human oocytes in capillary tubes with very small numbers of spermatozoa. *Human Reproduction* **4**, 72–76 (1989).
 63. Thouas, G. A., Jones, G. M. & Trounson, A. O. The ‘GO’ system - A novel method of microculture for in vitro development of mouse zygotes to the blastocyst stage. *Reproduction* **126**, 161–169 (2003).
 64. Lane, M. & Gardner, D. K. Effect of incubation volume and embryo density on the development and viability of mouse embryos in vitro. *Human Reproduction* **7**, 558–562 (1992).
 65. Itoi, F. *et al.* Offspring from Mouse Embryos Developed Using a Simple Incubator-Free Culture System with a Deoxidizing Agent. *PLoS One* **7**, (2012).
 66. Yamagata, K. *et al.* Noninvasive visualization of molecular events in the mammalian zygote. *Genesis (United States)* **43**, 71–79 (2005).
 67. Hatano, Y., Mashiko, D., Tokoro, M., Yao, T. & Yamagata, K. Chromosome counting in the mouse zygote using low-invasive super-resolution live-cell imaging. *Genes to Cells* **27**, 214–228 (2022).
 68. Dai, S. J., Xu, C. L., Wang, J., Sun, Y. P. & Chian, R. C. Effect of culture medium volume and embryo density on early mouse embryonic development: Tracking the development of the individual embryo. *J Assist Reprod Genet* **29**, 617–623 (2012).
 69. Kelley, R. L. & Gardner, D. K. In vitro culture of individual mouse preimplantation embryos: the role of embryo density, microwells, oxygen, timing and conditioned media. *Reprod Biomed Online* **34**, 441–454 (2017).
 70. Ota, N. *et al.* Microenvironmental Analysis and Control for Local Cells under Confluent Conditions via a Capillary-Based Microfluidic Device. *Anal Chem* (2022) doi:10.1021/ACS.ANALCHEM.2C02815.
 71. Wakayama, S. *et al.* Development of a new device for manipulating frozen mouse 2-cell embryos on the International Space Station. *PLoS One* **17**, 1–17 (2022).

72. Wakayama, S. *et al.* Effect of microgravity on mammalian embryo development evaluated at the International Space Station. *iScience* 108177 (2023) doi:10.1016/J.ISCI.2023.108177.