

JDX-2025020

2024 年度

「きぼう」利用テーマ・船内科学研究に係る

科学成果評価結果

報告書

宇宙航空研究開発機構

有人宇宙技術部門

宇宙環境利用推進センター

1. 概要

本資料は、2024年度(2024年7月から2025年3月)に実施した、「きぼう」船内を利 用した科学研究テーマの科学成果評価の結果および評価への入力となった対象テー マの研究成果報告書等を取り纏めたものである。

2. 評価対象

評価対象となったテーマを表1に示す。

これらのテーマは、2021年度~2022年度の間に軌道上実験を実施した3件の科学研究テーマである。

3. 評価の目的、評価指標

「きぼう」で行われた研究成果の達成状況とその意義、分野学術や社会への貢献、波 及効果に対する評価を通じて、各々の研究成果のアピールポイントを効果的に情報発 信すること、また、きぼう利用に関する改善点、利用の方向性等へ提言を得て、今後の 利用計画設定に資することを目的として評価が行われた。この目的に照らし、表2に示 す各評価項目に基づき、書類審査、面接審査(成果報告会)が実施され、評価結果 は、最終的に、以下の4段階の総合評価指標および提言として取り纏められた。

S:目標を高度に達成し、特筆すべき成果を上げた(エクストラサクセス相当).

- A:目標を充分に達成した(フルサクセス相当).
- B:目標を一部達成した(ミニマムサクセス相当).
- C:成果として不足・不十分であり、目標を達成していない.

※2017 年度までの基準(以下)と異なる。

- S:目標を高度に達成し、特筆すべき成果を上げた.
- A:目標を充分に達成した(エクストラサクセス相当以上).
- B:目標を達成した(フルサクセス相当).
- C:目標達成に不足・不十分な点があり、引き続き解析・検討を要す.
- 4. 評価体制

評価は、生命医科学分野あるいは物質・物理科学分野のきぼう利用テーマ選考評価 委員会(以下、「選考評価委員会」)により実施された。また、分野専門家3名のピアレ ビューアをテーマ毎に設定し、書類審査を併せて行い、選考評価委員会は、これを参 考として審査を行った。

ここで、選考評価委員会は、きぼう利用において、応募されたテーマ等の選考、設定された利用テーマ等の評価を行うために設置された JAXA 有人宇宙技術部門長の諮問 委員会であり、物質・物理科学分野及び生命医科学分野の2分野が設定されている。 今回、評価にあたった選考評価委員会の構成員リストを表3に示す。

5. 評価プロセス

研究成果報告の提出から成果評価の公表までの評価プロセスを図4に示す。

6. 科学成果評価に係る文書

本資料に含めるテーマ毎の研究成果報告書、科学成果評価結果等を、表5に示す。

No	テーマ名	研究代表者 (評価時)	実験時期(※)	成果評価 (委員会)	分 野
1	微小重力環境下での哺乳類初期 胚の発生能について (Space Embryo)	山梨大学 教授 若山照彦	2021 年 9 月	2024 年 7 月 29 日	生命医
2	臓器連関の視点から解き明かす 加齢性筋骨格系疾患の発症機構 (Neurovascular & interorgan network/ MHU-7)	東京科学大学 教授 佐藤信吾	2021 年 12 月~ 2022 年 1 月	2025 年 3 月 6 日	科学
3	低重合度のケイ酸塩融体におけ る粘性、密度の温度依存性測定 (Silicate Melt)	関西学院大学 教授 河野義生	2022 年 7~8 月	2025 年 2 月 20 日	物質物理科学

※ 地上対照実験は含まない。

表2	評価項目
----	------

	(1)	研究目標の意義および達成度		
		• 研究目標の意義は高いか(ミッション選定/準備段階移行以降に修正された		
		場合). また、時間経過により減じていないか.		
Tal		 研究目標は達成されたか、サクセスクライテリアに照らした達成度のレベル、 		
科学	(2)	実施体制		
一		 研究チームおよび JAXA の体制は適切であったか. 		
• 技	(3)	科学的、技術的成果		
術	 得られた成果は、国際的なレベルに照らして、高いか。 			
的		 設定された目標を越える成果があったか。 		
成里	(4) 活用、波及効果			
~		 関連科学分野・技術領域への波及効果があったか、また、期待されるか。 		
		• 科学的、技術的に活用が見込めるか、成果活用の意義・重要性は高いか		
	(5)	きぼう利用の必然性		
		 きぼうで行う必然性があったか。 		
総	(6)	総合評価		
合提		 成果インパクト、応用・波及効果などのポテンシャル、他、アピールポイント。 		
評管		 今後の宇宙実験に向けての課題、改善すべき点。 		
1曲		 当該科学分野・領域におけるきぼう利用の発展性、継続の意義。 		

表3 きぼう利用テーマ選考評価委員会 構成員 (評価時)

生命医科学分野

委員長	山口朗	
	東京歯科大学口腔科学研究センター 客員教授	
副委員長	武田 伸一	
	国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 産学連携顧問/名誉所長	
委員	青井 貴之 ※	
	神戸大学大学院医学研究科 教授	
	午田 多加志	
	東京大学大学院工学系研究科 名誉教授	
	緒方 徹	
	東京大学大学院医学系研究科 外科学専攻 感覚・運動機能医学講座 リ	
	ハビリテーション医学分野 教授	
	田村 宏治	
	東北大学大学院生命科学研究科 教授	
	本間 研一	
	北海道大学 医学研究科 名誉教授	
	諸橋憲一郎	
	久留米大学医学部 客員教授	

※2024 年 8 月委員就任

物質·物理科学分野

委員長	石川 正道
	同志社大学高等研究教育院 特別客員教授
委員	梅澤 修
	橫浜国立大学 大学院工学研究院 教授·工学研究院長
	江刺 正喜
	株式会社メムス・コア CTO
東北大学マイクロシステム融合研究開発センター シニアリサーチフョ	
	柴田 浩幸
	東北大学 多元物質科学研究所 教授
	西岡 牧人
	筑波大学システム情報系 教授
	御手洗 容子
	東京大学 大学院新領域創成科学研究科 教授



実験終了後、概ね2年後に、研究代表者より提出

テーマごとに 3 名程度の専門家が、専門的見 地から審査する。

ピアレビューの結果をもとに、選考評価委員会の各委員が各テーマを審査する。

研究者による成果報告、事前に実施済みの書 類審査結果(ピアレビュー結果、委員評価結 果)をもとに、委員会としての科学評価結果をま とめる。

図4 科学成果評価プロセス

No	テーマ名	研究成果 報告書	評価結果	研究成果 概要書(日)	研究成果 概要書(英)
1	微小重力環境下での哺乳類初期胚 の発生能について (Space Embryo)	別紙 1-1	別紙 1-2	別紙 1-3	別紙 1-4
2	臓器連関の視点から解き明かす加 齢性筋骨格系疾患の発症機構 (Neurovascular & interorgan network/ MHU-7)	(※)	別紙 2-2	別紙 2-3	別紙 2-4
3	低重合度のケイ酸塩融体における 粘性、密度の温度依存性測定 (Silicate Melt)	(※)	別紙 3−2	別紙 3-3	別紙 3-4

表5 添付文書の構成

(※) 論文公表後に公開(別紙 2-1、別紙 3-1)

以上

2014年ライフサイエンス国際公募テーマ

「微小重力環境下での哺乳類初期胚の発生能について(Space Embryo)」

研究成果報告書

代表研究者:若山 照彦 (山梨大学)

2024年5月

1. 諸言

研究内容、目標の概要.

本実験では、凍結したマウス2細胞期胚を軌道上で解凍し、4日間培養した後に化学固定 を行い、地上に持ち帰り解析する。蛍光顕微鏡を用いた解析では胚の発生段階、形態、細 胞数および細胞分化を明らかにする。網羅的遺伝子発現解析では、それぞれの胚の遺伝 子発現を確認し、発生における重力の影響を評価する。これらの解析によりµG環境でも哺 乳類の初期胚が発生可能なのか明らかにする。

宇宙時代に人類が地球外で繁栄するためには、宇宙で子供が作れなければならない。し かしこれまで、哺乳類の生殖における宇宙放射線や微小重力の影響を調べた研究はほとん どない。地上で行われた擬似微小重力実験では、マウス初期胚は胎盤への分化が抑制さ れ、出産率が大きく低下することから、初期発生の過程において、重力が重要な働きをして いる可能性が示唆されている。たとえば哺乳類の発生において、受精卵は8細胞期から16 細胞期にかけて最初の分化(運命決定)を行い、胚盤胞期胚には内部細胞塊(ICM:将来胎 児へ発育)と栄養外胚葉(TE:将来胎盤へ発育)の細胞に分かれるが、この運命決定に重力 が関与している可能性が考えられる。また ICM はかならず胚盤胞の内部の1 か所に集まる が、それは ICM が TE より重たくて胚盤胞の底にたまっている可能性も考えられる。もしこれ らの仮説が事実であれば、微小重力環境で胚は正常に発生できなくなり、哺乳類が宇宙で 子供を作ることは難しい、ということになる。

そこで本研究では、宇宙環境において哺乳類の初期発生が正常に行われるかどうかを明 らかにし、もし重力が発生に影響を与える場合は、そのクリティカルポイントを明らかにするこ とを目的とする。

・研究内容の重要性、分野・領域での位置付け、意義.

- ①受精卵における最初の運命決定(ICM あるいは TE への分化)が何によって決定されるのか、ICM がなぜーか所に集まるのかは、まだ不明な点が残されている。重力が細胞の位置に影響を与え、それが分化や ICM の局在に影響している可能性も考えられていたが、地上で微小重力環境を長期間作ることは出来ないため、証明することは不可能だった。
 ②我々が地上で行った擬似微小重力実験から、宇宙では哺乳類特有の臓器である胎盤の
- 発育が悪くなる可能性が示された。もしこれが事実であれば、人類を含む哺乳類は、宇宙 では子供を作れないことになる。
- ③ISS の微小重力環境で哺乳類の胚を培養し、胚の発生に重力が影響を与えるのかを確認することが必要だが、これまで哺乳類の胚を用いた宇宙実験は技術的に困難だった。
 ④本実験では、哺乳類の胚を宇宙で培養するためのデバイス開発および手法の確立を行

い、重力が哺乳類の発生にどのような影響を与えるのかを明らかにする。

⑤宇宙放射線の生殖細胞への影響については、精子を ISS で長期間保存することで、我々が世界で初めて精子 DNA への宇宙放射線の影響について明らかにした^{1,2}。

・研究動機、バックグラウンド.

将来月面基地やスペースコロニーなどが建設され永住する時代が来た時、人類だけ でなく家畜の生殖・繁殖も必要になる。だが宇宙環境は無重力や強力な宇宙放射線が 降り注ぐため、継世代への影響が懸念されている。そのためこれまでに行われた宇宙 での生殖研究は、簡単に実験を実施できる魚類や両生類など非哺乳動物種がほとんど であり、それらの動物種は微小重力環境でも問題なく繁殖可能なことが確かめられて いる ³⁻⁹。だが、哺乳類は母体の体内で胎盤を介して発育する独特の生殖をおこなうた め、魚類や両生類などの研究成果から哺乳類の生殖を類推することは出来ない。とこ ろが哺乳類の宇宙生殖に関する研究は、妊娠後期における微小重力の影響について調 べられているだけであり、受精及び初期発生についての研究や、宇宙放射線の影響に ついてはほとんど調べられていない。なぜなら哺乳類は環境の変化に敏感であり、せ っかく宇宙へ運んでも交尾をしない可能性が高いためである。実際に宇宙でラットの 繁殖を試みたコスモス 1129 の実験では、宇宙どころか地上のコントロール実験でも 繁殖行動をせず失敗している¹⁰⁻¹⁵。失敗する可能性の高い動物を宇宙に運ぶ代りに、 生殖細胞を用いた研究が計画されたこともあるが、哺乳類の生殖細胞は小さすぎるた め、顕微鏡を使って熟練した技術を用いなければ扱うことができず、地上と同じ方法 では宇宙飛行士に ISS 内で実施してもらうことはほぼ不可能である。

そこで我々は最初に、精子を ISS で長期間保存し、宇宙放射線が精子 DNA にどのようなダメージを引き起こすのか明らかにする実験を行った。この実験は精子を ISS で 1 年から 6 年間保存するだけなので、宇宙飛行士の手を煩わせない。この実験により、精子は ISS 程度の宇宙放射線被ばくであれば約 200 年は保存できること、継世代 に変異は生じないことなどが明らかになった^{1,2}。

一方受精卵は、培養器内での培養可能な期間はわずか 4-5 日間しかなく、生きた胚 をロケットへ載せた場合、どんなに急いでも ISS へ到着前に胚は死んでしまうため、 実験はほぼ不可能だった。過去にマウスの受精卵を ISS へ打ち上げて培養を試みた実 験があるが失敗している (STS-80. 詳細は発表されていない)。また本テーマの FS を 実施中に、中国の研究者らが 2 細胞期胚を弾道軌道へ打ち上げ、3 日間宇宙で培養す ることに成功したが¹⁶、この実験には理解できない点が多く、詳細も発表されておら ず結果の信頼性は低い。

そのため哺乳類の宇宙生殖に関する研究は、微小重力を再現できる 3D クリノスタ ットを用いた擬似微小重力環境で行われてきた。我々も擬似微小重力実験により、哺 乳類の初期胚は微小重力環境下では細胞分化が阻害され発生できなくなる可能性を報 告している¹⁷。もしこの結果が宇宙でも事実なら、哺乳類は宇宙での繁殖が不可能と いうことになってしまう。そのため「きぼう」を利用した本当の宇宙実験が必須である ことが分かっているが、前述した理由によりこれまで本格的な哺乳類の受精卵を用い た宇宙生殖実験は実施することが出来なかった。

もし凍結した胚を打ち上げ、宇宙飛行士が ISS 内で解凍し、微小重力で胚を培養す ることが出来れば、哺乳類の初期発生における重力の影響を明らかにすることができ るだろう。だが、凍結胚の解凍—洗浄—培養作業を、胚を扱った経験のない者でも簡 単に行うことができるデバイスは、宇宙実験に限らずまだ作られたことがない。この ようなデバイスが作られれば、不妊治療や家畜の受精卵移植、研究機関で遺伝子改変 マウスの作製などでも利用されることになるだろう。 そこで本テーマでは、誰でも胚の解凍と培養を可能にする新デバイスを開発し、哺 乳類の初期胚が微小重力環境下でも初期発生が可能なのか明らかにすることを目標と した。

2. 研究計画

2.1 研究目標

長期安定した「きぼう」の微小重力環境下を用いて、哺乳類初期胚の発生能を調べる。

1) 本テーマを実施するために必要なデバイス(*1)を開発する。

2) 凍結したマウスの2細胞期胚(*2)を、きぼうの微小重力環境下で解凍し、培養する。

3) 4 日間培養を行い、試料を PFA にて固定(*3)後、PBS で置換し、冷蔵保管する。

4) サンプルを冷蔵温度で帰還させ日本まで輸送する。

5)回収した試料の解析を行う。

実験は、軌道上 µG、軌道上 1G および地上 1G の 3 区を同時に行い、宇宙で発生させた 胚の性質を明らかにする。まず、微小重力環境下でも胚盤胞へ発生できるのか調べる。 胚盤胞に発生していたら、一部の胚は抗体蛍光染色を行った後、共焦点顕微鏡解析を行い、 胚の発育は正常なのか、ICM と TE への細胞分化が正しく起こるのか、ICM は 1 か所に集ま っているのか、DNA ダメージの有無は、などについて解析する。他の胚は網羅的遺伝子発 現解析を行い、3 区の遺伝子発現に違いがあるのか明らかにする。

*1. このデバイスは、ISS で宇宙飛行士が凍結胚を解凍し、4 日間培養後に PFA 固定する ことを可能にする。

*2. 胚は液体窒素下で凍結するのが基本だが、ISS では-95℃の冷凍庫しか利用できないため、この温度でも数か月間凍結保存しても解凍後に生き返る方法を開発する。

*3. PFA 固定した胚盤胞の網羅的遺伝子発現解析を行うために、脱クロスリンク処理などの方法を開発する。

サクセス	クライテリア
Minimum	軌道上でマウス初期胚の培養を行って、サンプルを回収し、微小重力
Success	環境と軌道上 1G 環境による発生過程への影響を確認する。
Full	上記に加えて、軌道上から回収した初期胚における細胞の最初の分
Success	化、および遺伝子発現等を比較すること。
Extra Success	初期胚発生への重力影響の原因を明らかにする。 初期胚発生において胎児となる内部細胞塊と胎盤となる栄養外胚葉 の分化の新しいメカニズムを提唱できること。 または、地上の胚培養技術の実用化に貢献できること。

成功基準(以下、サクセスクライテリア)は以下の通りである。

2.2 体制

・研究チーム体制;

	所属·氏名	
代表研究者	山梨大学 発生工学研究センター 若山 照彦 教授	立案·統括
共同研究者	山梨大学 生命環境学部生命工学科 若山 清香 特任助教	実験試料の準備、回収試料の解 析
共同研究者	山梨大学 生命環境学部生命工学科 大我 政敏 助教(現、麻布大学 講師)	実験試料の準備、回収試料の解 析
共同研究者	明治大学 農学部生命科学科 長嶋 比呂氏 教授	胚の凍結融解に関する予備実験
共同研究者	明治大学 農学部生命科学科 松成 ひとみ 特任講師	胚の凍結融解に関する 予備実験
共同研究者	東京医科歯科大学 難治疾患研究所・エピジェネティクス分野 石野 史敏 教授	回収試料の遺伝子解析
共同研究者	山梨大学 生命環境学部生命工学科 幸田 尚 教授	回収試料の遺伝子解析
共同研究者	理化学研究所バイオリソース研究センター 遺伝工学基盤技術室 小倉 淳朗 室長	新デバイス上で胚の 凍結融解を可能にする 溶液開発
共同研究者	理化学研究所バイオリソース研究センター 遺伝工学基盤技術室 持田 慶司 専任技師	新デバイス上で胚の 凍結融解を可能にする 溶液開発

•JAXA 支援体制

機関・組織	担当
東端晃	とりまとめ
宇宙航空研究開発機構・有人宇宙技術部門・きぼう利用センター	
山﨑 誠和	とりまとめ支援
宇宙航空研究開発機構・有人宇宙技術部門・きぼう利用センター	
松﨑 乃里子	とりまとめ支援
宇宙航空研究開発機構・有人宇宙技術部門・きぼう利用センター	
「嶋津 徹	研究者支援
エスエルアイ合同会社	
山盛)徹	研究者支援
日本宇宙フォーラム・宇宙利用事業部	
梅原 真澄	地上研究支援
株式会社エイ・イー・エス	
長田 郁子	運用支援
有人宇宙システム株式会社	

作業項目	研究代表者	JAXA
実験要求、運用要求、 実験条件の検討、策定	0	支援
実施計画の策定	支援	0
実験供試体の検討、製作	支援	0
実験試料・供試体の 適合性・安全性の評価、確認	支援	0
地上実験実施	0	支援
運用準備 (手順書作成、 宇宙飛行士訓練など)、輸送	支援	0
実験試料準備	0	支援
フライト実験実施	支援	0
飛行後解析、成果発表	0	支援

・体制が各フェーズで充分に機能し、役割を果たしたか、問題点・課題があったかなどの評価、JAXAの果たした役割への研究チームとして評価について言及.

研究チームは分担に従って、実験準備、デバイス開発・検証、打ち上げサンプル準備、回 収サンプルの解析を行って、十分に役割を果たした。JAXA および支援チームは宇宙実験 実施に必要な実施計画を作成し、デバイスの検証、適合性確認、安全性確認、サンプル輸 送、フライト実験実施などの必要な役割を果たした。

2.3 スケジュール 【実験準備段階移行時点】



【実績スケジュール】



▶ フライト実験の実施が打上計画の変更により、当初計画より1年程度遅れた。

打ち上げは 2021 年 8 月 28 日と予定より1 日遅れたが、ISS には 29 日に到着した。1 日 だけの遅れだったため、準備していた予備の試料との交換は行われなかった。9 月 4 日に 実験の準備(培養液の最適化)が始まり、9 月 6 日にマウス 2 細胞期胚の解凍を行い、微小 重力培養実験が始まった。9 月 10 日に胚を 0.99%PFA で化学固定し冷蔵庫で保管後、9 月 30 日に帰還船で地球に戻った。冷蔵温度で輸送し、10 月 7 日に日本到着、10 月 9 日、 山梨大で試料を受け取った。

3. 実験準備·運用

(1) 準備期間での実施事項

2014 年度にライフサイエンス国際公募テーマとして採択された。本テーマを成功させるためには、胚に触れずに凍結胚の解凍、洗浄そして4日間培養して胚盤胞まで発生させるデバイスが必要だが、まだこのようなデバイスは存在していなかった。そこでシリンジや無菌バックなどの容器を組み合わせたデバイスの開発を行ったが、ISSの条件をすべて満たすことは難しく、この開発に時間を要した。当初は ISS 内で胚が発生する様子を顕微鏡で観察することを計画していたが、観察可能な方法で ISS の実験条件を満たすことが出来なかったため、地上に回収後に観察及び解析をすることにした。また、PFA で固定した胚の網羅的遺伝子発現解析を行うため、脱クロスリンクの条件検討にも時間を要した。

選定時の付帯条件		対応状況	
(1)	3D クリノスタットの地上実験データの 取扱い、解釈を慎重に行うこと。	3D クリノスタットはあくまでも擬似微小重力環 境であり、重力の方向性をランダムにしている が重力は無くならないという違いがあること、さ らには液体の動きによるシアーストレスの影響 などを考慮し、宇宙実験の仮説を導いた。	
(2)	宇宙実験実施に向けて、実験条件や JAXA 供試体等の利用を含めて実験 計画詳細化検討を行うこと。	 打上前の地上での初期胚の凍結条件を確立した。 凍結初期胚に適した、軌道上での解凍に必要な供試体・実験系・手順を設定でき、初期胚の成長を確認できた。 顕微鏡観察については化学固定胚を回収し地上で詳細に観察することで、提案時の実験目的を達成できることを確認した。 	



図 1. 胚に触れることなく解凍・洗浄・培養が可能なデバイス開発(中空糸膜法;非採用)

本テーマの最大の問題は、胚操作の経験がない宇宙飛行士が、地上より操作が難しい ISS で、どうやって胚の解凍や培養を行うか、である。この解決案として我々は最初に中空 糸膜を使うことを思いついた。中空糸膜は浄水器や透析に使われている、内径 200 μ m 程 度の細い糸状の膜であり、ポアサイズ(網目の大きさ)は 10 nm 程度と小さいため、透明な ストローのような外見をしている。この中空糸膜内に胚を中にいれ両端を閉じれば、中空糸 膜を持つことで胚を移動することができる。さらに、網目状のため胚を閉じ込めたまま凍結液 と洗浄液や培養液との置換が可能であり、しかも顕微鏡で発生を観察できる。この方法であ れば、宇宙飛行士が ISS 内で、胚に触れずに解凍し培養することができるのではないかと考 えた ¹⁸。

まず2細胞期胚を凍結液に浸してから中空糸膜内に入れ(図1a)、両端をふさぎ、その中 空糸膜をシリンジの先端に取り付けたチップ内に入れる(図 1b.c)。矢印は胚を示す。そして シリンジごと液体窒素に浸して凍結する(図 1d)。解凍するときは、液体窒素からシリンジを 取り出し(図 1e)、市販の OptiCell[™]のポート(液交換するための口)に刺して中空糸膜を内 部に注入する(図 1f)。OptiCell[™]にはあらかじめ解凍液が入っている。次にポートへ培養液 の入った 10ml シリンジを刺し、もう一方のポートに廃液用シリンジを刺して、液交換を行う (図 1g)。この方法によって、胚に触れずに凍結胚を解凍し、培養することに世界で初めて成 功した。しかも胚が発生する様子を顕微鏡で観察することも可能だった。だがこの容器は大 きく、使用する培養液が多いこと、プレート面が広く中にある中空糸膜を見つけるのに時間 がかかることから、我々は JAXA が線虫用に開発したミニプレートが使用できないか試して みた(図 1h-j)。予備実験から、ミニプレートでも可能であることが分かってきたため、次に 我々は、同じくJAXA が開発した細胞実験ユニット(CEU)が利用できないか試みた(図 1k)。 分解された CEU(図 11)。だが凍結した中空糸膜をこのユニットの中央に置いてから、溶けて しまう前にユニットを組み立てることは不可能だった。またユニットに使われている金属が原 因と思われる毒性により胚はすべて死んでしまった。そこで CEU を参考にして、金属を使わ ず、組み立てもガス透過膜を張り付けるだけの新細胞実験ユニット(以下、NCEU)を開発し た(図 1m)。この NCEU には、中空糸膜(矢頭)をプレートの中央に挟み込むためのシリコン 製フリッパー(矢印)が装備されている(図 1n)。液交換は今までの方法と同様に2つのポー トにシリンジを刺せばよく(図 10)、容積が小さいため少量の培地で液交換をすることができ る。さらに、中央に中空糸膜が固定されているため、顕微鏡観察も非常に容易である(図 1p)。

このデバイス開発によって、世界で初めて胚に触れずに2細胞期を解凍し胚盤胞まで発生させ、しかも発生の様子を観察することに成功した。



図2. 胚に触れることなく解凍・洗浄・培養が可能なデバイス開発(フローズバック法:採用)

我々が開発した NECU は中空糸膜を使っている。この中空糸膜のポアサイズは 10nm し かないが、液体窒素で凍結する際に利用するガラス化凍結保存液はこのポアサイズであっ ても容易に通過できるため、中空糸膜内外の液交換が可能であり、凍結胚の解凍と培養が 可能だった。ところが、ISS の−95℃の冷凍庫を用いる場合、緩慢凍結用凍結保護剤を利用 しなければならない。そこで緩慢凍結用凍結保護剤を用いて実験したところ、この凍結液は 粘性が強すぎて、10nm のポアサイズは細かすぎて液交換に時間がかかり、全ての胚が解 凍時に死んでしまうことが明らかとなった。つまり本方法では ISS で実験できないことが判明 した。

そこで目の粗いメッシュシート(図 2a)で胚を入れるバックを作り(図 2b)、市販の Frozebag®(図 2c)を加工して、この中で凍結胚を解凍し、培養するデバイスを開発すること にした。ただしこのバックはガス透過性がないため、あらかじめCO2を最適化した培地(図 2d)を使うことにした。胚を入れたバックはスクープの上に乗せて(図 2e)、Frozebag®にスクー プごと入れて蓋をすることにした。非凍結胚で行ったところ、胚は無事培養できたことから、 容器に毒性は無いことが明らかとなった。ただし使用する培養液には、あらかじめ最適な CO2濃度および pH の状態にしておかなければならない。



そこで、次にそのような条件を満たす培養液の開発を行った。

図3. CZB 培地の CO₂分圧と pH の変化

本テーマで使用する最適培地を作るために、培地を5 mL容器に入れ、蓋を緩めた状態で CO₂インキュベーターに入れ(図3a)48時間まで放置し、経時的に培地内CO₂濃度およびpH を測定した(図3b)。その結果、24時間CO₂インキュベーター内に放置することで、4%以上の CO2濃度およびpH7.5程度の至適培養条件に達した。48時間後もこの状態は維持されていた。次にこれらの培地を使って、実際に凍結融解胚を密閉容器で培養してみた。培養液をCO2インキュベーターに入れず使用した場合、13%しか胚盤胞へ発生しなかったが、24時間あるいは48時間、培地をCO2インキュベーターに入れてから使用すれば、88%あるいは92%の胚が胚盤胞へ発生した(表1)。この培地を用いればISSの実験も可能になると思われた。 我々はこのCO2平衡化培地をOptC培地と命名した¹⁹。

さらに我々は、もしISSでCO₂インキュベーターが利用できない状況になっても本テーマを実行できるようにするため、CO₂を発生するアネロパウチ(図3c)を用いた検討も行った。袋の中に培地とアネロパウチを入れ(図3d)、経時的に培地へのCO₂の取り込みを測定したところ、わずか4時間で最適CO₂濃度になることが分かった(図3e)。この方法で作った培地を用いて、密閉容器内で胚を培養したところ、ほぼすべての胚が胚盤胞へ発生した。

表1. OptC 培地を用いた凍結融解胚の胚盤胞への発生率									
Equilibration period (h)	pH value	Partial	No. of	No. (%) of embryos retrieved		No. (%) of embryos			
	after	pressure	embryos			developed to			
	equilibration	of CO_2	vitrified			blastocyst			
0	8.018	1.41	18	15	(83.3)	2	(13.3)a		
24	7.403	4.57	40	40	(100)	35	(87.5)b		
48	7.374	4.92	40	38	(95)	35	(92.1)b		

Contro OptC medium f d e OptC Untreated Control n.s. medium medium Cdx2 Nanog 43.5 Blastocyst cells 0 0 0 0 00 0 0 0 0 0 DAPI 34.5 10.5 Cdx2 0 0 Control untreated OptC Control untreated OptC medium medium medium mediur Nanog

図4. OptC培地を用いて密閉容器で培養した胚の胚盤胞への発生率と産仔率

OptC培地を用いることで、ガス透過性のない密閉容器内で培養しても、胚は胚盤胞へ発

生できたが(図4a-c)、それらの胚盤胞が外見だけでなく機能面も正常なのか調べる必要が ある。そこで本実験で得られ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)への細胞分化を観察した(図4d)。青: DNA(DAPI)、赤: TE細胞(Cdx2)、緑: ICM細 胞(Nanog)。また細胞数も測定した(図4e)。Cdx2陽性(赤、TE)、Nanog陽性(緑、ICM)細胞 の数。OptC培地を用いた場合、密閉容器で培養しても従来法であるコントロールと同様の染 色像を示し、ICM(Nanog陽性)細胞数とTE(Cdx2陽性)細胞数およびICMの局在も正常だっ たが、未処理培地で培養した場合、染色像は悪く、細胞数はICMもTEも大きく低下した(図4e, f)。

胚盤胞の質の良し悪しを判定するもっとも強い方法は、それらの胚盤胞が産仔へ発育で きるかどうかである。そこで本方法で得られた胚盤胞をレシピエント雌に移植した結果、多数 の産仔を得ることが出来た(図4g, h)。産仔は正常な大人へ成長でき、次世代を産むこともで きた。これらの結果は、OptC培地を用いれば、たとえFrozebagなどの密閉容器でもインキュ ベーターを用いる従来法と同じ結果を出せることを意味している。



図5. ISS で使用可能な凍結胚の解凍培養デバイス、Embryo Thawing and Culturing device (ETC)の開発 これまでの予備実験で、メッシュシートを使えば粘性の高い凍結保存液であっても胚の流 出を防ぎながら液交換可能なこと、OptC 培地を用いればフローズバック内で胚盤胞まで培 養可能なことなどが分かってきた。しかしメッシュシートで作製したメッシュバックでは効率的 に液交換が出来なかったため、フローズバックのポートの内側にメッシュのキャップをつけて みた(図 5a)。だがこの方法では胚の流出が多かったため、いくつかの試行錯誤の末、メッシ ュシートを壁状にフローズバック内に圧着する方法を編み出した(図 5b)。この方法を用いる ことで、凍結融解胚を4日間培養することで胚盤胞を得ることに成功したが(図 5c)、凍結液 の洗浄が完全ではなく、発生率および胚盤胞の質は悪かった。そこで、胚を凍結するために 使用したクライオチューブの上部を切断し、最小のチューブ(V チューブ)を作製した(図 5d)。この方法により凍結保護剤の洗浄が効率よくできるようになった(図 5e)。我々はこのデ バイスを Embryo Thawing and Culturing device (ETC)と命名した。ETC を用いて発生したた くさんの胚盤胞(図 5f)。これらの胚盤胞を移植すれば産仔も得られる(図 5g)。予備実験を始 めた日から約10年の歳月を要したが、ついに、胚に一切触れずに、解凍、洗浄そして培養 が可能なデバイス「ETC」が完成した¹⁸。



図 6. ISS での実験に最適な2細胞期胚の探索

受精卵の凍結は、受精方法、凍結時期、体内からの回収時期などによって、解凍後の生存率や発生率に影響が出ることが知られている。そこで新デバイス ETC での凍結融解に最も適した 2 細胞期胚の最適条件を検討することにした。受精卵を 3 つの異なる方法(体内受精(in vivo)、体外受精(IVF)および顕微授精(ICSI))で作製した(図 6A)。 *in vivo* 受精胚は 2 細胞期の卵管から採取し、15 時に凍結した。他は 17 時に凍結した。それぞれの区における解凍後の胚の生存率は、IVF および ICSI 胚は 30-40%程度であり、*in vivo* 胚が有意に高かった(60%)(図 6B)。それらの胚を培養したところ、胚盤胞への発生率も *in vivo* 胚が一番高く、次いで IVF 胚だった(図 6C、D)。2C:2 細胞期。4-8C:4-8 細胞期。Mo:桑実期。Bla:胚盤胞。

しかし凍結融解はクライオチューブごとに技術などの影響が出るため、異なるチューブ間 で生存率や発生率を比較することは難しい。そこで、1本のクライオチューブに Tg マウス (GFP を発現)由来の *in vivo* 受精胚と Wild マウス由来の体外受精胚(GFP 陰性)、あるい はその逆の組み合わせで、2種類の胚を混ぜて凍結融解を行った(図 6E)。同ーチューブ内 で凍結融解した後の GFP 陽性と陰性の 2 細胞胚、および 3 日間培養して発生した胚盤胞 (図 6F)。この実験により手技的な影響ではなく、受精卵の質が胚の生存率および発生率に 影響していたことが確認できた。

最後に、*in vivo* 受精胚の場合、体内から回収する時期が胚の質に影響する可能性があることから、2 細胞胚の最適な採取時期と、凍結までの培養期間を調べることにした(図 6G)。その結果、交尾した翌日の 18 時に 2 細胞期胚を回収し、1 時間以内に凍結した胚の 生存率が一番高く(図 6H)、移植すればたくさんの健全な産仔が生まれることが分かった(図 6I)。本研究により、本テーマで使用する 2 細胞期胚は、体内受精で、交尾の翌日午後 6 時に回収し、7 時に凍結作業を行うことに決定した²⁰。



図7. ISS で使用する解凍液のガンマ線滅菌の影響

ISS への輸送には、すべての試料と道具の滅菌が必要である。しかし培養液はフィルター 滅菌をすることが出来たが、解凍液は粘性があるためフィルター滅菌できなかったため、ガ ンマ線滅菌(約 5000Gy)を行うことになった。ガンマ線滅菌の結果、解凍液はいずれも黄変 し、pH が低下したが、解凍後の胚の品質には影響しなかった。



図8. 輸送中の温度上昇を防ぐため、冷却バッグを開発した

凍結胚を入れた ETC は、液体窒素で冷却されたドライシッパーでフロリダの NASA に輸送されたが、打ち上げ中および実験が行われるまで ISS 内で−95℃の冷凍庫に保管される。 今回用いた高浸透圧ガラス化保存(High Osmolarity Vitrification: HOV)法は−80℃で凍結胚 を保存することができるが、短時間でも温度が上昇するとすべての胚が死滅してしまう。そこ で−95℃以下でもソフトで扱いやすいアルミ顆粒を充填した保冷バッグを開発した。この保冷 バッグは液体窒素中でも柔軟性があるため、液体窒素下で ETC をバッグに挿入することが できた。この保冷バックを用いることで、ISS で実験を行う際に、ETC を冷凍庫から実験室に 移動する間も安定した低温を維持することができるようになった。



図9. クライオチューブのかけらを ETC 内に入れて胚盤胞の変形を防いだ

ETC で解凍作業を行うとき、培地交換により袋の上下が密着する。おそらくそのため、凍結融解後に ETC から回収した胚の約半数が潰れてしまうことが分かってきた。そこで胚へ

の毒性が無いことが分かっているクライオチューブを細かく砕き、胚と一緒に ETC の中に入れてみた。その結果、破片を入れない場合は正常な形態の胚盤胞は 54%だったのに対して、破片を入れた場合は正常胚盤胞の割合が 81%にまで改善された(表 2)。

Experiment	No. of embryos vitrified	No. (%) of embryos retrieved	No. (%) of collected blastocysts from ETC	No. (%) of flattened blastocyst	No. (%) of relatively normal blastocysts
Control	142	69 (49)	48 (70)	22 (46)	26 (54)
Small pieces in ETC	202	146 (72)	97 (66)	18 (19)	79 (81)
Mimic the impact of landing on Earth	24	10 (42)	10 (100)	1(10)	9(90)

表 2. クライオチューブのかけらを ETC に入れることで、固定された胚盤胞のつぶれ防止効果、および ETC を 2 階から落下させた後の衝撃の影響

次に、帰還船が着水する際の衝撃で ETC が壊れる可能性や、内部の胚盤胞が砕ける可 能性が考えられた。そこで、これまでと全く同じ方法で ETC の胚を解凍し、4 日目に PFA 固 定した状態の ETC を研究室の 2 階から落としてみた。しかし ETC は壊れず、内部の胚盤胞 も正常な形態を維持していた(表 2)。

Waiting time between thawing solution 1 and 2	No. of embryos vitrified	No. (%) of embryos retrieved	No. (%) of embryos developed to blastocyst
4.5 min	200	106 (53)	48 (45.3)
8.5 min	160	67 (41.9)	29 (43.3)

表 3. 解凍プロトコルの合理化による宇宙飛行士の作業時間の短縮

ETC は、胚に触れずに解凍、洗浄および培養が可能だが、それぞれの工程でさまざまな 待ち時間がある。本番では宇宙飛行士に8個のETCの解凍を依頼するため、かなりの労 働時間を必要とすることになる。そこで、解凍液1と2の間の最も長い待ち時間である8.5分 を4.5分に減らしても解凍後の生存率および胚盤胞への発生率に影響がないか調べた。そ の結果、待ち時間を短くしても胚盤胞への発生率に影響がないことが明らかとなった(表 3)。



図10.0.99%PFA で固定し、1~3 か月間保存した後の胚盤胞の免疫染色

ISS で実験を行った後、帰還船が地球に到着するまで早くて1ヶ月、遅ければ3か月掛か る。その間、発生した胚をPFA で固定し、ISS で冷蔵保存しなければならない。しかし、ISS では4%PFA の使用には安全上の制約が大きいことから、0.99%PFA を使用することとなっ た。そこで、この濃度で胚を固定し、3ヶ月まで冷蔵保存しても解析に影響がないかを検討し た。(図 10A)0.99%PFA で固定した胚盤胞を1-2 時間後に PBS に交換し、1ヶ月間冷蔵保 存したもの。(図 10B)同様に3ヶ月間冷蔵保存したもの。それらの胚盤胞を免疫染色し、 ICM と TE の観察が可能か確認した。この実験により、0.99%という低濃度の PFA を用いて も、また固定後3か月間冷蔵保存しても免疫蛍光染色に影響はないことが明らかとなった。



図11. PFA固定した胚盤胞を用いて遺伝子発現解析を行うための脱クロスリンク方法の検 討

PFA 固定した胚盤胞を用いて網羅的遺伝子発現解析を行うためには、架橋反応によって 形成されたホルムアルデヒドとタンパク質の共有結合を分解しなければならない。通常は加 熱によって行われるが、本テーマで得られる試料は貴重であること、できる限り低温で行うこ とで人為的な影響を下げられること、および ISS から回収する試料の固定方法が特殊(上 述)であることから、最適な脱クロスリンク方法の検討を行った。

ISS での実験を想定し、0.99%PFA で固定し、1ヶ月間冷蔵保存した胚盤胞を、42 ℃また は 70 ℃で脱クロスリンク後、胚盤胞で発現していることが分かっている 2 つの遺伝子、 Pttg1 および Rpl4 について、発現を検出できるか調べた。(図11A)Pttg1 遺伝子(図11B) Rpl4 遺伝子。どちらの遺伝子でも、42℃で脱架橋を行った場合、たとえ 10 個の胚盤胞を用 いても PFA 固定した胚盤胞からの遺伝子発現は検出できなかった。しかし、70℃で脱架橋 を行うと、対象区である非固定胚盤胞の検出成績はやや低下してしまうが、PFA 固定した胚 盤胞 1 個からも遺伝子発現が検出された。

本実験により、ISS で得られた貴重な試料に対して、確実に遺伝子発現解析を行うことが 可能になった²¹。

(2) フライト実験準備フェーズ移行審査

2019 年 2 月、5 月に外部評価、内部評価を受審し、フェーズ移行を完了した。外部評価結 果を下記に示す。

> 2014年ライフサイエンス国際公募テーマ 「微小重力環境下での哺乳類初期胚の発生能について」 (代表研究者:山梨大学 若山照彦)

フライト実験準備移行にかかる外部評価 結果概要

標記テーマに関して、ライフサイエンス国際公募テーマ選定以降に実施された実験要求検 討結果を踏まえて、新たな実験計画が提案され、研究実施の実現性があると判断できる。この実験計画により選定時の付帯条件については解消された。

なお、以下の主な議論(①、②)と留意事項(③)へ対応しつつ、今後の実験準備を進めること。

① 1受精胚からでも必要な解析が可能となる解析技術の確立を目指すこと。

② サクセスクライテリアを再検討すること。

③ 安定して十分な数の受精卵の凍結・融解技術を確立すること。

平成31年2月22日 きぼう利用テーマ選考評価委員会 (生命医科学 委員長) ム ル 次月

(3) フライト実験準備

山梨大学において、2 細胞期のマウス受精卵を凍結し、ETC 内に入れ液体窒素温度環 境下で保存した。ISS での実験は、この ETC を微小重力環境で4個、人工1g環境で4個使 用するため、合計 8 個を打ち上げる。ロケットの打ち上げが延期になった場合、胚の質の低 下を避けるため、液体窒素で保存しておいたバックアップの ETC と交換する。打ち上げが4 回延期になった場合に備え、バックアップも4回分(8 個のETCを1セットとして4セット)作製 した。ドライシッパーを用いて液体窒素温度で NASA ケネディ宇宙センターに輸送し、打上直前に−95℃の冷凍庫に移して Dragon 貨物船で ISS に打ち上げた。



図12. 打ち上げ準備と回収、解析の流れ 上段は試料の準備から打ち上げまで。下段は宇宙での実験と回収、解析まで

4. 実験結果および成果

項目	結果	備考
1)胚盤胞の回収率	微小重力でも胚盤胞へ発生可能なこと	2 細胞期で停止した胚
	が初めて明らかとなった。	が多かった。
2)回収した胚盤胞の	微小重力区で発生した胚盤胞は正常	軌道上(µg,1g)は地上
解析		対照に比べて少ない
分化状態	微小重力環境が ICM への分化および	
	増殖に影響を与えない	
DNA ダメージ	微小重力環境で培養しても、地上に比	人工 1g区は、胚盤胞
	ベ DNA ダメージが増えることはない	の合計細胞数が大きく
		減少
異所性発現	微小重力のµg区では、異所性発現が	人工 1G 区は 0
	25%と多かった	
3)網羅的遺伝子発	宇宙 µgで特異的に発現に差のあった	他の区と異なる要素は
現解析	遺伝子を全て示した	見つからなかった

軌道上実験の結果まとめ

各々の結果を以下に示す。

1) 胚盤胞の回収率



図13. ISS の微小重力下における2細胞期胚の胚盤胞への発生について

全ての準備が整い、ISS で実験を開始した。(図 13A) 凍結前の 2 細胞期胚。(図 13B) 胚 はクライオチューブ(V 字チューブ:矢印)の底で凍結され、液体窒素中で ETC に入れ、ETC ごと液体窒素温度下でロケットに積み込む直前まで保存する。(図 13C)ETC には、溶液交 換用の 3 本のシリンジと廃液用のシリンジが接続される。(図 13D) 微小重力下での宇宙飛 行士による解凍作業の様子。(図 13E-G) 地上に回収後、ETC から回収した胚盤胞。地上コ ントロール(図 13E)、ISS の人工-1g(図 13F)、ISS の微小重力(図 13G)。<u>微小重力でも胚</u> 盤胞へ発生可能なことが初めて明らかとなった。

坦武	正 重力 胚粉 同		同业米					
场内	里刀	肛致	凹収致	異常胚	2-cell	3-4-cell	8-cell	胚盤胞
地球	1 g	360	134 (37.2)a	26 (19.4)	11 (8.2)a	9 (6.7)	6 (4.5)	82 (61.2)a
÷÷	人工 1 g	360	61 (16.9)b	5 (8.2)	29 (47.5)b	6 (9.8)	2 (4.9)	19 (31.1)b
于田	μg	360	72 (20.0)b	8 (11.1)	32 (44.4)b	10 (13.9)	5 (6.9)	17 (23.6)b

表4. ISS の微小重力環境下で培養したマウス初期胚の胚盤胞への発生成績

avs.b:p<0.01

ISS で行った微小重力区でも胚盤胞へ発生できることが確認され(23.6%)、その発生成 績は ISS の人工1G 区(31.1%)にくらべやや低かったが、有意差はなかった。しかし同時に 行った地上コントロール(61.2%)に比べ、ISS で行った実験区は微小重力区も人工1G 区も 有意に低下していた。ETC から回収した胚を調べると、宇宙で解凍した胚は、人工1g区も微 小重力区も2 細胞期で発生を停止している胚が多かった(図 14)。



図14. ETC から採取した死胚または異常胚 ISS で解凍した ETC から回収した胚は、人工 1gでも微小重力区でも、2 細胞期で発育を 停止している場合が多かったが(44-48%)。(図 14A)微小重力。(図 14B)人工-1g。

2)回収した胚盤胞の解析



図15. ISS の微小重力環境で発生した胚盤胞の品質

次に、ISS の微小重力環境下で発生した胚盤胞が、外見および質的に正常なのか確認し た。(図 15A-D) 胚盤胞の ICM および TE をそれぞれ Nanog 抗体および Cdx2 抗体を用いて 免疫染色したもの。(図 15A)地上コントロール、(図 15B)ISS 内で、遠心により作り出した人 エ-1 g 環境で培養したもの、(図 15C. D)ISS の微小重力環境下で培養したもの。(図 15D) NANOG が異所性発現した胚盤胞。NANOG 陽性細胞(ICM)は赤色、CDX2 陽性細胞(TE) は緑色。(図 15I) 胚盤胞の ICM 細胞数(赤棒)、TE 細胞数(緑棒)、全細胞数(青棒)。(図 15E-H) 胚盤胞の γ-H2A.x 陽性細胞と ICM 細胞を免疫染色したもの。 胚盤胞の種類は上 記と同じである。(図 15H)NANOG が異所性発現した胚盤胞。核は DAPI(青)、NANOG 陽性 細胞は赤色、γ –H2A.x 陽性細胞は緑色。(図 15J)NANOG の異所性発現を有する胚盤胞 の割合。X軸にある Dish は従来法で行った地上 1g区のコントロール(n=135)、ETC の1g 区は地上で ETC を使って行ったコントロール(n=146)、ETC の a1g 区は ISS の人工-1g(n =12)、ETC の μg区は ISS で実施した微小重力区(n=9)。(K)それぞれの実験区の胚盤胞 を1つずつ、合計 5 個を網羅的遺伝子発現解析(RNA-seq)し、発現プロファイルを主成分 分析した。Ground control は地上で行った1g、Artificial-1gは ISS で行った人工—1g、µg は ISS で行った微小重力区。1 点が1つの胚盤胞を示し、茶色は地上コントロール、赤は人 エ-1g、青は宇宙のµg。µg区は他の区の中心に位置していたことから、他の区と異なる要 素は見つからなかった。

これらの結果から、微小重力区で発生した胚盤胞は正常だと考えられる。

Place	Gravity	No. of examined blastocysts	Average no. of DAPI positive Cells	Average no. of Nanog positive cells ± SE (%)	Average no. of CcdX2 positive cells ± SE (%)
Earth	Ground-1 g	15	75.8	5.9±0.9 (8)	69.9±6.2 (92)
	Artificial-1 g	8	55.5	3.1±0.7 (6)	49.5±7.6 (89)
Space	μg	7	65.7	5.9±0.9 (9)	58.0±8.3 (88)

表 5. 胚盤胞の ICM と TE の平均細胞数

胚盤胞を免疫染色し、ICM および TE の細胞数を算出した。地上1g区の ICM(Nanog 陽性)は 5.9 個で、微小重力の μ g 区の 5.9 個と同じだった。したがって、<u>微小重力環境が ICM</u> への分化および増殖に影響を与えないことが分かった。しかし TE の細胞数は地上1g区の 方が宇宙 μ gよりやや多かった。一方宇宙で行った人工1g区は ICM、TE どちらも少なくなった。

Place	Gravity	No. of examined Blastocysts	Average no. of DAPI positive cell	Average no. of Nanog positive cells (%)	Average no. of γ H2AX positive cells±SE (%)
Earth	Ground–1 g	18	50.7	4(8)	22.1± (44)
Space	Artificial-1 g	4	24.7	1.8(7)	7±1.8 (28)
	μg	5	40.2	2.6(6)	18.4±4.0 (46)

表6. 胚盤胞の γ H2AX 陽性細胞とICM の平均細胞数

胚盤胞を γ H2Ax抗体および Nanog 抗体で免疫染色し、DNA 損傷度とICM の細胞数を 求めた。地上1g区の γ H2Ax陽性細胞数は 22 個で、宇宙 μ g区の 18 個と同程度だった。 ICM の細胞数も地上 1g区が 4 個、微小重力の μ g区の 2.6 個で差は少なかった。したがっ て、<u>微小重力環境で培養しても、地上に比べ DNA ダメージが増えることはない</u>ということが 分かった。一方宇宙で行った人工1g区は、胚盤胞の合計細胞数が大きく減少していた。

Place	Culture method	Gravity	No. of examined blastocysts	No. normal blastocysts	No. of blastocyst with ectopic expression of NANOG
Earth	ETC	Ground-1 g	157	146 (93.0)	11 (7.0)
Space	ETC	Artificial-1 g	12	12 (100)	0
Space	ETC	μg	12	9 (75)	3 (25)
Earth	Dish	1 g	144	135	9 (6.2)

表 7. 微小重力下で発生した胚盤胞における NANOG 細胞の異所性発現の発生率

胚盤胞の Nanog 陽性(ICM)の局在を調べた。ディッシュで培養した地上コントロールおよびETCを用いた地上1g区は、大部分の ICM が胚盤胞の中の 1 か所に集まっていたが、6 -7%の胚盤胞では Nanog 陽性の異所性発現が見られた。宇宙で行った人工1g区には 1 つもなかった。ところが微小重力の µg区では、異所性発現が 12 個中 3 個(25%)も見つか った。

表 8. 2 細胞胚をクリノスタットで3日または4日間培養したときの、胚盤胞の細胞数と分割 ICM を持つ胚盤胞の割合

Freeze- thaw	Culture periods	Gravity	No. of examined blastocyst s	Average no. of DAPI positive Cells	Average no. of Nanog positive cells ± SE (%)*	Average no. of CcdX2 positive cells ± SE (%)*	No. of blastocyst with ectopic expression of NANOG
		1 g	59	51.6	7.2±0.4 (14)b	44.4±2.6 (86)	4 (6.8)
Yes 4 days A	Artificial- µg	- 69	46.9	6.8±0.3 (15)b	40.1±2.3 (85)	5 (7.2)	
		1 g	39	45.2	5.5±0.5(12)	39.7±1.8 (88)	2 (5.1)
No 3 days	Artificial- µ g	- 50	39.8	4.4±0.3(11)	35.3±1.9 (89)	2 (4.3)	

Nanog 陽性(ICM)が胚盤胞の中で異所性発現した原因を調べるため、クリノスタットを用いた擬似微小重力でICMの異所性発現の発生率を調べた。また凍結が異所性発現の原因である可能性を調べるため、凍結の有無で比較した。しかしクリノスタット処理の有無、および凍結の有無に関係なく、どの実験区でも<u>1g環境では胚盤胞内で Nanog 陽性の異所性発現はほとんど見られなかった。</u>

Position of				Re	epetit	ion ni	umbei	r			Tatal
ICM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Iotai
Bottom	9	9	9	9	8	9	9	9	9	9	89
Middle	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	11
Upper	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表 9. 胚盤胞を培地中で自然落下させたときの ICM の位置

ISS の微小重力区だけで Nanog 陽性の異所性発現が観察されたことから、ICM が 1 か所 に集まるのは重力によるものである可能性が示された。しかし ICM と TE が同じ重さであれ ば重力の影響があっても ICM が一か所に集まる理由にならない。そこで 10 個の胚盤胞を それぞれ 10 回、培養液の上にそっと置き自然落下させ、ディッシュの底に落ちた時の胚盤 胞内の ICM の位置を上部、中部、および下部の 3 か所に分けて調べてみた。その結果、10 個すべての胚盤胞で、10 回の試み中 9 回程度の割合で ICM は胚盤胞の下側に位置して いた。この結果は、ICM は胚盤胞の中で比較的重いため、重力により下部の 1 か所に集ま った可能性を示している。



図16. RNA-seq 解析に用いた胚盤胞

胚盤胞を RNA-seq 解析に使用する前に写真撮影した。これらの胚盤胞は得られた試料の中から無作為に選択した。上段:地上1g。中断:宇宙の人工1g。下段:宇宙μg。

3) 網羅的遺伝子発現解析

Up regulated genes







Down regrated genes



図17. 宇宙のµg環境で発生した胚盤胞で検出された差次発現遺伝子

上述した図 15k で示した網羅的遺伝子発現解析において、宇宙 µgで特異的に発現に差のあった遺伝子を全て示した。

地上対照(C)、人工-1g(aG)、および µG。1つのバーは1つの胚盤胞を示す。上の5つ

のグラフは発現上昇遺伝子、下の8つのグラフは発現下降遺伝子を示す。

・研究目標に沿った成果

我々が開発した ETC は、史上初めてマウス初期胚を微小重力で解凍し胚盤胞まで培養できるデバイスであることが証明された。

本研究により微小重力で発生した胚盤胞は、最初の運命決定である ICM と TE への分化 は正常に行われ、NGS 解析による遺伝子発現も正常であることが確認された。ところが、微 小重力で発生した胚盤胞の 25%は ICM が 2 つに分離しており、ICM が胚盤胞の内部で細 胞塊を形成するためには重力が関与していた可能性が示された。

・目標外の成果

今後は着床後の胎児への発育を調べなければならない。そのためには ISS で胚盤胞を凍結し、地上に持ち帰り子供を産ませる実験が必要となる。

我々は今回の研究で宇宙デバイス開発のノウハウを得た。これをもとに開発を行えば、比較的簡単に次のデバイスが開発できるだろう。哺乳類の宇宙での生殖研究は、我々人類が将来宇宙で安全に繁栄できるのかを明らかにする重要な研究であり継続しなければならない。

サクセス レベル	クライテリア	自己評価
Minimum Success	軌道上でマウス初期胚の培養 を行って、サンプルを回収し、 微小重力環境と軌道上 1G 環 境による発生過程への影響を 確認する。	◎軌道上でのマウス初期胚培養に成功 し、回収したサンプルから、微小重力 環境と軌道上 1G 環境による発生過程へ の影響を確認できた。
Full Success	上記に加えて、軌道上から回 収した初期胚における遺伝子 発現等を比較すること。	◎回収した初期胚から RNA-seq 解析を 用いて胚盤胞のグローバルな遺伝子発 現プロファイルを解析して比較でき た。
Extra Success	初期胚発生への重力影響の原 因を明らかにする。 初期胚発生において胎児とな る内部細胞塊と胎盤となる栄 養外胚葉の分化の新しいメカ ニズムを提唱できること。 または、地上の胚培養技術の 実用化に貢献できること。	 ○宇宙µG区だけに内部細胞塊が2か 所に分離している胚が見つかった。重 力が無いと多胎になる危険性が初めて 示された。本研究は4つの論文として 発表した(成果リスト参照) ◎本研究で開発したデバイス「ETC」 は、胚操作技術が未収得な者でも胚の 解凍と培養を可能にすることから、不 妊治療クリニックや実験動物施設に大 きな貢献をすると思われる(特許取 得。成果リスト参照)

サクセスクライテリアの達成度

5. 結言

本研究により、哺乳類の初期胚が ISS 内の微小重力環境下でも胚盤胞期まで発生でき、 最初の運命決定である ICM と TE へ正しく分化できることが確かめられた。網羅的な遺伝子 発現解析でも、宇宙OG 区の胚盤胞は正常な遺伝子発現をしていることが確かめられた。し かし本当に正常な胚盤胞であることを調べるためには、胚盤胞から産仔を産ませなければ ならない。将来的には、ISS で発生した胚盤胞を ISS 内で再凍結し、地上に持ち帰り、レシピ エント雌の子宮へ移植して子供を産ませる研究も行う必要がある。

一方、今回の研究では、ICM が 2 か所に分離している胚盤胞が微小重力区で発生した胚の 25%で観察され、一卵性双生児の出現頻度が高まる可能性が示された。しかし残念なが ら本研究では、ETC から回収できた胚盤胞の数が少なく、解析項目が限定された。このた め、より多くの胚を ISS で胚盤胞へ発生させ、その品質を多面的に調べる必要がある。

この研究のために開発した ETC は、胚に一切触れずに誰でも胚の解凍と培養ができる画 期的な世界初のデバイスである(特許取得)。しかし、地上でのリハーサルでも100%の胚を 回収することは出来ない等の課題がある。すべての胚を回収でき、胚盤胞へ発生させること ができるデバイスを開発することが出来れば、今後の宇宙実験でより多くの胚盤胞を得ら れ、信頼性の高い証拠を出すことが可能になる。また、改良されたデバイスを使うことで、畜 産分野で行われている受精卵移植や、実験動物施設で遺伝子改変マウスを作製するとき に、経験の浅い技術者でも胚を無くさずに扱うことができるようになる。さらに改良が進み不 妊治療クリニックで利用されるようになれば、高度な技術を持った胚培養士などの人材不足 を補えるようになることが期待される。

[参考文献]

- 1 Wakayama, S. *et al.* Evaluating the long-term effect of space radiation on the reproductive normality of mammalian sperm preserved on the International Space Station. *Sci Adv* **7**, eabg5554 (2021). <u>https://doi.org:10.1126/sciadv.abg5554</u>
- Wakayama, S. *et al.* Healthy offspring from freeze-dried mouse spermatozoa held on the International Space Station for 9 months. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, 5988-5993 (2017). <u>https://doi.org:10.1073/pnas.1701425114</u>
- Aimar, C. *et al.* Microgravity and hypergravity effects on fertilization of the salamander Pleurodeles waltl (urodele amphibian). *Biol Reprod* 63, 551-558 (2000).
 https://doi.org:10.1095/biolreprod63.2.551
- 4 Ijiri, K. Ten years after medaka fish mated and laid eggs in space and further preparation for the life-cycle experiment on ISS. *Biol Sci Space* **18**, 138-139 (2004).
- Schatten, H. *et al.* Effects of spaceflight conditions on fertilization and embryogenesis in the sea urchin Lytechinus pictus. *Cell Biol Int* 23, 407-415 (1999).
 https://doi.org:10.1006/cbir.1999.0371
- 6 Serova, L. V. [Effect of weightlessness on the reproductive system of mammals]. *Kosm Biol Aviakosm Med* 23, 11-16 (1989).
- Souza, K. A., Black, S. D. & Wassersug, R. J. Amphibian development in the virtual absence of gravity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1975-1978 (1995).
 https://doi.org:10.1073/pnas.92.6.1975
- 8 Tash, J. S., Kim, S., Schuber, M., Seibt, D. & Kinsey, W. H. Fertilization of sea urchin eggs and

sperm motility are negatively impacted under low hypergravitational forces significant to space flight. *Biol Reprod* **65**, 1224-1231 (2001). <u>https://doi.org:10.1095/biolreprod65.4.1224</u>

- 9 Ubbels, G. A., Berendsen, W. & Narraway, J. Fertilization of frog eggs on a Sounding Rocket in space. *Adv Space Res* **9**, 187-197 (1989). <u>https://doi.org:10.1016/0273-1177(89)90073-2</u>
- 10 Amann, R. P. *et al.* Effects of microgravity or simulated launch on testicular function in rats. *J Appl Physiol* **73**, 174S-185S (1992).
- 11 Fedorova, N. Spermatogenesis of the dogs. Ugolyok and Veterok after their flight on board the satellite Kosmos 110. *Kosm. Biol. Med* **1**, 28 (1967).
- 12 Philpott, D. E. *et al.* Reduction of the spermatogonial population in rat testes flown on Space Lab-3. *The Physiologist* **28**, S211-212 (1985).
- 13 Sapp, W. J. *et al.* Effects of spaceflight on the spermatogonial population of rat seminiferous epithelium. *Faseb J* **4**, 101-104 (1990).
- 14 Serova, L. V. & Denisova, L. A. The effect of weightlessness on the reproductive function of mammals. *Physiologist* 25, S9-12 (1982).
- Zhang, S. *et al.* Simulated Microgravity Using a Rotary Culture System Compromises the In Vitro Development of Mouse Preantral Follicles. *PloS one* 11, e0151062 (2016).
 <u>https://doi.org:10.1371/journal.pone.0151062</u>
- 16 Lei, X. H. *et al.* Development of mouse preimplantation embryos in space. *National Science Review* 7, 1437-1446 (2020). <u>https://doi.org:10.1093/nsr/nwaa062</u>
- Wakayama, S. *et al.* Detrimental effects of microgravity on mouse preimplantation
 development in vitro. *PLoS One* 4, e6753 (2009). <u>https://doi.org:10.1371/journal.pone.0006753</u>
- Wakayama, S. *et al.* Development of a new device for manipulating frozen mouse 2-cell embryos on the International Space Station. *PLoS One* **17**, e0270781 (2022).
 <u>https://doi.org:10.1371/journal.pone.0270781</u>
- 19 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). <u>https://doi.org:10.1371/journal.pone.0260645</u>
- 20 Hayashi, E. *et al.* Mouse in vivo-derived late 2-cell embryos have higher developmental competence after high osmolality vitrification and -80 degrees C preservation than IVF or ICSI embryos. *J Reprod Dev* 68, 118-124 (2022). https://doi.org:10.1262/jrd.2021-115
- Wakayama, S. *et al.* Effect of microgravity on mammalian embryo development evaluated at the International Space Station. *iScience* 26, 108177 (2023).
 https://doi.org:10.1016/j.isci.2023.108177

[成果リスト] (英語論文)

1. Wakayama S, Kikuchi Y, Soejima M, Hayashi E, Ushigome N, Yamazaki C, Suzuki T, Shimazu T, Yamamori T, Osada I, Sano H, Umehara M, Hasegawa A, Mochida K, Yang LL, Emura R, Kazama K, Imase K, Kurokawa Y, Sato Y, Higashibata A, Matsunari H, Nagashima H, Ogura A, Kohda T, <u>Wakayama T.</u> Effect of microgravity on mammalian embryo development evaluated at the International Space Station. iScience. (IF:5.8) 2023 Oct 27;26(11):108177.

2. Wakayama S, Soejima M, Kikuchi Y, Hayashi E, Ushigome N, Hasegawa A, Mochida K, Suzuki T, Yamazaki C, Shimazu T, Sano H, Umehara M, Matsunari H, Ogura A, Nagashima H, <u>Wakayama T.</u> Development of a new device for manipulating frozen mouse 2-cell embryos on the International Space Station. PLoS One. (IF:3.7) 2022 Oct 7;17(10):e0270781.

3. Hayashi E, Wakayama S, Ito D, Hasegawa A, Mochida K, Ooga M, Ogura A, <u>Wakayama T.</u> Mouse in vivo-derived late 2-cell embryos have higher developmental competence after high osmolality vitrification and -80°C preservation than IVF or ICSI embryos. J Reprod Dev. (IF; 2.2) 2022 Apr 1;68(2):118-124. doi: 10.1262/jrd.2021-115.

4. Kikuchi Y, Wakayama S, Ito D, Ooga M, <u>Wakayama T.</u> Optimised CO2-containing medium for in vitro culture and transportation of mouse preimplantation embryos without CO2 incubator. PLoS One. (IF:3.8) 2021 Dec 23;16(12):e0260645.

(和文総説) 雑誌の記者による記事。「マウスの胚は無重力の宇宙で発生できる!?」若山照彦教授に 聞く。 化学 2024 年。79 巻 1 月号。ページ 72。

(受賞歴)なし

(特許)

若山照彦、若山清香、鈴木智美、山崎千秋 「凍結卵培養装置及び凍結卵の培養方法」2020 年7月28日、特願2020-127635 公開番号: EP4174163 公開日: 2023/05/03 出願番号: 21849563.8 (2021/07/28) 海外; Publication: May 5, 2023 "Frozen egg cultivation apparatus, and method for cultivating frozen eggs" International application number: PCT/JP2021/027820. International publication number: WO2022/025092

(報道) 読売新聞 2021 年 8 月 21 日 朝日新聞 2023 年 10 月 28 日 日経新聞 2023 年 10 月 28 日 共同通信 2023 年 10 月 28 日 山梨日日新聞 2023 年 10 月 31 日 読売新聞 2023 年 11 月 9 日 そのほか地方新聞 テレビ放映 NHK 2021 年 9 月 13 日 NHK 2023 年 10 月 28 日

海外の多数のメディアにより、Web で紹介された。



2024年度 ISS・きぼう利用ミッション科学成果評価結果

微小重力下での哺乳類初期胚の発生能について (Space Embryo) 研究代表者 : 若山 照彦 (山梨大学)

総合評価

A: 目標を充分に達成した(フルサクセス相当)

本研究では、哺乳類の初期胚が宇宙環境においても胚盤胞まで生育が可能であること を示し、かつ、扱いが困難な凍結初期胚の解凍と培養を可能にする新規デバイスを開発 し、その有用性を実証した。本研究における成果は今後の医療や畜産の分野に活用され ることが期待できる。ただし、宇宙実験で胚盤胞の回収率をさらに高める方法の検討を いただきたい。

本研究において、微小重力環境において胚盤胞の発生が起こることを示したことは高く評価できる。研究結果に関する論文の発表も十分に行われているが、一方で本実験での回収試料数の少なさや網羅的遺伝子発現解析等のデータ不足により明らかになっていない、内部細胞塊(ICM)の分離のメカニズムや初期胚以降の発生過程への重力影響についてさらに考察を深め、検証可能な作業仮説を立案し、現在、研究プロジェクト移行審査の準備作業を進めているフラグシップミッションにその成果を活かしていくことに期待する。

2024年7月29日

きぼう利用テーマ選考評価委員会(生命医科学)

きぼう利用テーマ

微小重力環境下での哺乳類初期胚の発生能について<u>(Space Embryo)</u> 研究成果概要書

研究代表者;若山 照彦(山梨大学)

2024年5月

1. 背景

将来、月面基地やスペースコロニーなどが建設され永住する時代が来た時、人類だけで なく家畜やペットの繁殖も必要になるが、哺乳類が宇宙の無重力環境で子供を作れるのか わかっていない。しかしマウスなどの哺乳類をISSで長期間飼育することは困難なこと、 卵子や初期胚は非常に小さく取り扱いが難しいことから、宇宙生殖研究はメダカやイモリ が用いられていた。だが哺乳類は、胎盤を作り母体内で発育する独特の生殖方法を用いて おり、哺乳類の宇宙生殖を調べるためには、哺乳類を用いた研究が不可欠である。

また、哺乳類の受精卵は、受精後3~4日後に将来胎盤になる栄養外胚葉(TE)と胎児 へ発育する内部細胞塊(ICM)の2種類に分化する。だが、この最初の分化がどのように して決定されるのか、ICMが1か所に集まるメカニズムは何かなど、まだ明らかになって いないことは多い。もし最初の分化やICMの局在に地球の重力が関与している場合、微小 重力の宇宙では、初期胚は正常に発生できない可能性がある。そこで本研究では、受精卵 を-80℃で凍結保存でき、特別な練習をすることなしに胚を解凍して培養することが可能 な新しいデバイスを開発し、ISSへ打ち上げて、微小重力での胚培養実験を行った。 2.研究方法



ISSで8個のETCを解凍し、4 つは微小重力で培養し(宇宙 μG区)、残りの4つは「きぼう」 日本実験棟内に設置してある人 エ1G発生装置に入れ培養した (宇宙1G区)。ほぼ同じ時刻に 筑波宇宙センターでも4つの ETCを解凍して培養した(地上 1G区)。培養開始から4日後、 ETCへ低濃度ホルマリンを注入 して胚を固定し、冷蔵庫で約3 週間保存後に帰還船に載せて地 球に戻した(図1)。

3. 結果

地上で行ったコントロール実験(地上1G区)では、回収できた胚のうち82個(61.2%) が胚盤胞へ発生していた。ISSで行った実験では、宇宙1G区で19個(31.1%)が胚盤胞へ 発生していただけでなく、宇宙μG区でも17個(23.6%)が胚盤胞へ発育していた(図2G)。



図2. ISSでマウス凍結2細胞期胚を胚盤胞まで培養。A:凍結前の2細 胞期胚。B-D:ETCを使って宇宙で胚を培養。E-G:ETC内で発生した胚盤 胞。E:地上1G。F:宇宙1G。G:宇宙の微小重力。



図3. 手面で発生した胚盤胞の正常性。A-D: ICMとTEを架色したもの。E-H: 細胞のDNA損傷を調べたもの。I: ICMとTEの細胞数。J: ICMが 分離した胚の割合。K: NGS解析の主成分分析。

宇宙uG区で発生した胚盤胞の うち12個を使って、ICMとTEへ の分化やDNA損傷率を調べたと ころ、

宇宙 1 G区および

地上 1 G 区の結果とほぼ一致し、胚盤胞 の品質に差はないことが明らか となった(図3)。宇宙µG区の残 りの5個の胚盤胞は、1つずつ分 けて網羅的遺伝子発現解析を行 ったが、宇宙1G区および地上1G 区と有意に変化した遺伝子発現 は見られなかった。しかし、宇 宙μG区の胚盤胞を詳しく観察し たところ、ICMが2か所に分離し ている胚盤胞が12個中3個(25%) 見つかった。宇宙1G区および地 上1G区では、ICMが分離してい る胚は6~7%だった。

4. 考察

この研究のために我々は、胚 に一切触れずに誰でも胚の解凍 と培養が出来る世界初のデバイ スETCを開発した。今後、すべ ての胚を回収でき、胚盤胞へ発 生させることが出来るようにな れば、未熟な技術者でも胚を扱 えるようになることから、不妊 治療クリックや研究機関の実験 動物施設、さらには畜産分野で このETCは使われるようになる だろう。

本研究により、哺乳類の初期 胚が胚盤胞へ発育し、ICMとTE へ正しく分化するためには、重 力は関与していないことが明確 に証明された。一方、微小重力 で発生すると、ICMが2か所に分

離する胚盤胞の割合が少し高くなっていた。一般的に、ICMが胚盤胞の中で分離すると一 卵性双生児になると考えられている。したがって、宇宙の微小重力で胚が発生すると、一 卵性双生児として生まれる可能性が高くなることが示された。しかし残念ながら本研究で は、ETCから回収できた胚盤胞の数が少なく、実施できた解析が限定的であった。今後は、 ETCを改良し、もっとたくさんの胚をISSで胚盤胞へ発生させ、人類が宇宙で健康な子供 を作れるのか明らかにしていきたい。

Summary report of the ISS-Kibo utilization mission, "Early mammalian embryogenesis under uG in space (Space Embryo)" Principal Investigator, Teruhiko Wakayama (Univ. Yamanashi) 2024/May

[Introduction] If a lunar base or space colony is built and humans live permanently in space in a future day, it will be necessary to reproduce not only humans but also livestock and pets, but it is not known whether mammals can reproduce in the microgravity environment of space. Because it is difficult to keep mammals such as mice on the ISS for long periods of time, and because preimplantation embryos are very small and difficult to handle, medaka and newts have been used in space reproductive experiments so far. However, since mammals use a unique reproductive method in which the placenta is produced from the embryo and the fetus develops within the uterus of the mother, studies in mammals are essential to investigate space reproduction in mammals.

In addition, three to four days after fertilization, embryos differentiate into two types: a trophectoderm (TE), which will become the placenta later, and an inner cell mass (ICM), which will develop into a fetus. There are still many unknowns, such as how this initial differentiation is determined and what the mechanism is for the ICM to gather in one place. If Earth's gravity is involved in the initial differentiation and localization of the ICM, it may be impossible for early embryos to develop normally in the microgravity of space. In this study, we developed a new device "ETC" that can freeze and preserve mouse 2-cell embryos at -80°C and thaw and culture embryos without special training and then launched



Figure 1. Mouse 2-cell stage embryos cultured to blastocyst on ISS. (A) 2cell stage embryo before freezing. (B-D) Embryos thawed and cultured in space using ETC. (E-G) Blastocyst developed in ETC. (E) 1G on ground. (F) 1G in space. (G) Microgravity in space.

it to the ISS to conduct an embryo culture experiment in microgravity.

[Method] Eight ETCs were thawed on the ISS, four were cultured in microgravity (Space micro-G), and the remaining four were cultured in the artificial 1G generator installed in the Japanese "Kibo" experiment Module (space 1G). At about the same time, four ETCs were also thawed and cultured at the Tsukuba Space Center (ground 1G). Four days after the start of culture, 0.99% PFA was injected into the ETCs to fix the embryos, and they were



stored in a refrigerator for about three weeks before being returned to Earth.

[Results] In the ISS experiment, not only 19 (31.1%) embryos developed into blastocysts in the space 1G, but also 17 (23.6%) embryos developed into blastocysts in the space micro-G (Fig. 1). In 12 of the blastocysts developed in the Space micro-G, we examined differentiation into ICM and TE and DNA damage and found no difference in

blastocyst quality compared to the results from the Space 1G and ground 1G (Fig. 2). The remaining 5 blastocysts from the space micro-G were subjected to next generation sequence analysis, which showed no significant difference in gene expression between the space 1G and ground 1G. On the other hand, space micro-G revealed 3 out of 12 (25%) blastocysts with the ICM separated in two places. In contrast, in the space 1G and ground 1G, 6 to 7% of the blastocysts had separated ICMs.

[Discussion] For this study, we have developed the world's first device, ETC, which allows anyone to thaw and culture embryos without touching them at all. In the future, when all embryos can be retrieved from ETCs and developed into blastocysts, even inexperienced technicians will be able to handle embryos, and this ETC will be used in fertility clinic, laboratory animal facilities in research institutions, and even in the livestock breeding.

This study clearly demonstrates that gravity is not necessary for early mammalian embryos to develop into blastocysts and differentiate correctly into ICMs and TEs. However, when the embryo developed in microgravity, the percentage of blastocysts that separated into two ICMs was slightly higher. It is generally believed that when ICM separate in a blastocyst, they become identical twins. Therefore, it was shown that when embryos develop in the microgravity of space, the likelihood of them becoming identical twins increases. Unfortunately, the number of blastocysts retrieved from ETCs in this study was small, limiting the analyses that could be performed. In the future, we would like to improve the ETC and develop more embryos into blastocysts on the ISS to clarify whether humans can have healthy children in space. 2024年度 ISS・きぼう利用ミッション科学成果評価結果

別紙2-2

臓器連関の視点から解き明かす加齢性筋骨格系疾患の発症機構 (Neurovascular & interorgan network/ MHU-7)

代表研究者:佐藤信吾(東京科学大学)

総合評価

A:目標を十分に達成した(フルサクセス相当)

本研究の目的は、微小重力環境が、筋肉・骨組織での感覚神経・血管系に与え る影響を、組織の構造・機能的および遺伝子学的な手法を用いて解析すること、 および重力環境の変化によって変動する血中miRNAに着目した加齢性疾患の発症 メカニズムの解明である。実験制約下において軌道上固定サンプルでの筋骨格系 の神経および血管の可視化に成功し、微小重力飼育下での神経の量的変化が骨量 低下に関与する可能性を示したことは高く評価する。臓器連関の視点では、重力 環境の変化によって変動する血中miRNAを同定し、筋骨格系組織への影響を評価 した。今後これらのmiRNAの由来臓器が見いだされることを期待したい。 なお、軌道上の変化と加齢現象および加齢性疾患の関連性については、さらに慎 重に考察していただきたい。

一方、本研究により得られた主要な成果が未公表であり、分野コミュニティの 評価を得るためにも、早期に論文として纏め、公表を行うことを強く推奨する。

2025年3月6日

きぼう利用テーマ選考評価委員会(生命医科学)

きぼう利用テーマ 「臓器連関の視点から解き明かす加齢性筋骨格系疾患の発症機構」 研究成果概要書

代表研究者:佐藤 信吾(東京科学大学)

2024年12月

(背景と目的)

日本は超高齢社会を迎え、加齢性疾患が顕著に増加している。生体の重要な支持臓器である 筋骨格系においても、骨粗鬆症やサルコペニアといった加齢性疾患が急増している。筋骨格系は 成人体重の40~50%を占める重要な臓器であり、その機能障害は身体活動の著しい低下を招き、 時に寝たきりの原因となる。我が国における健康寿命の延伸を目指す上で、筋骨格系加齢性疾 患の詳細な病態解明と、新規治療薬の開発は喫緊の課題である。

宇宙微小重力環境が骨組織・筋組織の神経・血管系に与える影響の解明

宇宙微小重力環境では、地上での加齢性変化が加速し、中でも骨量の低下ならびに骨格筋の 萎縮は著しい。筋骨格系の恒常性維持において、メカニカルストレスを正しく感知し、骨組織や筋 組織に情報を伝達することが重要であるが、そのメカニズムの詳細は未だ明らかになっていない。 研究代表者らのグループは、これまでに、神経系や神経ペプチドによる骨代謝調節機構に着目し た研究を世界に先駆けて進めてきた(佐藤ら Nat Med 2007、藤田・越智ら Nat Med 2012)。ま た、2013 年には、感覚神経の骨組織内への投射が骨量の維持に重要であることを世界に先駆 けて報告した(福田・越智ら Nature 2013)。この知見は、感覚神経が骨恒常性の維持に重要な 役割を担っていることを個体レベルにおいて世界で初めて明らかにしたものである。さらに近年、 研究代表者らは、メカニカルストレスの減少により骨組織の神経系および血管系に量的・質的変 化が認められることを見出しており、メカニカルストレスによる筋骨格系恒常性維持機構において、 神経系および血管系が重要な役割を担っていることが示唆される。そこで本研究では、宇宙微小 重力環境が筋骨格系組織の神経・血管系に与える影響を組織学的・分子生物学的手法を用いて 検討し、メカニカルストレスによる筋骨格系恒常性維持ならびに筋骨格系加齢性疾患の発症・進 行における神経・血管系の役割を明らかにすることを1つ目の目的とした。なお、研究代表者らは、 神経・血管系の詳細な構造を三次元的に解析するために、独自の筋骨格系透明化技術の開発を 進めており(佐藤・越智ら Sci Rep. 2023)、従来通りの組織学的解析に加え、組織透明化技術を 用いた解析も実施した。

宇宙微小重力環境が血中分泌型マイクロ RNA に与える影響の解明

一方で、骨や筋肉は内分泌臓器の1つとして全身の臓器と代謝ネットワークを形成していること も明らかとなってきている。実際、筋骨格系の加齢性疾患を有する患者は、認知症や心血管障害 などの全身性の加齢性疾患を併発していることが多く、これらの事実は、加齢や老化に関連する 何らかのシグナルが、筋骨格系あるいは全身性の加齢性疾患の発症や進行に関与している可能 性を示唆している。近年、タンパク質をコードしない小分子 RNA であるマイクロ RNA(以下、 miRNA)がエクソソームに含まれた状態で細胞から血液中に分泌され、ホルモンのような形で他 の臓器の機能を調節していることが相次いで報告され、新たな臓器間情報伝達因子としての分泌 型 miRNA が注目されている。研究代表者らは miRNA に関する研究もこれまで精力的に進めて おり、miRNA が個体レベルで骨芽細胞分化を調節することを世界に先駆けて報告したほか(猪 瀬・佐藤ら **PNAS** 2009)、がん細胞由来の分泌型 miRNA が骨転移微小環境において骨芽細胞 や破骨細胞の分化を調節することも見出した(橋本・佐藤・越智ら **PNAS** 2018)。これまで重力 やメカニカルストレスと関連のある miRNA を同定したという報告はほとんどなく、本研究では宇宙 実験で得られた血漿サンプルの網羅的発現解析を通じて、重力環境の変化によって変動する血 中分泌型 miRNA を同定し、臓器連関の視点から、同定した miRNA が筋骨格系組織や他臓器 の代謝調節に与える影響を明らかにすることを2つ目の目的とした。

(宇宙実験の概要)

6 匹の Sox10-Venus マウス(神経線維が緑色蛍光を発現する遺伝子改変マウス)を ISS に打ち上げ、宇宙微小重力環境での軌道上飼育を実施した。全てのマウスにおいて、健康上の問題なく飼育が継続された。3 週間の飼育継続後、NASA との国際協力のもと、閉胸心採血および軌道上解剖(片側後肢採取)が実施され、後肢の軌道上化学固定にも成功した。すべての試料は、冷凍保管の上、地上へと回収された。

(研究成果)

宇宙微小重力環境が骨組織・筋組織の神経・血管系に与える影響の解明

骨量および筋肉量の解析を実施したところ、フライト群では地上対照群と比較して、大腿骨・脛 骨の海綿骨量が有意に低下していること、ヒラメ筋・足底筋の筋重量が有意に低下していることを 明らかにした。骨組織および筋組織の透明化解析ならびに組織学的解析を実施した結果、フライ ト群では地上対照群と比較して骨内神経の減少が認められた。一方、骨内の血管については量 的変化が認められなかった。

メカニカルストレスによる骨恒常性維持機構における骨内神経の役割をさらに明らかにするために追加の地上実験も実施した。CGRP の持続投与で尾部懸垂による骨量低下が抑制されること、外科的除神経や感覚神経の不活性化により再荷重後の骨量回復が抑制されること、などが明らかとなり、宇宙実験の結果もふまえ、骨内神経が重力環境やメカニカルストレスなどの外的刺激を感知し骨代謝を調節している可能性が示唆された。

宇宙微小重力環境が血中分泌型マイクロ RNA に与える影響の解明

血漿検体を用いた分泌型 miRNA の網羅的発現解析を実施し、重力環境の変化によって変動 する miRNA を計 25 種類検出した。さらに、老齢マウス群と若年マウス群の血中 miRNA の発現 プロファイル比較も行い、老化・加齢にも関与しうる計 5 種類の miRNA の同定に成功した。

同定した miRNA の生理作用について検討したところ、2 種類の miRNA が標的遺伝子の発現 調節を介して骨芽細胞および筋芽細胞の分化を抑制することが明らかとなった。また、同定した miRNA と老化・加齢との関連性を文献的に明らかにした。さらに、うち 1 種類の miRNA は肝臓 特異的に発現している miRNA であり、宇宙微小重力環境では血中への分泌が亢進し、筋骨格系 組織に作用して骨分化や筋分化を抑制している可能性が示唆された。更なる検証が必要である が、「肝-骨連関」というこれまでにあまり報告のない新しい臓器連関の仕組みが明らかとなった。

Summary report of the ISS-Kibo utilization mission "Elucidating the underlying mechanism of age-related musculoskeletal disorders from the viewpoint of inter-organ communication network" Principal Investigator: Shingo Sato, Institute of Science Tokyo December, 2024

(Background and Objectives)

Japan has become a hyper-aged society, and the number of patients with age-related diseases is increasing markedly. Age-related diseases such as osteoporosis and sarcopenia are rapidly increasing in the musculoskeletal system, an important support organ of the body. The musculoskeletal system is an important organ that accounts for 40-50% of the adult body weight, and dysfunction of this system leads to a marked decline in physical activity, sometimes causing bedridden. In order to extend healthy life expectancy in Japan, elucidating the underlying mechanism of age-related musculoskeletal disorders and developing new therapeutic agents are urgent issues.

Influence of space microgravity environment on neurovascular system of musculoskeletal tissue

The space microgravity environment accelerates age-related changes on the ground, especially bone loss and skeletal muscle atrophy. In order to maintain homeostasis of the musculoskeletal system, it is important to correctly sense mechanical stress and transmit signals to bone and muscle tissues, but the details of this mechanism have not yet been clarified. Our group has advanced studies focusing on the regulatory mechanisms of bone metabolism by the nervous system and neuropeptides (Sato et al. Nat Med 2007, Fujita & Ochi et al. Nat Med 2012). In 2013, we also reported that the projection of sensory nerves into bone tissue is important for the maintenance of bone mass (Fukuda, Ochi, et al. Nature 2013). This finding was the first in the world to demonstrate that sensory nerves play an important role in bone homeostasis at the individual level. Furthermore, we have recently found that a decrease in mechanical stress induces quantitative and qualitative changes in the nervous and vascular systems of bone tissue, suggesting that the neural and vascular systems play an important role in the mechanism of musculoskeletal homeostasis regulated by mechanical stress. The first objective of this study is to investigate the effects of space microgravity on the nervous and vascular systems of musculoskeletal tissues using histological and molecular biological analyses, and to clarify the role of the neurovascular system in mechanical stress-regulated musculoskeletal homeostasis and in the onset and progression of musculoskeletal aging-related diseases. In order to analyze the detailed threedimensional structure of the neurovasculature, we used a novel musculoskeletal tissue clearing technique, which was originally established in our group (Sato, Ochi, et al. Sci Rep. 2023).

Influence of space microgravity environment on blood-circulating secretory microRNAs

It has recently become clear that bone and muscle tissues, as endocrine organs, form a metabolic network with other organs in the body. In fact, patients with age-related diseases of the musculoskeletal system often suffer from systemic age-related disorders such as dementia and cardiovascular diseases. These facts suggest that some blood-circulating factors related to aging or senescence may be involved in the onset and progression of musculoskeletal or systemic age-related diseases. In recent years, it has been successively reported that microRNAs (miRNAs), small RNA molecules that do not encode proteins, are secreted from cells into the blood in the form of exosomes and regulate the functions of other organs as an inter-organ signaling factor. We have also been conducting research on miRNAs and have reported that miRNAs regulate osteoblast differentiation at the individual

level (Inose, Sato, et al. **PNAS** 2009) and that miRNAs secreted from cancer cells regulate osteoblast or osteoclast differentiation in the bone metastasis microenvironment (Hashimoto, Sato, Ochi et al. **PNAS** 2018). So far, there have been few reports regarding the identification of miRNAs associated with gravity and mechanical stress. The second objective of this study is to identify blood-circulating secreted miRNAs whose expression was altered by changes in the gravitational environment through comprehensive expression analysis of blood samples obtained from the space experiment, and to clarify the influence of the identified miRNAs on the function of musculoskeletal tissues or systemic organs from the viewpoint of inter-organ network.

(Outline of the space experiment)

Six *Sox10-Venus* mice, genetically modified mice whose nerve fibers were labeled with Venus green fluorescence, were launched to the ISS and bred in the space microgravity environment. All mice were bred without any health problems. After 3 weeks of breeding, cardiac blood sampling and dissection were performed in the international collaboration with NASA, and chemical fixation of unilateral hindlimbs was also successfully performed. All samples were frozen and returned to the ground.

(Research results)

Influence of space microgravity environment on neurovascular system of musculoskeletal tissue

As the result of the analyses of bone mass and muscle weight, we revealed significantly lower trabecular bone mass in the femur and tibia and significantly lower muscle weight in the soleus and plantaris in the flight group compared to the ground control group. Tissue clearing and histological analyses revealed a decrease in nerves inside bone in the flight group compared to the ground control group. On the other hand, no quantitative changes were observed for blood vessels inside bone.

To further elucidate the role of nerves inside bone in mechanical stress-regulated bone homeostasis, additional experiments were also conducted in the ground, and we demonstrated that continuous administration of CGRP suppressed tail suspension-induced bone loss, and that surgical denervation or sensory nerve inactivation suppressed the recovery of bone mass after reloading. These results suggest that nerves inside bone may sense external stimuli such as gravity and mechanical stress and regulate bone homeostasis.

Influence of space microgravity environment on blood-circulating secretory microRNAs

We performed a comprehensive expression analysis of secreted miRNAs using blood samples and detected 25 types of miRNAs whose expression was altered with changes in the gravitational environment. Furthermore, we compared the expression profiles of miRNAs in the blood between old and young mice groups and succeeded in identifying 5 types of miRNAs that may also be involved in aging and senescence.

We investigated the physiological effects of the identified miRNAs and found that two types of miRNAs suppress osteoblast and myoblast differentiation through the modulation of target gene expression. In addition, we clarify the relationship between the identified miRNAs and aging and senescence in the literature. Furthermore, one of the identified miRNAs is a liverspecific miRNA, suggesting that the secretion of the miRNA into the blood is enhanced in space microgravity and may act on musculoskeletal tissues to suppress bone and muscle differentiation. Although further validation is needed, this study clarified a novel liver-bone linkage, which has not been reported before.

2024年度 ISS・きぼう利用ミッション科学成果評価結果 ^{別紙3-2}

テーマ名:低重合度のケイ酸塩融体における粘性、密度の温度依存性測定 (Silicate Melt)

研究代表者:河野 義生(関西学院大学)

総合評価

A:目標を充分に達成した(フルサクセス相当)

本テーマは、国際宇宙ステーションに搭載された静電浮遊炉(ELF)を活用して、これまで困難で あった、低重合度のかんらん岩組成ケイ酸塩融体の熱物性測定を実現するとともに、密度及び粘 性モデルの構築を目指したものである。その結果、鉄に富むケイ酸塩融体の密度や粘性の測定に 成功し、密度データから、火星深部、核/マントル境界におけるマグマ・岩石の密度逆転、すなわち 岩石よりも重いマグマの存在を示す新たな知見の獲得に成功した。

ELFを地球惑星科学に関連するケイ酸塩融体の物性測定に初めて適用し、地球や火星などの 惑星形成・進化を解明するための新たな手法の一つとなる可能性を示した点は、独創性が高く、 地球惑星科学における研究発展にも大きく貢献すると考えられ、高く評価できる。今後、多くの地 球惑星科学者がELF実験にアクセスし、データを活用できるよう、国内外のコミュニティへの周知を 期待する。

一方で、粘性データの論文化や融体構造データと熱物性との関係の解明が未達のため、今後、 更なる解析を進め、成果を公表することを期待する。

2025年2月20日

きぼう利用テーマ選考評価委員会(物質・物理科学)

きぼう利用テーマ

「低重合度のケイ酸塩融体における粘性、密度の温度依存性測定(Silicate Melt)」

研究成果概要書

研究代表者:河野 義生 (関西学院大学)

2024年12月

地球惑星形成初期に存在したマグマの海(マグマオーシャン)や地球惑星深部で発生するマグマは、 SiO₂量が少なく Fe 量に富む組成を持つケイ酸塩融体であると考えられている。ケイ酸塩融体は重合 した構造を持ち、主に SiO₂量の変化によりその重合度は大きく変化する。そして、その結果、密度・ 粘性率などの物性値も大きく変化すると考えられている。そのため、SiO₂量が少なく Fe に富む低重合 度のかんらん岩組成ケイ酸塩融体の密度・粘性率の実験的理解が、地球惑星形成初期におけるマグマ オーシャンや地球深部マグマの状態・挙動の理解に重要な課題となっている。

地球惑星科学におけるこれまでのケイ酸塩融体の物性研究では、現在の地表の火山で見られるよう な SiO₂ 量に富むケイ酸塩融体の密度・粘性率測定は数多く行われてきた。一方、SiO₂ 量が少なく Fe 量に富むかんらん岩組成ケイ酸塩融体については、実験技術的困難さにより、これまでほとんどの密 度・粘性率測定が行われていないのが現状である。その主な課題として、(1)一般的な電気炉の温度上 限(約 1600°C)のため、融点の高いかんらん岩組成ケイ酸塩の溶融実験が困難であり、さらに温度を変 化させた温度依存性測定が困難な問題と、(2)電気炉実験で一般的に使用される白金るつぼなどの容器 はケイ酸塩組成融体中の Fe と強く反応する問題、がある。本研究では、国際宇宙ステーション・「き ぼう」日本実験棟搭載の静電浮遊炉を用いた微小重力環境下での実験により、これら課題を解決し、 SiO₂量が少なく Fe 量に富むケイ酸塩融体の密度・粘性率測定を行うことを目標とした。本研究では、 地球惑星の主要構成組成であるかんらん岩組成の主要 3 成分 SiO₂, MgO, FeO からなるケイ酸塩融体の 密度・粘性率を測定することにより、低重合度のケイ酸塩融体の密度・粘性率モデルを構築し、地球 や火星などの惑星深部において重力的に安定に存在する高密度ケイ酸塩マグマの理解を目的とした。

本テーマでは、 $Mg_{0.8}Fe_{0.2}SiO_3$ 、 $Mg_{1.8}Fe_{0.2}SiO_4$ 、 $Mg_{0.7}Fe_{1.3}SiO_4$ 、 $Mg_{0.9}Fe_{1.7}SiO_4$ の4種類の組成について の密度・粘性率測定を実施した。これら試料は、Fe/(Mg+Fe)比=0.10-0.63、(Mg+Fe)Si比=1.00-2.52の 組成範囲を持ち、これら実験により、密度・粘性率の組成(FeO量とSiO_2量)依存性と温度依存性を理 解することを目的とした。さらに、宇宙実験後の帰還試料について、3次元X線トモグラフィー測定、 走査型電子顕微鏡(SEM)観察と化学組成分析、X線吸収端近傍構造(XANES)測定によるFe 価数測定を 行った。

4 組成試料全てにおいて、Ar ガス環境下における密度測定に成功し、最高温度 2465 K から最低温 度 1235 K にわたる幅広い温度下での密度の温度依存性結果を得ることに成功した。本研究で得られ た密度結果と、過去の SiO₂量に富むケイ酸塩融体の密度結果を基に構築された密度モデルを比較した 結果、SiO₂量の減少とともに過去の密度モデルとの差が大きくなる傾向が見られた。これは SiO₂量に 富むケイ酸塩融体の密度結果を基にした過去の密度モデルを、SiO₂量の少ないかんらん岩組成融体の 密度に外挿した場合の不確かさを示していると考えられる。さらに、密度の温度依存性についても、 本研究結果と過去の密度モデルでは大きな違いが見られた。本研究の全ての組成において、過去の密

1

度モデルによる予測よりも明らかに低い温度依存性が得られており、SiO₂量の少ないかんらん岩組成 ケイ酸塩融体の密度の温度依存性は、SiO₂に富むケイ酸塩融体よりも低い熱膨張率を持つことが明ら かになった。また、Mg_{0.8}Fe_{0.2}SiO₃ 融体について、第一原理計算結果との比較も行った結果、本実験で 得られた密度は、第一原理計算の結果よりも 7.1-7.5%(温度 2000-2200 K 下)も高い結果を示しており、 第一原理計算による密度結果は明らかに密度を低く見積もっていることが示された。

本研究で決定した SiO₂量が少なく Fe 量に富むかんらん岩組成ケイ酸塩融体の密度の組成・温度依存性モデルは、地球惑星深部におけるマグマと岩石の密度逆転とマグマの重力的安定性の議論に重要な役割を果たすと考えられる。その一例として、火星の核-マントル境界において提案されているケイ酸塩マグマ層を対象とし、Fe 量変化がかんらん岩組成ケイ酸塩融体の密度に与える影響をモデル化し、Fe に富むかんらん岩組成ケイ酸塩融体の火星マントル深部での重力的安定性について議論を行った。その結果、Fe/(Mg+Fe)比が0.4-0.5以上のかんらん岩組成ケイ酸塩融体は、火星マントル最深部において固体マントルの密度よりも高い密度となり、火星の核-マントル境界に重力的に安定に存在しうることが明らかとなった。

また、 $Mg_{0.8}Fe_{0.2}SiO_3$ 、 $Mg_{0.7}Fe_{1.3}SiO_4$ 、 $Mg_{0.9}Fe_{1.7}SiO_4$ の3組成については、空気下での密度測定にも成功した。帰還試料のXANES測定の結果、Ar下での実験後試料のFe³⁺/2Fe 比=0.22-0.31に対し、空気下での実験後試料は高いFe³⁺/2Fe 比=0.55-0.71を持つことが分かった。一方、このようなFe³⁺量比の違いにもかかわらず、Ar下と空気下の密度測定では似た密度値が得られており、Fe³⁺量比の変化による密度への影響は小さいことが明らかになった。

さらに、Mg_{1.8}Fe_{0.2}SiO₄、Mg_{0.7}Fe_{1.3}SiO₄、Mg_{0.9}Fe_{1.7}SiO₄の3組成について、Ar下において、温度 1980-2569K範囲での粘性率測定に成功した。その結果、Fe 量の増加とともに粘性率は増加し、SiO₂量の増 加とともに粘性率は低下することが明らかになった。本研究で得られた SiO₂量の少ないかんらん岩組 成ケイ酸塩融体の粘性率結果と、過去の研究における SiO₂量に富むケイ酸塩融体の粘性率データより 構築された粘性率モデル結果を比較すると、SiO₂量の少ないかんらん岩組成ケイ酸塩融体の粘性率は 明らかに小さい温度依存性を持つことが分かった。また、第一原理計算により報告されている (Mg,Fe)₂SiO₄組成融体の粘性率と比較すると、本実験で得らえれた粘性率値は第一原理計算結果と比 べて明らかに高い値であった。

以上のように、本テーマの実験により、4組成全てにおける Ar 下での密度の温度依存性データと、 3組成における空気下での密度の温度依存性データ、さらに3組成について Ar 下での粘性率測定に 成功した。これら得られた密度・粘性率データを用いることにより、SiO₂量が少なく Fe 量に富むかん らん岩的組成ケイ酸塩融体の密度・粘性率の組成・温度依存性モデルを構築した。これらの成果は、 Minimum Success, Full Success のサクセスクライテリアをすべて達成するものであると考えられる。本 研究により得られた結果は、過去の研究における SiO₂ 量の多いケイ酸塩融体のデータを基にした密 度・粘性率モデルや第一原理計算の結果と大きく異なっていることが明らかになり、本研究により SiO₂ 量の少ないかんらん岩組成ケイ酸塩融体の密度・粘性率モデルの精度を大きく高めることができたと 考えられる。そして、本研究で構築した SiO₂量の少ないかんらん岩組成ケイ酸塩融体の密度・粘性率 モデルは、地球惑星科学分野におけるマグマの状態・挙動の議論に必要不可欠な価値の高いデータと なると考えられる。

2

Summary report of the ISS-Kibo utilization mission "Measurement of temperature dependence of viscosity and density of depolymerized silicate melt (Silicate Melt)" Principal Investigator, Yoshio Kono (Kwansei Gakuin University) Dec. 2024

Understanding the physical properties of SiO₂-poor and Fe-rich peridotitic silicate melts is fundamental in discussing the nature and dynamics of magma ocean in the early Earth and planets, and magmas in the current planetary interiors. Silicate melt is considered to be composed of polymer-like network structure, and the degree of polymerization decreases with decreasing SiO₂ content. As a result, physical properties such as density and viscosity significantly change with varying SiO₂ content. Previous Earth science studies have investigated density and viscosity of SiO₂-rich polymerized silicate melts, and constructed density and viscosity models. However, density and viscosity of SiO₂-poor depolymerized silicate melts have not been well investigated mainly due to two experimental difficulties. One is temperature limitation in common high-temperature furnace up to ~1600 °C. The temperature range is enough high to melt SiO₂-rich silicate compositions, while SiO₂-poor silicate compositions have liquidus temperature higher than 1600 °C. Therefore, it is difficult to conduct melt experiment for SiO₂-poor silicate melts. Another experimental difficulty is high reactivity of iron in silicate melt with container material such as platinum crucible. Container material is essential to keep molten sample in common high-temperature furnace, while it is challenging to avoid chemical reaction between iron-rich silicate melt and container material at high temperature conditions.

In order to overcome these experimental difficulties, we utilize electrostatic levitation furnace (ELF) at the International Space Station (ISS). The ELF is capable of high temperature experiment above 2000 °C by laser heating, which enables us to melt SiO₂-poor peridotitic silicate melts and to investigate temperature dependence of the density and viscosity of the SiO₂-poor silicate melts at wide range of temperatures. In addition, containerless experiment by electrostatic levitation under the microgravity environment in the ISS overcomes the problem of chemical reaction between the melt and container material at high temperature conditions. Therefore, the ELF opens new way to experimentally investigate density and viscosity of SiO₂-poor and Fe-rich silicate melts at high temperatures.

In this study, we investigated density and viscosity of four SiO₂-poor and iron-rich peridotitic silicate melts with Mg_{0.8}Fe_{0.2}SiO₃, Mg_{1.8}Fe_{0.2}SiO₄, Mg_{0.7}Fe_{1.2}SiO₄, and Mg_{0.9}Fe_{1.6}SiO_{4.5} compositions (Fe/(Mg+Fe) ratio = 0.10-0.63, (Mg+Fe)/Si ratio = 1.00-2.52), which enable us to model the effects of composition (FeO and SiO₂ contents) and temperature on the density and viscosity of peridotitic silicate melts. In addition, in order to investigate effect of iron valence state (Fe^{2+} , Fe^{3+}) on the density, we conducted density measurements in Ar gas and air environment. Density of melt was determined from the mass and the volume. The volume of the melt sample at high temperature condition was determined from the sample image acquired with ultraviolet black light, and the mass of the recovered sample was weighed on the ground. Viscosity measurement was conducted by using the drop oscillation method. Sinusoidal voltages excite an oscillatory deformation on the melt sample. When the excitation voltage is stopped, the sample oscillation gradually weakens due to its viscosity. The viscosity of melt was calculated by the decay time with the density and radius of the sample. After the density and viscosity measurement, the sample was returned in the sample holder, and the recovered samples were brought back to the Earth. The recovered samples were analyzed by 3D X-ray tomography, scanning electron microscope (SEM) with energy dispersive spectrometer (EDS), and X-ray absorption near edge structure measurement.

We succeeded to obtain density results of all four samples at wide range of temperature conditions between 1235 and 2465 K. Our experimentally obtained density of $Mg_{0.8}Fe_{0.2}SiO_3$ melt, which has

relatively high SiO₂ content, is similar to that calculated by the previous density model based on SiO₂-rich silicate melts data. In contrast, there are marked differences in the densities of SiO₂-poor Mg_{1.8}Fe_{0.2}SiO₄, Mg_{0.7}Fe_{1.2}SiO₄, and Mg_{0.9}Fe_{1.6}SiO_{4.5} melts between our experimental results and the previous density model. The density differences increase with decreasing SiO₂ content, which is considered to be due to uncertainty caused by extrapolation of the previous density model for SiO₂-rich basaltic melt to SiO₂-poor peridotitic melts. In addition, we found significant differences in the temperature dependences of the densities of Mg_{0.8}Fe_{0.2}SiO₃, Mg_{1.8}Fe_{0.2}SiO₄, Mg_{0.7}Fe_{1.2}SiO₄, and Mg_{0.9}Fe_{1.6}SiO_{4.5} melts between our experimental results and those calculated by the previous density model, indicating that thermal expansivities of SiO₂-poor peridotitic silicate melts are much smaller than those of SiO₂-rich silicate melts. Furthermore, our obtained densities of Mg_{0.8}Fe_{0.2}SiO₃ melt at 2,000-2,200 K were 7.1-7.5 % higher than those calculated by first principles simulation.

Our new experimental density data and the determined density model for SiO_2 -poor peridotitic melt provide important constraints on the gravitational stability of iron-rich peridotitic melt at the coremantle boundary of Mars. In order to discuss the effect iron content on the density crossover between peridotite melt and Mars's mantle, we modelled density of a peridotitic melt composition with varying x=Fe/(Mg+Fe) ratio. Our determined density model suggests that the peridotitic melts with the Fe/(Mg+Fe) ratio more than 0.4-0.5 have higher densities than those of the solid mantle at the base of the Mars's mantle, which indicates gravitational stability of the iron-rich peridotitic melt at the coremantle boundary in Mars.

In addition, we conducted density measurements for Mg_{0.8}Fe_{0.2}SiO₃, Mg_{0.7}Fe_{1.2}SiO₄, and Mg_{0.9}Fe_{1.6}SiO_{4.5} melts under air environment. The recovered samples show higher ratio of Fe³⁺ relative to total Fe (Fe³⁺/ Σ Fe) after the experiments of air environment (Fe³⁺/ Σ Fe =0.55-0.71) compared to those after the experiments of Ar gas environment (Fe³⁺/ Σ Fe =0.22-0.31). On the other hand, the results show similar density values in both Ar gas and air environments, which imply no marked influence of Fe³⁺ on the density of iron-rich peridotitic silicate melts.

In addition to the density measurements, we succeeded to determine viscosities of Mg_{1.8}Fe_{0.2}SiO₄, Mg_{0.7}Fe_{1.2}SiO₄, and Mg_{0.9}Fe_{1.6}SiO_{4.5} melts at the temperature conditions of 1980-2569 K. The viscosity increases with increasing Fe content, while decreases with decreasing SiO₂ content. Our obtained viscosity results of the SiO₂-poor and iron-rich peridotitic melts are compared with the previous viscosity model based on the data of SiO₂-rich silicate melts. We found marked difference in the temperature dependence of the viscosities. Our results show markedly lower temperature dependences of the viscosities of the Mg_{1.8}Fe_{0.2}SiO₄, Mg_{0.7}Fe_{1.2}SiO₄, and Mg_{0.9}Fe_{1.6}SiO_{4.5} melts than those calculated by the previous viscosity model. In addition, our results show marked difference in the viscosity of the (Mg,Fe)₂SiO₄ melt calculated by first principles simulation.

In summary, we succeeded to obtain density results of all four samples under Ar gas environment and three samples under air environment. In addition, we succeeded to obtain viscosity results of three samples under Ar gas environment. By using these obtained density and viscosity results, we successfully determined density and viscosity models of SiO₂-poor and Fe-rich peridotitic silicate melts at functions of composition and temperature. These achievements satisfy criteria of the Minimum Success and Full Success. Our determined density and viscosity models show marked difference in the density and viscosity of SiO₂-poor peridotitic silicate melts compared to previous density and viscosity models based on SiO₂-rich silicate melts and calculation by first principles simulation. These results indicate that the density and viscosity models of SiO₂-poor peridotitic silicate melts. Our determined density and viscosity models for SiO₂-poor peridotitic silicate melts provide valuable data to increase the accuracy of the density and viscosity models of SiO₂-poor peridotitic silicate melts. Our determined density and viscosity models for SiO₂-poor peridotitic silicate melts provide valuable information in the discussion of the nature and dynamics of magmas in the Earth and planets.