

氏名（本籍・生年月日）	原 弘 真 （愛知県・昭和62年10月4日）
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	甲 第 49 号
学位授与の日付	平成26年9月30日
学位授与の要件	信州大学学位規程第5条第1項該当
学位論文題目	Establishment of Blastocyst Production System with Freeze-dried Bull Spermatozoa (凍結乾燥ウシ精子を用いた胚盤胞作製システムの構築)
論文審査委員	主査 教授 保地 眞一 教授 下坂 誠 准教授 塩見 邦博 准教授 堀江 智明 教授 若山 照彦 (山梨大学)

論 文 内 容 の 要 旨

ウシにおける育種改良は人工授精や胚移植といった生殖補助技術の普及によって急速に進んだ。これらの技術の中でも精液が凍結保存できるようになったことは、1回の射出精液で広域にわたって管理されている多数の繁殖雌牛群に対して適期に人工授精を施すことに貢献し、近年の動物バイオテクノロジー史の第一頁を飾るものである。しかし凍結精液の保存には液体窒素が必要なことから、コスト面の問題や輸送上の制約などが存在し、不慮の事故発生による貴重な雄遺伝資源の一括損失の危険性も残る。最近、常温あるいは冷蔵保存が可能な凍結乾燥法が新しい遺伝資源保存法として注目されており、復水後に精子が運動性を失っていたとしても顕微授精技術の適用により胚盤胞を作出して仮腹雌に移植すれば個体生産も可能となる。ところがウシにおける卵細胞質内精子顕微注入法（以下、ICSIと略）研究の歴史は浅く、凍結乾燥ウシ精子を対象とした胚盤胞の体外作製システムはまだ確立されていない（緒論：第1章）。

ウシ胚盤胞の体外生産は屠場由来の卵巣から未成熟卵子を採取して体外成熟培養（IVM）に供し、体外受精（IVF）後に約1週間培養（IVC）することにより可能となる。しかしこのときの胚盤胞発生率はin vivoで成熟を完了した卵子をIVF・IVCしたときと比較して低く、これまでもIVM培地へのホルモン添加やIVM時間の延長、気相中の酸素濃度低下による効果などが報告されてきた。本研究室で着目したのは活性酸素除去などに有効な卵細胞質内グルタチオン濃度を増加させることであり、グルタチオン合成の律速要因となるシステインとこれを効率的に取り込むことを助けるβ-メルカプトエタノールの存在下でIVMを行った。その結果、IVFあるいはICSIに供する前に、卵細胞質内のグルタチオン濃度を無添加対照の2.5倍に上昇させることに成功した。しかし、IVCにおいて卵割率や胚盤胞発生率に有意な改善を引き出すには至らなかった（第2章）。

次に、ICSI由来の胚盤胞のガラス化耐性を、対照のIVF由来胚盤胞と比較した。胚盤胞のみならず未受精卵母細胞を凍結保存する場合にも、エチレングリコールとDMSOを凍害

保護物質として含む保存液の量を最小化する、クライオトップというデバイスを用いて超急速冷却することが特徴的な「ガラス化保存法」が有効である。ICSI 由来の胚盤胞では、外径が小さい場合は加温後の 48 時間生存率が IVF 由来胚盤胞のそれと比較して有意に低くなった。一方、外径が大きな拡張胚盤胞と呼ばれる時期でガラス化保存した場合、加温 48 時間後の生存率に ICSI 由来か IVF 由来かで差は認められず、同程度の高い蘇生率が得られた。よって、胚移植に備えて ICSI 由来胚盤胞を保存する際には、拡張胚盤胞に到達するまで発生培養時間を延長してからガラス化に供することが推奨された (第 3 章)。

マウスやラットのような齧歯類では、凍結乾燥精子を長期にわたって冷蔵保存した後に ICSI することで安定して産仔が得られるまでの技術水準に到達している。本研究室でもラット精子に適した凍結乾燥条件 (乾燥バッファー、乾燥時真空圧、乾燥時間など) を確立しており、当該条件をウシ精子に適用して凍結乾燥サンプルを作製した。復水精子を ICSI したところ、非乾燥精子を ICSI した場合と比較してあまりにも低い胚盤胞発生率しか得られなかった。受精成立後の雌雄両前核の移動・接近に必須と考えられている精子星状体形成能 (中心体による微小管形成中心機能を反映) を前核期卵のチューブリン抗体染色により調べたところ、精子星状体形成阻害は凍結乾燥ではなく、ICSI の行程によって引き起こされていたことがわかった (第 4 章)。

凍結乾燥精子を ICSI した後の胚盤胞発生率の改善を目指し、さらに凍結乾燥条件の改善を図った。適切な凍結乾燥条件下では溶液は多孔質のスポンジ様構造 (凍結乾燥ケーキ) を形成するが、溶液の最大凍結濃縮層ガラス転移温度 (T_g') よりも高い温度で乾燥すると「コラプス」と呼ばれる凍結乾燥ケーキの構造崩壊が生じやすい。これまでに採用してきた凍結乾燥条件下ではコラプス発生が観察されていたため、コラプスが凍結乾燥精子の正常性ならびに胚盤胞発生能に及ぼす影響について調べることにした。 T_g' を -28°C になるよう修正した EGTA バッファーにウシ精子を懸濁して予備凍結し、 -30°C で乾燥行程を行うとコラプス形成は起こらなかった。しかし乾燥温度を -15°C や 0°C に設定した場合、凍結乾燥ケーキにはコラプスが観察された。コラプス形成の有無により復水精子で ICSI した後の胚盤胞発生率は影響されており、コラプス発生ケーキ内にあった精子細胞膜の損傷は激しいことが透過型電子顕微鏡像において確認された (第 5 章)。

以上、本研究は (1) *in vitro* での胚盤胞作出効率改善の試み、(2) 胚移植を見据えた ICSI 由来胚盤胞の耐凍性調査、(3) 凍結乾燥精子の中心体機能評価、そして (4) コラプス発生抑制による凍結乾燥精子の正常性改善、を柱にして、凍結乾燥ウシ精子を用いた胚盤胞作製システムの構築を行った (総括：第 6 章)。