

# 学 位 論 文 要 旨

氏名 藤川 拓郎

題 目：不凍ポリアミノ酸 (Carboxylated Poly-L-Lysine) による  
ウシ体細胞、生殖細胞の凍結保護効果と凍結保存の実証

論文要旨：細胞や組織は再生医療や疾患メカニズムの解明、遺伝子バンクなどに利用され、それらを長期間効率的に保存するために超低温保存法が利用されており、様々な凍結方法、凍結保護材が研究されている。また、精子や卵子、胚などの生殖細胞の凍結保存は遺伝資源保存やヒト生殖補助医療においても利用されている。生産動物分野においては、優秀な系統、遺伝子をもつ動物の生殖細胞は家畜の育種、増頭の促進に利用され、家畜生産者にとっては経営維持のために、凍結保存された精液、胚を使用することが日常的で、融解後生存性の低い精液、胚を使用することは受胎率の低下、生産性の低下につながるため、超低温保存法は非常に重要な技術である。細胞や精子、胚の凍結保護材として、従来は、ジメチルスルホキシド (Dimethyl sulfoxide : DMSO) やグリセロール (Glycerol : Gly)、エチレングリコール (Ethylene glycol : EG)、プロピレングリコール (Propylene glycol : PG) などが主に用いられてきた。しかし、それらの物質は開発当初から 40 年以上経過した現在も使用されており、融解後生存性の改善のために新規凍結保護材の開発が望まれている。両性電解質高分子化合物である、不凍ポリアミノ酸 (Carboxylated Poly-L-Lysine : COOH-PLL) は Matsumura らにより、2009 年に新規凍結保護材として報告された。COOH-PLL を用いたヒトやマウスの腫瘍細胞の凍結融解後の生存率は 90%近くで、DMSO とほぼ同等の凍結保護能を持ち、DMSO と異なり、分化に与える影響は少ないと報告されている。そこで、本研究では、ウシの生産性向上を目的とし、COOH-PLL を用いたウシ体細胞、生殖細胞の凍結融解後生存性の改善に関する検討を行った。

第 1 章では、ウシ体細胞の耳由来皮膚線維芽細胞と卵丘細胞を用いて、DMSO と COOH-PLL の凍結融解後生存性、増殖性の調査を行った。生存性では、線維芽細胞、卵丘細胞ともに、10%DMSO 区と COOH-PLL を用いた試験区で有意な差はみられなかった。増殖性では、線維芽細胞、卵丘細胞ともに、5%DMSO+5%COOH-PLL 区が最も良い増殖性を示した。また、COOH-PLL 単体の試験区では、線維芽細胞では 7.5%COOH-PLL 区が最も良い増殖性を、卵丘細胞では 25%COOH-PLL 区が最も良い増殖性を示した。また線維芽細胞では、融解後 COOH-PLL を除去することなく、5 倍希釈するのみで、その後 72 時間まで良好な増殖を示し、DMSO を含む試験区ではそのような効果はみられなかった。

第 2 章では、ウシ生殖細胞の胚を用いて、DMSO、Gly、EG、PG と COOH-PLL の緩慢凍結法、ガラス化凍結法 (クライオトップ法またはストロー内希釈法) で保存した胚の凍結融解後生存性の調査を行った。緩慢凍結法の凍結融解 24 時間後の融解後生存率は、Control 区と COOH-PLL 区で差はみられなかったが (27.9% vs 40.2%)、凍結胚移植試験では COOH-PLL 区を受胎率が良い傾向にあった (30.6% vs 45.2%)。クライオトップ法の凍結融解 24 時間後の生存率は Control 区と

(別紙様式第 3 号)

COOH-PLL 区で差はみられなかったが (54.4% vs 70.4%)、72 時間後までの透明体脱出率は、Control 区と比較し、COOH-PLL 区が有意に高く (23.3% vs 44.4%,  $p < 0.05$ )、ストロー内希釈法の凍結融解 24 時間後の生存率と 72 時間後までの透明体脱出率は、Control 区と COOH-PLL 区で差はみられなかった (75.0% vs 71.4%, 32.5% vs 47.6%)。

第 3 章では、ウシ生殖細胞の精子を用いて、Gly と COOH-PLL の凍結融解後生存性の調査を行った。融解後の運動性、先体膜正常性、体外受精後の発生能 (卵割率、胚盤胞発生率) に差はみられなかったが、精子膜正常性では 6.5%Gly 区と比較し、3.25%Gly+0.5%COOH-PLL 区が有意に高く (49.8% vs 61.0%,  $p < 0.05$ )、凍結精液授精試験の受胎率も有意に高かった (53.1% vs 79.0%,  $p < 0.05$ )。

COOH-PLL は従来の凍結保護材の DMSO と比較し、毒性が少ないことが報告されており、凍結融解後に凍結保護材を除去することなく培養できる点や、従来の凍結保護材に COOH-PLL を添加しても生存性に影響を及ぼさなかったことから、ウシ体細胞、生殖細胞に対しても同様に毒性が低いことが示唆された。また、凍結保護効果に関しては、細胞膜非透過性の凍結保護材として報告されており、胚では、マウスやブタと同様にウシでも従来の凍結保護材の代替として活用することで、融解後生存性の改善がみられた。また精子においても融解後生存性の向上、受胎率の改善がみられ、これまでに COOH-PLL を精子凍結保存に応用した報告はなく、他の動物種への応用も期待できる。

COOH-PLL はウシ体細胞、生殖細胞の凍結保存において、従来の凍結保護材と同等もしくはそれ以上の凍結保護効果を持ち、受胎率を向上させ、従来の凍結保護材の代替となる可能性が示された。COOH-PLL は未解明な部分も多く、更なる条件の検討が必要であるが、詳細なメカニズムの解明により、実験動物や家畜のみならず、ヒト生殖補助医療への応用が期待できる。

(和文 2,000 字又は英文 800 語程度)

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	藤川 拓郎
審査委員	主査：鹿児島大学 教授 窪田 力
	副査：鹿児島大学 教授 大和 修
	副査：山口大学 教授 高木 光博
	副査：山口大学 准教授 角川 博哉
	副査：鹿児島大学 准教授 安藤 貴朗
題目	不凍ポリアミノ酸 (Carboxylated Poly-L-Lysine) によるウシ体細胞、生殖細胞の凍結保護効果と凍結保存の実証
審査結果の要旨： 本研究の目的は、牛の生産性を改善するため、新規の凍結保護材となり得る不凍ポリアミノ酸 (Carboxylated Poly-L-Lysine : CPLL) を用いたウシ体細胞と生殖細胞 (胚 (受精卵)、精子) の凍結保存技術を開発することである。この目的を達成するために、それぞれの対象細胞について、既存の手法 (既存の凍結保護材の濃度、組み合わせ) に CPLL を組み合わせたり、CPLL 単独での凍結保存を調査し、体細胞においては、従来の凍結保護材である DMSO と組み合わせることや CPLL 単独での凍結保存が可能であることを明らかにした。また、皮膚由来線維芽細胞において、CPLL 単独で凍結保存した場合には、融解してディッシュへ播種時に、CPLL を除去せずに、そのまま培養液で希釈して播種できることを明らかにした。胚の凍結保存で緩慢凍結法については、既存の手法に CPLL を添加することで、凍結融解後の胚の生存性が良く、胚移植による受胎率は改善する傾向にあった。ガラス化凍結では、CPLL を組み合わせることで、凍結融解後の胚の生存性が有意に改善された。精子については、CPLL を組み合わせることで従来のグリセリン (GLY) を半分の濃度 (3.25%) に低減することが可能で、人工授精による受胎率は有意に改善することが明らかとなった。これらの研究について 3 章に分けて学位論文が形成された。 第 1 章：ウシ体細胞として皮膚由来線維芽細胞と卵丘細胞の 2 つについて、CPLL を用いた凍結保存について、世界的に長年使用されている 10%DMSO の凍結保存を対照として研究を行った。その結果、5%DMSO と 5%CPLL の濃度での凍結保存は、融解後の生存性が対照と変わらなかった。また、線維芽細胞では 5~10%、卵丘細胞では 5~30% の CPLL 単独でも凍結融解後の細胞の生存性に対照と差違はみられなかった。その後の細胞増殖性の調査の結果、CPLL 単独使用の場合、線維芽細胞で 5~7.5%、卵丘細胞は 25% が至適であった。また、線維芽細胞	

(別紙様式第 10 号)

を CPLL 単独で凍結保存した場合には、融解後に CPLL を除去せずに、凍結液とともにディッシュに播種しても、その後の細胞増殖性に影響がないことが明らかとなった。

第 2 章：ウシ胚の凍結について、緩慢凍結法とガラス化凍結法について調査を行った。緩慢凍結法では、エチレングリコール (EG) とプロパンダイオール (PD) を凍結保護材とするダイレクト法を対照として、CPLL を添加した場合と EG または PD をそれぞれ CPLL に代替した場合について調査を行った。その結果、EG または PD をそれぞれ CPLL に代替した場合には、凍結融解後の胚の生存性が低下したが、対照に CPLL を 3~7% 添加した場合に対照と差の無い結果が得られた。対照に 7% CPLL を添加して凍結した胚の移植試験を行った結果、対照の胚移植の受胎率より改善する傾向が得られた (45.2% vs 30.6% ;  $P < 0.07$ )。ガラス化凍結法では、Cryotop 法の手技により調査を行い、EG 16.5%、DMSO 16.5% を対照として、DMSO を CPLL に代替する場合、EG、DMSO を CPLL に代替する場合について調査を行った。その結果、EG、DMSO すべてを CPLL に代替した場合の凍結融解後の胚の生存性は低下したが、DMSO を CPLL 5.5~11.0% に代替した場合の胚の生存率、透明帯からの脱出率は有意に改善した。

第 3 章：ウシ精子の凍結について、従来のグリセリン (GLY) 6.5% 添加を対照にして、CPLL を添加した場合、GLY を半分量の 3.25% にして CPLL を添加した場合、CPLL のみで凍結を行った場合について調査した。その結果、精子の運動性は GLY 6.5% または 3.25% に CPLL を添加した場合、対照と差はみられなかったが、CPLL 単独では運動性は有意に低下した。精子頭部膜の正常性では、3.25% GLY・0.5% CPLL が対照およびその他の調査に比べて有意に高かった。先体の正常性に差はなかったが、体外授精による受精能、発生能は CPLL を添加した方が良い傾向にあった。これらのことから、対照 (6.5% GLY) と 3.25% GLY・0.5% CPLL による凍結精液の人工授精を実施した結果、3.25% GLY・0.5% CPLL による受胎率は対照に比べて有意に高かった (79.0% vs 53.1% ;  $P < 0.05$ )。

本研究で、ウシの体細胞および生殖細胞の凍結に対する不凍ポリアミノ酸 (CPLL) の効果が明らかとなった。ウシの体細胞および生殖細胞の凍結に CPLL は非常に有効で、既存の凍結保護材と同等または以上の効果があることが確認され、今後の細胞凍結保存技術の開発に大いに寄与するとともに、本技術を用いて生殖細胞を凍結することで、子畜生産性の向上にも寄与すると考えられた。

以上より、本論文は博士 (獣医学) の学位に十分に値すると判断された。