

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

山口大学大学院連合獣医学研究科

藤川 拓郎

2019年3月

目次

論文要旨.....	1
緒論.....	5
第1章 不凍ポリアミノ酸（Carboxylated Poly-L-Lysine）を凍結保護材とした ウシ体細胞の凍結保存	
1.1 緒論.....	11
1.2 材料と方法.....	12
1.3 結果.....	16
1.4 考察.....	19
1.5 図表.....	22
第2章 不凍ポリアミノ酸（Carboxylated Poly-L-Lysine）を凍結保護材とした ウシ胚の凍結保存	
2.1 緒論.....	28
2.2 材料と方法.....	31
2.3 結果.....	39

2.4 考察.....	41
2.5 図表.....	44
第3章 不凍ポリアミノ酸（Carboxylated Poly-L-Lysine）を凍結保護材とした ウシ精子の凍結保存	
3.1 緒論.....	54
3.2 材料と方法.....	56
3.3 結果.....	61
3.4 考察.....	63
3.5 図表.....	65
考察.....	75
謝辞.....	80
参考文献.....	81

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 区の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 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。

緒論

超低温保存法は組織や細胞の生物学的資源を -196°C の液体窒素内で半永久的に保存する技術で、 -196°C の液体窒素内では生物活性が停止するため、生理的、遺伝的变化が抑えられ、劣化なく保存できることから、遺伝資源の保存や医療分野における様々な研究に不可欠で、広く活用されている。細胞株維持に必要な労力や費用の削減、継代培養による培養細胞の変化防止のためにも細胞は凍結され、液体窒素中で細胞の長距離輸送が可能になり、現在、世界中の細胞バンクから様々な細胞を手に入れることも可能となっている。培養細胞を培養液中でそのまま凍結すると、細胞内外の水分が結晶化し、細胞膜や細胞小器官に物理的な損傷を与え、融解後生存性は低下するため、細胞を凍結保存する際には、融解後生存性を維持するために凍結保護材を用いる必要がある。1959年に Lovelock らが、ヒトおよびウシ赤血球に対するジメチルスルホキシド (Dimethyl sulfoxide : DMSO) の凍結保護効果を報告して以来[32]、DMSO は様々な培養細胞に対して凍結保護効果を持つことが報告され、また比較的安価であるため、現在も最も広く使用されている。また、細胞の種類によってはDMSO では融解後生存性が低い細胞もあり、DMSO の他にグリセロール (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)、スクロース、トレハロース、ポリビニルピロリドン、デキストランなどが凍結保護材として報告されている[14,68,71]。DMSO や Gly、EG、PG などは低分子量のため細胞膜透過性の凍結保護材で細胞内に浸透し、溶液中の氷点を下げ、氷晶形成を抑制し、細胞内凍結を防止

する。一方、スクロース、トレハロース、ポリビニルピロリドン、デキストランなどは高分子量のため細胞膜非透過性で細胞内に浸透せず、氷点を下げ、細胞外の塩類濃度の上昇を抑制し、細胞膜に対する保護効果を持つ。DMSO は、体細胞の凍結保存について 80~90%の融解後生存性示すように[1,35]凍結保護効果は高いが、同時に細胞毒性を有しており、融解後には素早く除去する必要がある。また、DMSO はヒト前骨髄性白血病細胞株 HL-60[24]やマウスの骨髄間葉系幹細胞[77]に対して分化誘導を起こすことが報告されている。また、細胞膜非透過性の凍結保護材は、それだけでは凍結保護能が低いため、細胞膜透過性の凍結保護材と組み合わせて使用する必要がある[10,33]。そのため、DMSO の細胞凍結保護効果が 1959 年に報告された以降、凍結保護効果の改善のために、凍結時の細胞濃度[16]、凍結保護材の種類や濃度[14,43,68]、血清添加の有効性[8]、冷却速度[36]など様々な研究がなされている。しかし、DMSO の代替となる物質は発見されておらず、毒性が低く、高い凍結保護効果を持つ凍結保護材の開発が望まれている。

ウシの生殖細胞では、1949 年に Polge らが Gly を用いて精子の凍結保存に成功し[48]、1952 年に凍結精液を用いた人工授精でウシ産子を得ることに成功し[49]、凍結精液による人工授精 (Artificial Insemination : AI) が広く普及した。自然交配では 1 回の射精で 1 頭の雌動物を妊娠させるが、AI の場合、1 度の射精から数百本の凍結精液ストローが作成され、多数の雌動物を妊娠させ、産子を得ることが可能である。そのため、優れた遺伝形質、系統をもつ雄動物の産子を短期間に多数得ることができ、雄動物側からの育種改良が促進され

る利点があるため、現在国内の乳用種、肉用種の産子の90%以上は凍結精液を用いたAIにより生産されている。しかし家畜改良事業団の報告では、平成26年度のAI受胎率は乳用種43.4%、肉用種52.6%で、平成元年（乳用種62.0%、肉用種66.4%）と比較して低下している。精子凍結の基本的な培地はトリスヒドロキシアミノメタン、糖を主体とした溶液に卵黄と凍結保護材であるGlyを添加して使用している。精子凍結過程は細胞膜や先体に損傷を与え[57]、活性酸素種の産生を増加させ、キャパシテーションやハイパーアクチベーションを誘導し、精子運動性を低下させる[60]。このため、凍結時の損傷から精子を保護するために凍結保護材が必要だが、凍結保護材自体の毒性と浸透圧によるショックも精子に障害を与えることが知られている。そのため、凍結保護材の濃度や種類[15,56]、希釈液の種類[40]、冷却速度[15]など融解後生存性を向上させる研究がなされている。

ウシ胚の作出は、*in vivo*、*in vitro*の両方で研究が進められ、1965年にSugie[63]が非外科的胚移植により産子を得ることに成功すると、フィールドでの技術応用も盛んに行われた。胚発生の研究や胚の増産のため体外受精技術（*in vitro* fertilization: IVF）の研究も盛んに進められ、これらの技術を基にして、顕微授精技術、核移植技術などの新たな技術が開発された。胚移植技術（Embryo transfer: ET）はAIと組み合わせることで、優れた遺伝形質、系統をもつ雌ウシと雄ウシから効率的に胚を作出できることや、食肉処理場卵巣から回収された卵子や超音波画像診断装置を用いて経膈で採取（Ovum pick-up: OPU）した卵子を用いたIVFにより多数の胚を得ることが可能となり、生体内由来（*in vivo*）胚やIVF胚の

移植による雌ウシ側からの育種改良が促進、効率的な産子の生産に有用な繁殖技術として世界中で活用されている。前述の細胞と同様に胚の保存と広域な活用のためには胚の凍結保存技術が不可欠で、1973年に Wilmut らが 2.0mol の DMSO を用いて 0.2°C/分の速度で凍結保存した胚盤胞期の胚から産子を得ることに初めて成功し[75]、現在では世界中で年間 30 万個の IVF 由来の凍結胚が移植されている。胚の凍結方法には、緩慢凍結法とガラス化凍結法が用いられているが、現在、ウシの臨床現場では、顕微鏡等がない農場の庭先で胚を含む凍結ストローを融解することが多いため、融解後に胚の操作をせず、移植器にストローをセットし、そのまま移植することが可能な緩慢凍結によるダイレクト法が主流となっている。凍結胚の移植受胎率は新鮮胚に比べて低いため、凍結保護材の種類、濃度[39]、凍結融解速度[19]、凍結方法[41]などの研究が多くなされている。精子や卵子、胚などの生殖細胞を効率的に超低温保存ができれば、優良遺伝子の育種改良が促進し、遺伝資源としての保存も可能になり、家畜や実験動物だけでなくヒト生殖補助医療においても重要な技術になると考えられる。

不凍タンパク質 (Antifreeze protein : AFP) は血液中の凝固点を降下させる物質として南極海の魚類から発見され[13]、それ以降昆虫、植物など様々な生物からも発見されている[18,74]。不凍タンパク質は凍結時に、細胞内において氷晶のプリズム面に吸着し、形成される氷晶の成長と再結晶化を抑制することで細胞膜を保護する特性を持つ[18]。AFP は 4°C の非凍結低温環境下でウシ卵子の成熟率、受精率の改善[52]やヒツジ精子の凍結融解後の運

動性を改善することが報告されている[45]が、AFPの性状や機能には未解明な部分も多く、さらに、精製されたAFPは非常に高価であることから日常的な培養細胞の凍結保存に使用するには現実的でない。

そこで、すでに食品添加剤として使用されている ϵ -poly-L-lysine (PLL)のアミノ基の一部を無水コハク酸と反応させることによりカルボキシル基(-COOH)を導入した、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)が開発された[34]。PLLはカルボキシル基の導入率に応じて細胞の凍結保護効果が異なるが、カルボキシル基を65%導入した場合に最も高い凍結保護効果をもつことが報告されている[35]。ヒトやマウスのいくつかの腫瘍細胞についてCOOH-PLLを用いた凍結融解後の生存率は90%近くで[35]、DMSOなど従来の凍結保護材の代替となる新規の細胞凍結保護材として注目されている。また、近年、COOH-PLLはマウス卵子[73]、マウス前核期胚[59]、ブタ前核期胚[25]において有効性が報告されており、生殖細胞の凍結保存についても有効であることが示唆されるが、ウシの生殖細胞に関する報告は見られない。そこで、本研究では、従来の凍結保護材に変わる新規の凍結保護材としてCOOH-PLLを使用したウシ体細胞、ウシ生殖細胞の凍結保護効果を調査し、保存した生殖細胞から子畜の生産を行い、凍結保護材の効果を実証した。

第 1 章

不凍ポリアミノ酸（Carboxylated Poly-L-Lysine）を
凍結保護材としたウシ体細胞の凍結保存

1.1 緒論

細胞や組織を含む、生物学的資源を長期間保存するために、日常的に世界中で液体窒素内での凍結保存が使用されている。凍結保存された細胞は基礎研究の他、iPS 細胞や ES 細胞などの幹細胞は再生医療分野や疾病メカニズムの解明[58,70]のために使用されている。そのため、それらの細胞を効率的に保存することは様々な研究分野において重要である。細胞、組織の凍結保護材として DMSO、Gly などの化学物質が主に使用されており[68]、これらは細胞質内に浸透し、氷晶形成を抑制することで、細胞や組織を保護している。DMSO は様々なタイプの細胞に広く使用されているが、細胞の種類によっては、分化に影響を与えることが報告されている[24,77]。また、これら凍結保護材は細胞毒性を持つことから、融解後ただちに凍結保護材を細胞懸濁液から除去する必要がある。また、融解後の生存性を上げるために、複数の凍結保護材を組み合わせること[14]やスクロース、トレハロースなどの糖類を加えることが行われている[10,14]。しかし、これらの物質は細胞内に浸透しないため、単体の使用では凍結保護効果が低い。そのため、従来の凍結保護材である DMSO や Gly の代替となる、低毒性で、より高い凍結保護効果を持つ、新規凍結保護材の開発が望まれる。

COOH-PLL はカルボキシル基の導入率に応じて細胞の凍結保護効果が異なり、50~76%導入することで、従来の DMSO より高い生存性を示し、65%導入した場合に最も高い凍結保護効果をもつことが報告されている[34]。そこで、本章ではウシ体細胞の凍結保存に COOH-PLL の有効性を調査した。

1.2 材料と方法

1.2.1 Carboxylated Poly-L-Lysine (COOH-PLL)の合成

25% ε-Poly-L-Lysine(JCN Corp., Japan)を無水コハク酸(198-04355, Wako Pure Chem. Ind. Ltd., Japan)と反応させ、50°Cで1時間処理し、アミノ基の65%をカルボキシル基(-COOH)に変換した、両性電解質高分子化合物(COOH-PLL)を使用した[34]。

1.2.2 体細胞の採取と培養

ウシ線維芽細胞とウシ卵丘細胞は既報の方法に従って行った[2,23]。線維芽細胞の初代培養は黒毛和種雌ウシ(13才)の耳組織から分離した。耳組織は採取後、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline : D-PBS, 05913, Dulbecco's PBS (-"Nissui", Nissui pharmaceutical Co., Ltd, Japan))で洗浄、4mmサイズに細切後、60mmのプラスチックカルチャーディッシュ(353002, Tissue Culture Dish, Corning International K.K., USA)で培養を行った。細胞培養液はダルベッコ改変イーグル培地(Dulbecco's modified Eagle's medium : DMEM, 05915, Dulbecco's Modified EAGLE MEDIUM "Nissui", Nissui pharmaceutical Co., Ltd, Japan)に10%のウシ胎児血清(Fetal Bovine Serum : FBS, 26140-079, Thermo Fisher Scientific K.K., Japan)を添加し、飽和水蒸気下、38.5°C、5%CO₂の条件下で培養を行った。線維芽細胞が培養ディッシュ内にコンフルエンスに達したときに、0.1%(w/v)トリプシン(27250-018, Trypsin (1:250), Thermo Fisher Scientific K.K.,

Japan)と 0.02% (w/v) EDTA (345-01865, Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic Acid Disodium Salt Dihydrate (2NA), Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan)を添加した D-PBS を用いて、細胞を剥離し、3 倍に希釈し、継代培養を行った。

卵丘細胞の初代培養は、黒毛和種雌ウシの屠畜後の卵巣より、卵子卵丘細胞複合体を吸引し、1%のヒアルロニダーゼ(H3506, Hyaluronidase from bovine testes, Sigma-Aldrich Co. LLC, USA)を添加した D-PBS を用いて、卵子卵丘細胞複合体から卵丘細胞を剥離し、60mm のカルチャーディッシュを用いて培養した。卵丘細胞の培養条件は、線維芽細胞と同様に行った。本実験で使用した培養細胞は 5 継代から 10 継代までとした。

1.2.3 凍結方法と生存性の評価

線維芽細胞の凍結液の試験区は、凍結保護材添加無し (No cryoprotectant 区), 10% (v/v) DMSO (13407-45, NACALAI TESQUE, INC., Japan) (10% DMSO 区), 5% (v/v) DMSO+5% (w/v) COOH-PLL (5% DMSO+5% COOH-PLL 区), 5% (w/v) COOH-PLL (5% COOH-PLL 区), 7.5% (w/v) COOH-PLL (7.5% COOH-PLL 区), 10% (w/v) COOH-PLL (10% COOH-PLL 区) の 6 つとした。すべての凍結液の pH は 7.4 に調整し、線維芽細胞は凍結液 1ml あたり、 5.0×10^5 個の濃度で懸濁し、凍結容器 (MS-4603, Sumitomo Bakelite Co., Ltd., Japan) に入れ、 -80°C フリーザー (CLN-52UD1, NIHON FREEZER CO., LTD., Japan) で一晩保存後、液体窒素内 1 週間以上保存した後に調査に供試した。

融解後の細胞生存性の評価は Live/Dead Cell Staining Kit II (D25497, Takara Bio Inc., Japan)を用いて行った。凍結容器を液体窒素から 35°Cの水槽内えに素早く投入し、融解後は凍結液の 10 倍量(9ml)の D-PBS で細胞懸濁液を希釈した。遠心後(1500rpm, 5 分間)、上澄みを除去し、再度 D-PBS で希釈し、遠心後(1500rpm, 5 分間)、上澄みを除去し、計 2 回洗浄した。洗浄後の細胞懸濁液に 2 μ M Calcein-AM と 4 μ M EthD-IIIを 100 μ l ずつ加え、室温で 30 分インキュベート後、染色した細胞をスライドガラスにとり、カバーガラスをつけ、鏡検した。Calcein-AM により緑色に発色する細胞を生細胞、EthD-IIIにより、赤色に発色する細胞を死細胞として判定し、1 視野あたり、100 個以上の細胞をカウントした(Figure1)。

融解後の細胞増殖性の評価は、それぞれの試験区で、細胞を融解後に通常の処理に応じて凍結保護材を除去する方法と、除去しない方法の 2 通りで行った。凍結保護材を除去する方法は、融解後 10 倍量(9ml)の細胞培養液(前述 1.2.2)で細胞懸濁液を希釈、遠心 (1500rpm, 5 分間)、上澄みを除去し、5ml の細胞培養液を加えた後、60mm のカルチャーディッシュに播種し培養した。凍結保護材を除去しない方法は、融解後、凍結保護材を含む 1ml の細胞懸濁液を 4ml の細胞培養液で 5 倍希釈し、そのまま 60mm のカルチャーディッシュに播種して培養した。融解後 24、48、72 時間後に接着細胞数をカウントし、増殖性の評価を行った。

卵丘細胞の凍結液の試験区は、凍結保護材添加無し (No cryoprotectant 区)、以降上記と同様に 10% (v/v)DMSO (10%DMSO 区)、5% (v/v) DMSO+5% (w/v) COOH-PLL (5%

DMSO+5%COOH-PLL 区)、5% (w/v) COOH-PLL (5%COOH-PLL 区)、10% (w/v) COOH-PLL (10%COOH-PLL 区)、20% (w/v) COOH-PLL (20%COOH-PLL 区)、25% (w/v) COOH-PLL (25%COOH-PLL 区)、30% (w/v) COOH-PLL (30%COOH-PLL 区) の 8 つの区で生存性と増殖性の評価は線維芽細胞と同様の方法で行った。

1.2.4 統計処理

すべてのデータは平均値±標準誤差で示し、生存性はアークサイン変換後に分散分析法と Tukey 法を用いて、増殖性は分散分析法と Tukey 法を用いて有意差検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

1.3 結果

凍結融解後生存性の結果を Table1 に示した。線維芽細胞、卵丘細胞ともに No cryoprotectant 区を除くすべての試験区で 90%近い生存性を示した。線維芽細胞では、5% COOH-PLL 区が最も高く ($96.5\% \pm 1.0\%$)、凍結保護材を含むすべての試験区と No cryoprotectant 区の間には有意な差がみられた。卵丘細胞では 20% COOH-PLL 区の生存性が最も高く ($95.3 \pm 0.7\%$)、凍結保護材を含むすべての試験区と No cryoprotectant 区の間には有意な差がみられた。

凍結融解後に凍結保護材を除去する方法で処理した細胞の融解 72 時間後までの増殖性の結果を Table2 に示した。線維芽細胞では、融解 24 時間後では 5% COOH-PLL 区が最も高く、No cryoprotectant 区とすべての区との間に有意な差がみられた。融解 48 時間後では 10% COOH-PLL 区が最も高く、No cryoprotectant 区、7.5% COOH-PLL 区の間に有意な差がみられた。また、No cryoprotectant 区はすべての区との間にも有意な差がみられた。融解 72 時間後では 5% DMSO+5% COOH-PLL 区が最も高く、No cryoprotectant 区、5% COOH-PLL 区との間に有意な差がみられた。また、No cryoprotectant 区はすべての区との間に有意な差がみられた。また、凍結保護材として DMSO を含まず COOH-PLL のみを用いた試験区では 7.5% COOH-PLL 区が最も高かったが、7.5% COOH-PLL 区と 10% DMSO 区との間に有意な差はみられなかった。

卵丘細胞では、融解 24 時間後では 10% DMSO 区が最も高く、すべての区との間に有意

な差がみられた。10%DMSO 区に次いで 5%DMSO+5%COOH-PLL 区が高く、すべての試験区との間に有意な差がみられ、次いで 25%COOH-PLL 区が高く、30%COOH-PLL 区を除くすべての試験区との間に有意な差がみられた。融解 48 時間後では 10%DMSO 区が最も高く、5%DMSO+5%COOH-PLL 区、25%COOH-PLL 区を除くすべての試験区との間に有意な差がみられた。10%DMSO 区に次いで 5%DMSO+5%COOH-PLL 区と 25%COOH-PLL 区が高く、10%DMSO 区を除くすべての区との間に有意な差がみられた。融解 72 時間後では 5%DMSO+5%COOH-PLL 区が最も高く、10%DMSO 区、25%COOH-PLL 区を除くすべての区との間に有意な差がみられた。5%DMSO+5%COOH-PLL 区に次いで 10%DMSO 区と 25%COOH-PLL 区が高く、5%DMSO+5%COOH-PLL 区を除くすべての区との間に有意な差がみられた。また、凍結保護材として DMSO を含まず COOH-PLL のみを用いた試験区では 25%COOH-PLL 区が最も高かったが、25%COOH-PLL 区と 10%DMSO 区との間に有意な差はみられなかった。

融解後に凍結保護材を除去しない方法を用いた場合の融解 72 時間後までの増殖性の結果を Table3 に示した。線維芽細胞では、融解 24 時間後では 10%COOH-PLL 区が最も高く、すべての区との間に有意な差がみられた。融解 48 時間後では 5%COOH-PLL 区が最も高く、7.5%COOH-PLL 区を除くすべての区との間に有意な差がみられた。融解 72 時間後では 5%COOH-PLL 区が最も高く、すべての区との間に有意な差がみられた。また、凍結保護材として DMSO を含まず COOH-PLL のみを用いた試験区では 5%COOH-PLL 区が最

も高く、5%COOH-PLL 区、7.5%COOH-PLL 区、10%COOH-PLL 区は 10%DMSO 区よりも有意に高かった。卵丘細胞では、融解 24 時間後では 10%DMSO 区が最も高く、5%DMSO+5%COOH-PLL 区を除くすべての区との間に有意な差がみられた。次いで 5%DMSO+5%COOH-PLL 区が高く、10%DMSO 区を除くすべての区との間に有意な差がみられた。融解 48 時間後では 5%DMSO+5%COOH-PLL 区が最も高く、10%DMSO 区を除くすべての区との間に有意な差がみられた。次いで 25%COOH-PLL 区が高く、10%COOH-PLL 区、20%COOH-PLL 区を除くすべての区との間に有意な差がみられた。融解 72 時間後では 5%DMSO+5%COOH-PLL 区が最も高く、すべての区との間に有意な差がみられた。次いで 25%COOH-PLL 区が高く、10%DMSO 区を除くすべての区との間に有意な差がみられた。また、凍結保護材として DMSO を含まず COOH-PLL のみを用いた試験区では 25%COOH-PLL 区が最も高く、10%DMSO 区よりも高かった。

また、融解 24 時間後のディッシュに接着した細胞の形態を Figure2 に示した。COOH-PLL を用いて凍結した細胞は、非凍結や 10%DMSO 区で凍結した細胞と比較し、形態的な差異はみられなかった。

1.4 考察

本章では細胞、組織の凍結保存の保護材として従来使用されていた DMSO と、新規凍結保護材の COOH-PLL を用いて、ウシ体細胞に対する COOH-PLL の凍結保護効果を調査した。融解後の生存性では、線維芽細胞、卵丘細胞ともに、COOH-PLL は DMSO と同等の凍結保護効果を持つことが示された。また、融解後の増殖性でも、5% DMSO を 5% COOH-PLL に代替し 2 つの凍結保護材を組み合わせることで、DMSO のみと同等もしくはより高い凍結保護効果が示された。さらに、COOH-PLL のみを凍結保護材として使用した場合でも DMSO と同等の凍結保護効果が認められ、かつ線維芽細胞では融解後に COOH-PLL を除去する必要がなく、希釈するだけで播種して良好な細胞増殖が認められた。

細胞の凍結保存には凍結保護材の使用が必須であるが、高濃度の凍結保護材の使用では浸透圧ショックや、凍結保護材自身の毒性により融解後生存性が低下することが知られており [34]、凍結保護材の選択と濃度が重要である。今回調査した COOH-PLL は分子量 5500 の高分子化合物であり、COOH-PLL 溶液の浸透圧は同濃度の DMSO よりも低いことが報告されている [34]。また、マウス結合組織由来 L929 細胞では溶液中の COOH-PLL 濃度が 20%~25%、ヒト皮膚線維芽細胞では溶液中の COOH-PLL 濃度が 25% まで上昇しても細胞毒性が認められなかったことが報告されている [34,55]。本研究においても線維芽細胞では、凍結融解後に凍結保護材を除去しなかった場合、COOH-PLL のみの培地では DMSO を含む培地と比較し、良好な増殖性が認められたことから、ウシ線維芽細胞に対しても

COOH-PLL は DMSO に比べて低毒性であることが示唆された。凍結保護材を除去しない場合、線維芽細胞では 5%COOH-PLL 区が最も増殖性が高く、融解希釈後の培養液中の COOH-PLL 濃度は 1.0%である。一方で卵丘細胞では、融解後の良好な増殖には 25%の COOH-PLL が必要で、融解後、凍結保護材を除去しなかった場合、融解希釈後の培養液中の COOH-PLL 濃度は 5.0%になる。そのため、卵丘細胞の場合、凍結時に必要な COOH-PLL 濃度では融解後希釈するのみでは、細胞に悪影響を与えたことが推察され、融解後に凍結保護材を除去しない場合、希釈濃度を検討することが必要である。

また、従来のように融解後に凍結保護材を除去する場合、COOH-PLL の至適濃度は線維芽細胞では既報の報告[34]と同様に 7.5%であったが、一方で、卵丘細胞では 25%であった。線維芽細胞、卵丘細胞ともに接着系細胞で、培養条件、細胞の増殖スピードも類似した細胞であるが、COOH-PLL の至適濃度には差がみられた。線維芽細胞は耳組織由来で、卵丘細胞は卵子卵丘細胞複合体由来のため、細胞の発生由来により至適濃度が異なることが示唆された。

COOH-PLL を用いて凍結したウシ体細胞は、非凍結の細胞や従来凍結保護材である 10%DMSO で凍結した細胞と比較して、形態学的な差異は認められなかった。さらに、ラット骨髄由来間葉系幹細胞を 7.5%COOH-PLL 溶液で凍結保存し、融解後、分化誘導を行い、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞に正常に分化することも確認されており[34,35]、現在、COOH-PLL が分化誘導に影響を与えるという報告はみられていないことから、ウシの線維

芽細胞および卵丘細胞についても凍結融解の影響は少ないことが示唆された。

本章では、ウシ体細胞の凍結保存に COOH-PLL を用いる可能性について調査した。その結果、COOH-PLL は従来の DMSO と比較して、融解後生存性、増殖性は同等もしくはより高い凍結保護効果を持つことが示された。また、細胞の種類によっては融解後に凍結保護材を除去することなく、希釈するだけで細胞を播種することが可能で、DMSO の代替となる新しい有効な凍結保護材であることが示された。

1.5 図表

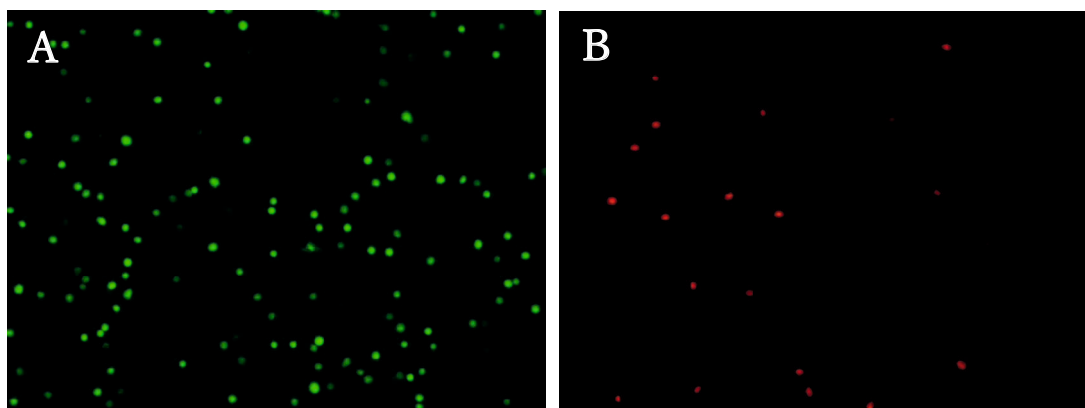


Figure 1. Post-thaw viability of bovine fibroblast cells by fluorescence staining Cell stained green by Calcein-AM judged alive(A) and Cell stained red by EthD-III judged dead(B).

Table 1. Post-thaw viability of bovine fibroblast cells (A) and bovine cumulus cells (B).

(A)

Cryopreservation media	Post-thaw Survival (%)
No cryoprotectant	64.8 ± 8.0 a
10%DMSO (Control)	86.7 ± 1.4 b
5%DMSO+5%COOH-PLL	90.6 ± 2.5 b
5%COOH-PLL	96.5 ± 1.0 b
7.5%COOH-PLL	92.0 ± 1.3 b
10%COOH-PLL	92.3 ± 0.2 b

(B)

Cryopreservation media	Post-thaw Survival (%)
No cryoprotectant	39.0 ± 1.1 a
10%DMSO (Control)	93.7 ± 0.8 b
5%DMSO+5%COOH-PLL	91.8 ± 0.6 b
5%COOH-PLL	89.2 ± 3.0 b
10%COOH-PLL	89.2 ± 2.2 b
20%COOH-PLL	95.3 ± 0.7 b
25%COOH-PLL	91.6 ± 1.5 b
30%COOH-PLL	90.2 ± 1.9 b

Results are mean ± standard error.

a,b; Values lacking a common character in the same column indicate significant difference among the groups ($p < 0.05$).

Table 2. Cell proliferation of bovine fibroblast cells (A) and bovine cumulus cells (B) using the method culturing after removing cryoprotectant.

(A)

Cryopreservation media	Post-thaw proliferation		
	24h	48h	72h
No cryoprotectant	4.8±0.9 b	7.0±1.3 c	29.8±4.0 c
10%DMSO	33.3±1.5 a	87.8±9.8 ab	135.2±10.2 ab
5%DMSO+5%COOH-PLL	32.5±10.0 a	92.7±1.7 ab	183.3±3.3 a
5%COOH-PLL	47.4±5.6 a	79.3±5.0 ab	132.5±7.6 b
7.5%COOH-PLL	38.9±5.7 a	67.3±5.5 b	160.8±4.8 ab
10%COOH-PLL	37.8±2.2 a	95.3±4.6 a	158.8±13.5 ab

(B)

Cryopreservation media	Post-thaw proliferation		
	24h	48h	72h
No cryoprotectant	1.0±0.3 f	2.8±0.6 c	4.7±1.2 d
10%DMSO	65.2±2.7 a	100.3±10.2 a	129.2±3.4 a
5%DMSO+5%COOH-PLL	45.2±3.1 b	87.3±5.0 a	140.7±3.8 a
5%COOH-PLL	4.2±0.2 ef	11.9±2.3 c	26.5±3.3 cd
10%COOH-PLL	10.6±1.2 ef	26.1±5.9 bc	51.8±4.3 bc
20%COOH-PLL	14.8±1.6 de	38.2±3.4 b	63.2±1.6 b
25%COOH-PLL	32.5±1.4 c	79.0±3.3 a	128.7±6.9 a
30%COOH-PLL	21.6±4.1 cd	49.0±1.8 b	79.0±16.8 b

Results are mean ± standard error.

a,b,c,d,e,f; Values lacking a common character in the same column indicate significant difference among the groups ($p < 0.05$).

Table 3. Cell proliferation of bovine fibroblast cells (A) and bovine cumulus cells (B) using the method culturing after not removing cryoprotectant.

(A)

Cryopreservation media	Post-thaw proliferation		
	24h	48h	72h
No cryoprotectant	2.5 ± 0.5 d	6.8 ± 1.6 d	25.9 ± 4.0 d
10%DMSO	26.7 ± 4.7 c	44.2 ± 7.0 c	50.7 ± 10.2 d
5%DMSO+5%COOH-PLL	26.0 ± 2.0 c	45.0 ± 7.6 c	62.5 ± 3.3 cd
5%COOH-PLL	40.0 ± 3.3 b	107.0 ± 8.1 a	182.1 ± 7.6 a
7.5%COOH-PLL	26.2 ± 2.9 c	82.0 ± 5.1 ab	100.4 ± 4.8 bc
10%COOH-PLL	58.5 ± 0.3 a	66.0 ± 6.7 bc	105.5 ± 13.5 b

(B)

Cryopreservation media	Post-thaw proliferation		
	24h	48h	72h
No cryoprotectant	1.7 ± 0.4 e	8.6 ± 1.6 d	7.2 ± 1.9 d
10%DMSO	38.7 ± 1.7 a	41.8 ± 1.2 ab	50.2 ± 2.8 b
5%DMSO+5%COOH-PLL	32.3 ± 3.1 a	55.0 ± 4.8 a	71.2 ± 2.7 a
5%COOH-PLL	11.3 ± 2.0 cd	14.0 ± 1.1 d	24.2 ± 6.2 cd
10%COOH-PLL	17.4 ± 1.2 bc	19.7 ± 3.1 cd	31.7 ± 1.8 c
20%COOH-PLL	15.2 ± 0.6 bcd	19.4 ± 7.1 d	20.2 ± 3.4 cd
25%COOH-PLL	21.3 ± 0.5 b	33.6 ± 2.1 bc	51.3 ± 4.6 b
30%COOH-PLL	9.4 ± 1.2 d	13.1 ± 0.9 d	12.3 ± 2.6 d

Results are mean ± standard error.

a,b,c,d; Values lacking a common character in the same column indicate significant difference

among the groups ($p < 0.05$).

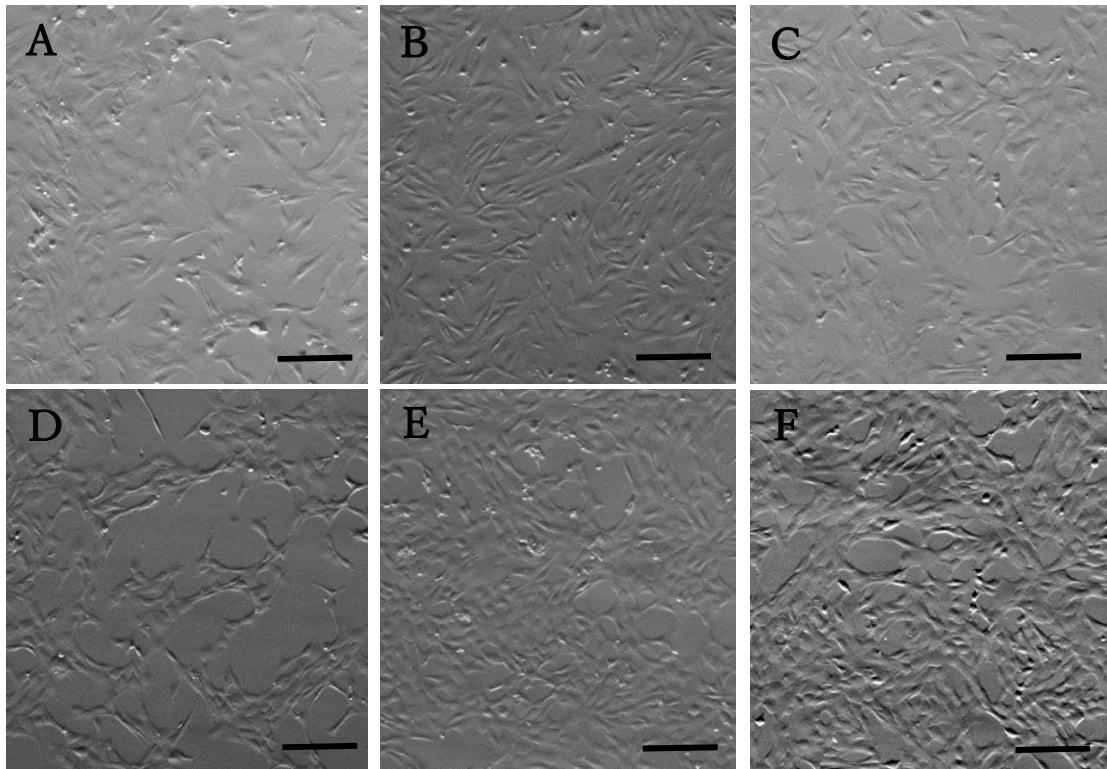


Figure 2. Post-thaw cell morphologies (Cell morphologies after freezing and thawing)

Bovine fibroblast cells cryopreserved with (A) 10% DMSO, (B) 7.5% COOH-PLL at 24 hours and (C) unfrozen control at 24 hours after subculture.

Bovine cumulus cells cryopreserved with (D) 10% DMSO, (E) 25% COOH-PLL at 24 hours and (F) unfrozen control at 24 hours after subculture.

Bar = 50 μ m

第2章

不凍ポリアミノ酸（Carboxylated Poly-L-Lysine）を
凍結保護材としたウシ胚の凍結保存

2.1 緒論

胚を凍結保存することで、長期間の保管とともに長距離輸送が可能になり、供胚ウシと受胎ウシの発情周期が一致しなくとも、受胎ウシの状態に合わせて ET を行うことや、黄体退行法やジェスタージェン投与による卵胞成熟と排卵の抑制を行う発情の同期化により、1 度に多数の受胎ウシを準備し ET を行うことが可能になる。しかし、胚を凍結保存する過程で Gly、EG、PG、DMSO など細胞膜透過性の凍結保護材を含む凍結液に胚を浸漬する必要がある、凍結保護材の化学的な毒性と浸透圧ショックは胚に悪影響を与えることが報告されている [46]。凍結融解の過程でおこる胚への影響はその後の受胎率にも影響を与え [54]、我が国の生体内由来胚の新鮮胚、凍結胚移植の受胎率はそれぞれ 51%、46% で、IVF 胚の新鮮胚、凍結胚移植の受胎率はそれぞれ 41%、39% で、新鮮胚に比べて凍結胚移植の受胎率は数% 低いことが知られている。これらの受胎率の差は胚を凍結したことによる影響と考えられ、国内で約 7.7 万個の体内由来胚と約 1.8 万個の体外由来胚が移植されているが、欧米の様な大規模飼育形態ではなく、1 度に多数の受胎ウシを確保することが困難な飼養形態が多い日本の場合、おのずと凍結胚の使用頻度は高くなり、凍結胚の受胎率を改善する凍結技術の開発は重要である。

現在、野外で ET をする際に広く使用されている緩慢凍結法は約 10% (1.5mol) の凍結保護材を含む溶液に胚を浸漬、10~15 分間平衡し凍結保護材を細胞内に浸透させ、人為的に植氷操作をした後、プログラムフリーザーを用いて 0.3~0.5°C/分の速度で冷却し、-30~

-35°Cに達した後、液体窒素に投入する凍結方法である。徐々に冷却することで最初に細胞外の水分が凍結、濃縮されることで浸透圧差が生じ、持続的に細胞内の水分が脱水される。適度な速度で冷却すれば、胚の細胞内、胚周辺の保存液はガラス化されて、液体窒素中に移しても氷晶が形成されずに保存が可能となる。冷却速度が速すぎると脱水が不十分で細胞内に氷晶が形成され、また遅すぎると浸透圧障害を招き、融解後の胚の生存性が低下する。凍結保護材を含む溶液に胚を浸漬し凍結した胚は、融解後に再水和により水分が細胞内に流入するため、胚が膨張し、浸透圧によるダメージを受ける。そのため融解後に段階希釈等の作業を行わないダイレクト法では、融解後に凍結保護材を素早く流出させてウシ胚に対し細胞膜透過性が高いEG[65]を用いることが一般的となっている。

一方で、ガラス化凍結法は、細胞内、細胞周辺だけでなく、保存液全体をガラス化する方法で、冷却速度は200,000°C/分以上にもなり、凍結時に氷晶が形成されないため、融解後生存性が高いが、極端に冷却速度を速くしないといけないため、凍結液量を少なくすることが必要で、クライオトップ法[29]やクライオループ法[30]、Open pulled straw法[67]、マイクロドロップレット法[44]など様々な凍結法、デバイスが開発されている。しかし、ガラス化凍結では、胚は30~50%の高濃度の凍結保護材を含む溶液に暴露され、厳密な時間管理や凍結融解時には段階的に凍結保護材を除去する等の操作が必要である程度の技術を必要とするため、野外では実用化されていない。しかし、融解後生存性は緩慢凍結法よりも高く、胚移植後の受胎率も高いため[54]、ガラス化凍結した胚を臨床現場で、融解、直接移植

するための試みとして、クライオトップ法でガラス化凍結した胚をストロー内で融解する方法やストロー内でガラス化保存する方法が報告されている[21]。本章では COOH-PLL をウシ胚の凍結保護材として用いて、緩慢凍結法、クライオトップを用いたガラス化凍結法、ストロー内希釈を用いたガラス化凍結法に対する有効性を調査した。

2.2 材料と方法

2.2.1 卵子採取と体外成熟培養 (Oocyte collection and *in vitro* maturation : IVM)

鹿児島県内の食肉処理場で屠畜された黒毛和種雌ウシの卵巣を生理食塩水で洗浄後、実験室まで室温下で採取後5時間以内に持ち帰った。以下、卵巣、卵子の処理は実験室の定法[28]に準じて行った。実験室に到着した卵巣は卵巣周囲の組織を切除し、37°Cに温めた生理食塩水で3回、70%エタノールで1回洗浄し、生理食塩水を入れたビーカーに入れて、37°Cのウォーターバス内に静置した。18G注射針(00801, TOP CORPORATION, Japan)と10mlディスポーザブルシリンジ(08648, NIPRO CORPORATION, Japan)を用いて2-8mm径の卵胞から卵胞液を吸引することで卵子を採取した。その後、実体顕微鏡下で顆粒膜細胞、卵丘細胞が数層にわたり付着している卵子卵丘細胞複合体(Cumulus-Oocyte Complex : COCs)を選別し、以下の処理を行った。COCsは5 mM NaHCO₃(312-13, Nacalai Tesque, Japan)、1 mg/ml Polyvinyl alcohol (P8136, Sigma Chemical Ltd., USA)、抗生物質(100 U/ml Penicillin G (Meiji Seika Pharma Co., Ltd., Japan)、100 µg/ml Streptomycin (Meiji Seika Pharma Co., Ltd., Japan)を添加したTCM199(31100-027, Thermo Fisher Scientific K.K., Japan)で2回洗浄した後、10%FBS、1 µg/ml Estradiol (E8875, Sigma Chemical Ltd., USA)、0.02 AU/ml Follicle stimulating hormone (アントリン・10, Kyoritsu Seiyaku Corporation, Japan)、抗生物質を添加したTCM199(12340-030, Thermo Fisher Scientific K.K., Japan)で2回洗浄し、その後、35mm ペトリディッシュ(1008, Falcon, Becton-Dickinson, USA)

に組織培養用流動パラフィン (26137-85, Nacalai Tesque, Japan) を重層した 100 μ l のドロップに 30 個前後の COCs を投入し、20~22 時間 IVM を行った。IVM には 38.5°C、飽和水蒸気下で 5%CO₂ の気相下のインキュベーターを用いた。

2.2.2 体外受精 (*in vitro* fertilization : IVF)

IVF も実験室の定法に準じ[28]、1 頭の雄ウシ (政忠幸) の 1 射出精液を用いて生産された凍結精液を用いた。37°C の温湯で融解された精液は 20 mM Caffeine (C0750, Sigma Chemical Ltd., USA)、20 mg/ml ウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin : BSA, A8806, Sigma Chemical Ltd., USA)、10 単位/ml ヘパリン (873334, Yoshindo Inc., Japan) を添加した Modified Brackett-Oliphant medium (m-BO) [5] で希釈、2 回洗浄し、35mm ペトリディッシュに組織培養用流動パラフィンを重層した 100 μ l の媒精液のドロップ 1 個当たり 20-30 個を投入して、6 時間、38.5°C、飽和水蒸気下で 5%CO₂ の気相下のインキュベーター内に静置した。媒精時の精子濃度は 1000 万 sperm/ml に調整した。

2.2.3 体外発生培養 (*in vitro* culture : IVC)

媒精 6 時間後の COCs はピペッティングで卵丘細胞を軽くはがした後、3 mg/ml ウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin : BSA, A6003, Sigma Chemical Ltd., USA) を添加した CR1aa medium[51] (CR1-BSA) で 3 回洗浄した後、同培地 100 μ l ドロップ 1 個当たり

20 個を投入し、培養を行った。IVF から 48 時間後に COCs に付着した卵丘細胞をピペッティングによりすべて剥がし、卵割した胚は 5%FBS を添加した CR1aa medium (CR1-FBS) で 3 回洗浄し、同培地 100 μ l ドロップ 1 個当たり 20 個を投入し、IVF から 8 日間まで培養を行った。すべての IVC は 38.5°C、飽和水蒸気下で 5%CO₂、5%O₂、90%N₂ の気相下のインキュベーターを使用した。上記の方法で発生した 8 日目の胚盤胞のうち、国際胚移植技術学会(International embryo technology society : IETS)の評価方法に準じ[61]、Code I に分類された胚を凍結試験に供試した。

2.2.4 胚の緩慢凍結、融解および生存性

発生した胚について、緩慢凍結法により凍結保存を行った。Control 区の凍結液には Kubota らの方法を用い[28]、5%EG (v/v) (15209-85, Nacalai Tesque, Japan)、6%PG (v/v) (29218-35, Nacalai Tesque, Japan)、0.1 mol sucrose (30404-45, Nacalai Tesque, Japan)、20%FBS を添加した D-PBS を用いた。試験区の凍結液は Control 区にそれぞれ 1%、3%、7% (w/v) の COOH-PLL を添加した Control+1%COOH-PLL 区、Control+3%COOH-PLL 区、Control+7%COOH-PLL 区と 5%EG+7%COOH-PLL 区、6%PG+7%COOH-PLL 区、7%COOH-PLL 区の 6 つとした (Table4)。発生した胚は実験室の定法に準じて [28]、20%FBS 添加 D-PBS (洗浄液) で 2 回洗浄した後、凍結液中に移し、Figure3 のように 0.25ml 胚用ストロー (006300-ZT481, IVM, France) に封入した。すべての胚を封入

後、プログラムフリーザー (ET-1N, Fujihira Industry, Co., Ltd., Japan) のコラムにセットし、液体窒素で冷却したピンセットでストローを触れ、 $-6\sim-7^{\circ}\text{C}$ で植氷した。胚を凍結液に投入してからストローを植氷するまでの平衡時間は 15 分とした。ストローは植氷後 10 分間静置し、胚を封入した層が植氷されていることを確認し、 -30°C まで $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の速度で冷却し、 -30°C に達した後、液体窒素に投入した(Figure3)。凍結後のストローは液体窒素ボンベ内で 1 週間以上保存した後、融解して生存性を確認した。凍結ストローは液体窒素ボンベから取り出し、空中で 5 秒間保持した後、 35°C の温湯中に 15 秒間浸漬して融解し、洗浄液 2.5ml (35mm ペトリディッシュ) 中にストロー内液を排出し、排出された胚を 10% FBS、 $100\ \mu\text{mol}$ β -mercaptoethanol (214-38, Nacalai Tesque, Japan)、抗生物質を添加した TCM199 (凍結融解胚培養液) で 3 回洗浄し、組織培養用流動パラフィンで重層した同培地 100 μl に 10 個前後投入し、以降 72 時間後までの胚の生存性を調査した。培養は 38.5°C 、飽和水蒸気下で 5% CO_2 、5% O_2 、90% N_2 の気相下のインキュベーターを使用し、胞胚腔が再拡張した胚を生存として、透明体から脱出した胚を脱出胚として記録した。

2.2.5 胚のガラス化凍結、融解および生存性

発生した胚について、Cryotop 法のデバイスを使用してガラス化凍結を行った[29]。Control 区のガラス化凍結液には Inaba らの方法を用い[21]、平衡液(Equilibration solution: ES) は、7.5%DMSO、7.5%EG、20%FBS を添加した D-PBS を、ガラス化液 (Vitrification

solution : VS) は 16.5%DMSO、16.5%EG、0.5mol sucrose、20%FBS を添加した D-PBS を用いた。試験区の凍結液は ES が 7.5%EG と 7.5%COOH-PLL、VS が 16.5%EG と 16.5%COOH-PLL からなる E16.5CP16.5 区、ES が 7.5%EG と 5.0%COOH-PLL、VS が 16.5%EG と 11.0%COOH-PLL からなる E16.5CP11.0 区、ES が 7.5%EG と 2.5%COOH-PLL、VS が 16.5%EG と 5.5%COOH-PLL からなる E16.5CP5.5 区、ES が 7.5%EG と 1.0%COOH-PLL、VS が 16.5%EG と 2.5%COOH-PLL からなる E16.5CP2.5 区、ES が 5.0%COOH-PLL、VS が 11.0%COOH-PLL からなる CP11.0 区、ES が 15.0%COOH-PLL、VS が 33.0%COOH-PLL からなる CP33.0 区の 6 つとした (Table5)。また、すべての試験区は Control 区と同様に ES には 20%FBS を、VS には 0.5 mol sucrose と 20%FBS を添加した。洗浄液 (前述 2.2.4) で洗浄した胚を、ES に 3 分間浸漬後、VS に投入し、1 分以内にクライオトップ (81116, KITAZATO Corporation, Japan) の先端にのせ、液体窒素中に投入した。クライオトップはプラスチックカバーをつけ、液体窒素中で 1 週間以上保存した後、融解後の生存性を調査した。融解は、予め 38.5°C のインキュベーター内で温めておいた、0.3mol sucrose、20%FBS を添加した D-PBS (融解液) 4.0ml (35mm ペトリディッシュ) 中に、クライオトップの先端を液体窒素から素早く浸漬させ、ディッシュ内に胚を投入した。投入された胚は、融解液の中で 35°C、5 分間平衡し、凍結融解胚培養液 (前述 2.2.4) で 3 回洗浄し、組織培養用流動パラフィンで重層した同培地 100 μ l に 10 個前後投入し、以降 72 時間後までの胚の生存性を調査した。培養条件、凍結融解胚の生存性の評価方法は 2.2.4 に準

じて行った。

2.2.6 胚のガラス化凍結、融解および生存性（ストロー内希釈法）

発生した胚について、Inaba らの報告に準じて[21]、ストロー内希釈ガラス化法によりガラス化凍結を行った。平衡液 1 (Equilibration solution : ES1) は、10%Gly (17017-35, Nacalai Tesque, Japan)、0.1mol sucrose、0.1mol xylose (36719-55, Nacalai Tesque, Japan)、20% FBS を添加した D-PBS を、平衡液 2 (ES2) は、10%Gly、10%EG、0.2mol sucrose、0.2mol xylose、20%FBS を添加した D-PBS を、ガラス化液 (Vitrification solution : VS) は 10%Gly、30%EG、0.3mol sucrose、0.3mol xylose、20%FBS を添加した D-PBS を Control 区のガラス化凍結液とした。試験区の凍結液は ES1 が 5%Gly と 5%COOH-PLL、ES2 が 5%Gly と 5%COOH-PLL と 10%EG、VS が 5%Gly と 5%COOH-PLL と 30%EG からなる G5CP5E30 区、ES1 が 5%Gly と 2.5%COOH-PLL、ES2 が 5%Gly と 2.5%COOH-PLL と 10%EG、VS が 5%Gly と 2.5%COOH-PLL と 30%EG からなる G5CP2.5E30 区、ES1 が 5%Gly と 1.25%COOH-PLL、ES2 が 5%Gly と 1.25%COOH-PLL と 10%EG、VS が 5%Gly と 1.25%COOH-PLL と 30%EG からなる G5CP1.25E30 区の 3 つとした (Table6)。また、すべての試験区は Control 区と同様に ES1 には 0.1mol sucrose、0.1mol xylose、20%FBS を、ES2 には 0.2mol sucrose、0.2mol xylose、20%FBS を、VS には 0.3mol sucrose、0.3mol xylose、20%FBS を添加した。洗浄液 (前述 2.2.4) で洗浄した胚は ES1 に 5 分間、ES2 に

2 分間浸漬後、VS に投入し、1 分以内に Figure4 のようにストロー内に封入し、ストロー先端部をヒートシールで密封した後、液体窒素中に投入した。ストローは液体窒素ボンベ内で 1 週間以上保存した後、融解して胚の生存性を確認した。融解は、凍結ストローを液体窒素ボンベから取り出し、空中で 6 秒間保持した後、30°C の温湯中に 7 秒間浸漬して融解し、ヒートシール部を先にして、すべての層が混ざるように 2~3 回振り下ろした。その後、30°C の温湯内で 1 分間ストローを直立させ、胚がストローの中間部に移動していることを確認し、洗浄液 2.5ml (35mm ペトリディッシュ) 中にストロー内液を排出し、排出された胚を凍結融解胚培養液 (前述 2.2.4) で 3 回洗浄し、組織培養用流動パラフィンで重層した同培地 100 μ l に 10 個前後投入し、以降 72 時間後までの胚の生存性を調査した。培養条件、凍結融解胚の生存性の評価方法は 2.2.4 に準じて行った。

2.2.7 生体内由来凍結胚の移植試験 (緩慢凍結法)

過剰排卵処置を行った黒毛和種雌ウシから、人工授精後 7 日目に生体内由来胚を非外科的に採取した。胚は上記の緩慢凍結法の方法に従い、Control 区と Control+7%COOH-PLL 区の 2 つの試験区で凍結した。凍結胚の移植は触診で明瞭な黄体が確認できた、発情後 6~8 日目の受胚ウシの黄体側に非外科的に行った。受胚ウシの妊娠鑑定は移植後 40~50 日に触診と超音波画像診断装置 (HS-101V, HONDA ELECTRONICS CO.,LTD., Japan) を用いて行った。凍結、移植に供試した胚は、萎縮または後期桑実胚から初期胚盤胞までのステ

ージかつ、IETS の評価方法に準じ[61]Code I に分類された胚を使用した。

2.2.8 統計処理

すべてのデータは平均値で示し、 χ^2 検定を用いて有意差検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差有りとした。

2.3 結果

緩慢凍結法による胚（IVF 胚）の融解後生存性の結果を Table7 に示した。Control 区と比較して Control+3%COOH-PLL 区と Control 区+7%COOH-PLL 区では融解直後、24 時間、48 時間後の生存率と融解後 72 時間後までの透明体脱出率が向上したが、有意な差はみられなかった。5%EG+7%COOH-PLL 区、6%PG+7%COOH-PLL 区では Control 区と比較して融解直後、7%COOH-PLL 区では Control 区と比較して融解直後、24 時間後の生存率は有意に低下した。

クライオトップ法によるガラス化凍結胚（IVF 胚）の融解後生存性の結果を Table8 に示した。Control 区と比較して E16.5CP11.0 区では融解 24 時間後、E16.5CP5.5 区では融解 48 時間後の生存率と融解 72 時間後までの透明体脱出率が有意に向上した。CP11.0 区、CP33.0 区では Control 区と比較して、融解直後、24 時間、48 時間後の生存率、72 時間後までの透明体脱出率は有意に低下した。

ストロー内希釈法によるガラス化凍結胚（IVF 胚）の融解後生存性の結果を Table9 に示した。Control 区と比較して G5CP1.25E30 区では融解 48 時間後の生存率と融解 72 時間後までの透明体脱出率が向上したが、有意な差はみられなかった。G5CP5E30 区、G5CP2.5E30 区では、Control 区と比較して融解 24 時間後の生存率は有意に低下した。

緩慢凍結法による生体内由来凍結胚の移植結果を Table10 に示した。Control 区では 49 個の凍結胚が移植され、15 頭が妊娠し(30.6%)、Control+7%COOH-PLL 区では 93 個の

凍結胚が移植され、42 頭が妊娠したが(45.2%)、有意な差はみられなかった (p=0.066)

2.4 考察

本章では胚の凍結保存に使用されていた従来の凍結保護材である Gly、EG、PG、DMSO と新規凍結保護材である COOH-PLL を用いて、ウシ胚に対する COOH-PLL の凍結保護効果の有効性について調査した。その結果、緩慢凍結によるダイレクト法では、*in vitro* において体外由来胚の融解後の生存性の改善はみられなかったが、体内胚由来の凍結胚移植の受胎率では向上する傾向がみられた (30.6% vs 45.2%, $p=0.066$)。ウシ胚に対する COOH-PLL の凍結保護効果に関する研究はこれまでに報告されていないが、マウス卵子をガラス化凍結した報告[73]で、ガラス化凍結した卵子の *in vitro* での胚盤胞発生率は EG のみを使用した対照区と差はなかったが、融解後に IVF を行った 2 細胞期の胚を移植したところ、対照区と比較し、有意に多い産子を得たと報告している。その要因の 1 つとして、COOH-PLL を用いた卵子のガラス化凍結では、胚盤胞以降の *in vivo* での発生能に影響を与える可能性があるとしている。今回のウシ胚では桑実胚から胚盤胞で凍結しており、凍結時のステージは異なるが、同様の効果が得られている可能性がある。また、今回、*in vitro* の融解試験は IVF 胚を、*in vivo* の移植試験は生体内由来胚を供試している。生体内由来胚と IVF 胚は発生した胚盤胞の品質には差があり[22]、凍結に対する耐凍能が異なり[62]、受胎率も異なること[42]から、生体内胚と IVF 胚の違いについて、更なる検討が必要である。

今回、クライオトップ法では DMSO を COOH-PLL に代替することで、融解後の生存性、透明体脱出率が有意に向上した。ストロー内希釈法では、Gly を COOH-PLL に一部代

替することで、融解後生存性、透明体脱出率の改善は認められなかったが、Control 区と同等の成績がみられた。DMSO はマウス前核期胚に対し、小胞体ストレス応答遺伝子の発現を増加させ、その結果、濃度依存的に胚発生を抑制させるため[26]、胚に対し毒性があると考えられ、DMSO をすべて COOH-PLL に代替できたことで、融解後生存率、透明体脱出率が向上したと考えられた。また EG、Gly、PG はブタ胚盤胞期胚に対し、生存率を低下させ、DNA の断片化を増加させることが報告されている[50]ため、Gly を一部 COOH-PLL に代替し、生存性を維持できたことも、*in vivo* における受胎率の向上が期待できる。また、Watanabe らは細胞膜透過性の凍結保護材の濃度を低下すること、もしくは COOH-PLL を添加することで浸透圧の急激な上昇を和らぐことができる可能性があるとしている[73]。

また、COOH-PLL は不凍タンパク質と類似した性質を持つことが報告されている。いくつかの不凍タンパク質は凝固点を低下させ、氷晶のプリズム面に結合し、細胞内に形成される氷晶の成長や再結晶化を抑制し、凍結時の細胞膜への損傷を減少する、細胞膜保護の特性が報告されている[18,69]。COOH-PLL も不凍タンパク質と同様に、氷晶のプリズム面に結合することで、凍結時の氷晶の成長を抑制する性質があることが報告されており[18]、ウシ胚においても凍結時の損傷が減少したと示唆された。

第 1 章での体細胞に対しては、従来の凍結保護材を使用せずに、COOH-PLL のみで凍結保存が可能であったが、胚の体積は体細胞に比べて大きく、COOH-PLL は細胞膜非透過性の凍結保護材で、単独で使用した場合、十分な細胞内脱水が起きず、細胞内に氷晶が形成さ

れ、融解後生存性の低下が起こったと考えられる。

生殖細胞のガラス化凍結に COOH-PLL を使用した報告では、マウス卵子[73]では EG の一部代替として使用し、有意に多い産子数を、マウス前核期胚[59]では DMSO の代替として使用し、有意に高い脱出胚盤胞率と産子数を、ブタ前核期胚[25]では EG の濃度を変えずに COOH-PLL を加えることで、有意に高い胚盤胞発生率を得ており、胚や卵子のガラス化凍結の場合、COOH-PLL は従来の凍結保護材と組み合わせて使用することが、ウシ胚でも同様に必要である。COOH-PLL をウシ胚の凍結保護材として使用した場合、従来の方法と比較して、融解後生存性は同等もしくはより高い凍結保護効果を持つことが示され、従来の凍結保護材の代替となる新しい凍結保護材であることが示された。また、現在、ガラス化凍結された IVF 胚の移植試験を実施しており、その結果が待たれる。

2.5 図表

Table 4. Composition of cryopreservation media for slow rate freezing.

Cryopreservation media	EG (v/v, %)	PG (v/v, %)	COOH-PLL (w/v, %)	sucrose (mol)	FBS (v/v, %)
Control	5	6	-	0.1	20
Control + 1%COOH-PLL	5	6	1	0.1	20
Control + 3%COOH-PLL	5	6	3	0.1	20
Control + 7%COOH-PLL	5	6	7	0.1	20
5%EG + 7%COOH-PLL	5	-	7	0.1	20
6%PG + 7%COOH-PLL	-	6	7	0.1	20
7%COOH-PLL	-	-	7	0.1	20

EG : Ethylene glycol, PG : Propylene glycol, COOH-PLL : Carboxylated Poly-L-Lysine

FBS : Fetal bovine serum

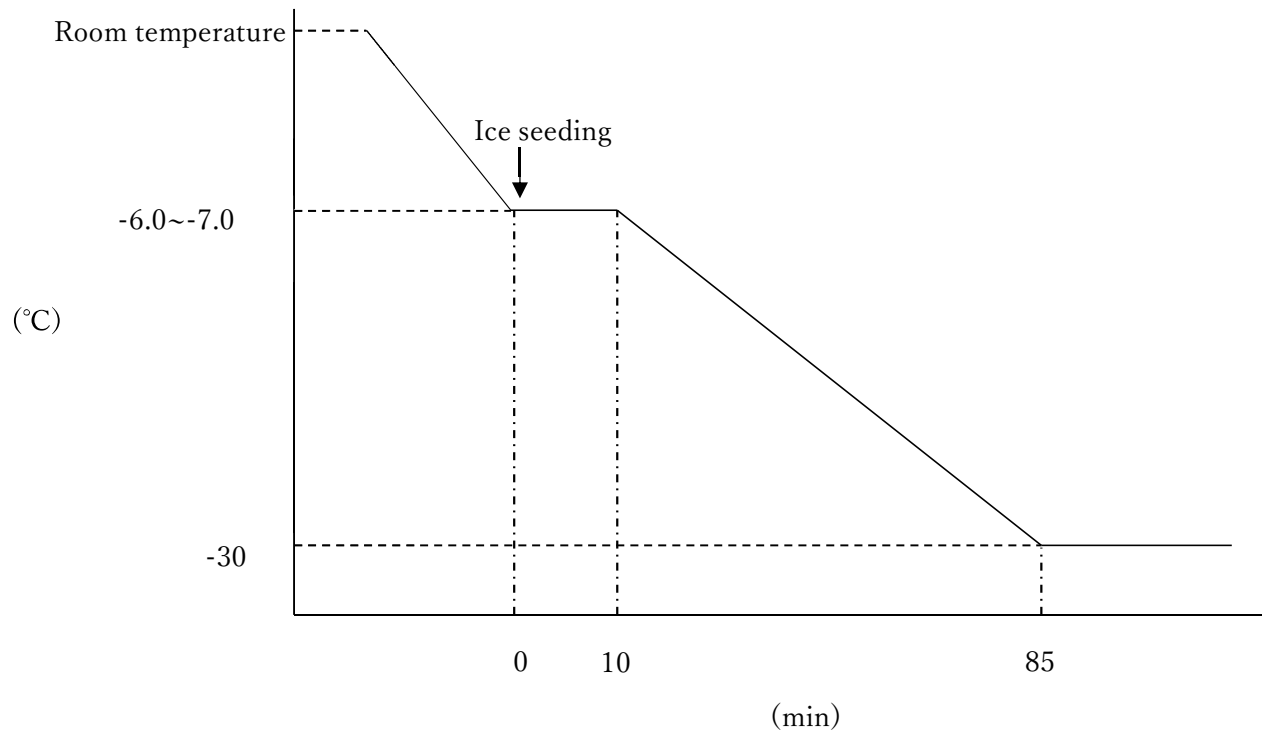
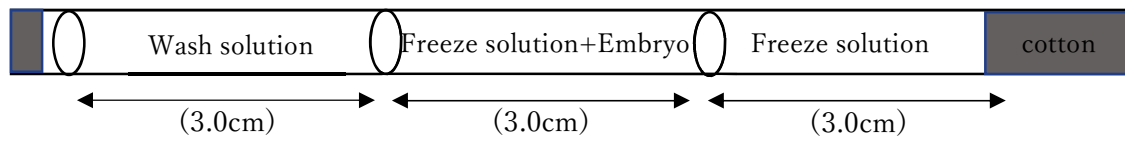


Figure 3. Composition of freezing straw and temperature transition (Slow freezing method).

Table 5. Composition of cryopreservation media for vitrification by Cryotop.

Cryopreservation media	ES ¹	VS ²
E16.5DM16.5 (Control)	7.5%EG+7.5%DMSO	16.5%EG+16.5%DMSO
E16.5CP16.5	7.5%EG+7.5%COOH-PLL	16.5%EG+16.5%COOH-PLL
E16.5CP11.0	7.5%EG+5.0%COOH-PLL	16.5%EG+11.0%COOH-PLL
E16.5CP5.5	7.5%EG+2.5%COOH-PLL	16.5%EG+5.5%COOH-PLL
E16.5CP2.2	7.5%EG+1.0%COOH-PLL	16.5%EG+2.5%COOH-PLL
CP11.0	5.0%COOH-PLL	11.0%COOH-PLL
CP33.0	15.0%COOH-PLL	33.0%COOH-PLL

1 These equilibration solutions were added to D-PBS supplemented with 20%FBS.

2 These vitrification solutions were added to D-PBS supplemented with 20%FBS and 0.5mol sucrose.

DMSO : Dimethyl sulfoxide, EG : Ethylene glycol, COOH-PLL : Carboxylated Poly-L-Lysine

FBS : Fetal bovine serum

Table 6. Composition of cryopreservation media for vitrification by in-straw dilution.

Cryopreservation media	ES1 ¹	ES2 ²	VS ³
G10E30 (Control)	10%Gly	10%Gly+10%EG	10%Gly+30%EG
G5CP5E30	5%Gly+5%COOH-PLL	5%Gly+5%COOH-PLL +10%EG	5%Gly+5%COOH-PLL +30%EG
G5CP2.5E30	5%Gly+2.5%COOH-PLL	5%Gly+2.5%COOH-PLL +10%EG	5%Gly+2.5%COOH-PLL +30%EG
G5C1.25CP30E	5%Gly+1.25%COOH-PLL	5%Gly+1.25%COOH-PLL +10%EG	5%Gly+1.25%COOH-PLL +30%EG

1 These equilibration solutions 1 (ES1) were added to D-PBS supplemented with 20%FBS, 0.1mol sucrose and 0.1mol xylose.

2 These equilibration solutions 2 (ES2) were added to D-PBS supplemented with 20%FBS, 0.2mol sucrose and 0.2mol xylose.

3 These vitrification solutions (VS) were added to D-PBS supplemented with 20%FBS, 0.3mol sucrose and 0.3mol xylose.

Gly : Glycerol, EG : Ethylene glycol, COOH-PLL: Carboxylated Poly-L-Lysine

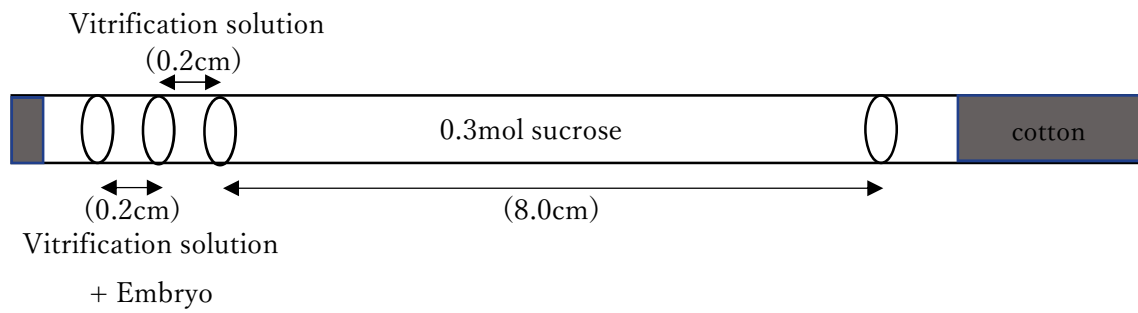


Figure 4. Composition of freezing straw (Vitrification method).

Table 7. Survival and hatched rate of frozen-thawed embryos by slow rate freezing.

Cryopreservation media	Post-thaw Survival (%)				Hatched (%)
	n	0h	24h	48h	~72h
Control	43	37(86.0) a	12(27.9) ab	5(11.6) ab	3(4.3)
Control + 1%COOH-PLL	41	40(97.6) a	5(12.2) bc	4(9.8) ab	2(4.9)
Control + 3%COOH-PLL	52	47(90.4) a	19(36.5) a	11(21.2) a	5(9.6)
Control + 7%COOH-PLL	82	78(95.1) a	33(40.2) a	15(18.3) a	5(6.1)
5%EG + 7%COOH-PLL	63	32(50.8) b	6(9.5) bc	1(1.6) b	0(0)
6%PG + 7%COOH-PLL	52	30(57.7) b	5(9.6) bc	0(0) b	0(0)
7%COOH-PLL	60	10(16.7) c	2(3.3) c	1(1.7) b	0(0)

a,b,c; Values lacking a common character in the same column indicate significant difference among the groups ($p < 0.05$).

EG : Ethylene glycol, PG : Propylene glycol, COOH-PLL: Carboxylated Poly-L-Lysine

Table 8. Survival and hatched rate of frozen-thawed embryos by Cryotop vitrification.

Cryopreservation media	Post-thaw Survival (%)				Hatched (%)
	n	0h	24h	48h	~72h
E16.5DM16.5 (Control)	90	81(90.0) a	49(54.4) b	43(47.8) b	21(23.3) b
E16.5CP16.5	47	44(93.6) a	26(55.3) ab	20(42.6) b	6(12.8) bcd
E16.5CP11.0	56	55(98.2) a	42(75.0) a	35(62.5) ab	18(32.1) ab
E16.5CP5.5	54	51(94.4) a	38(70.4) ab	37(68.5) a	24(44.4) a
E16.5CP2.2	54	53(98.1) a	32(59.3) ab	25(46.3) b	11(20.4) bc
CP11.0	46	25(54.3) b	1(2.2) c	0(0.0) c	0(0.0) d
CP33.0	27	14(51.9) b	2(7.4) c	2(7.4) c	0(0.0) cd

a,b,c,d; Values lacking a common character in the same column indicate significant difference among the groups ($p < 0.05$).

Table 9. Survival and hatched rate of frozen-thawed embryos by in-straw dilution vitrification.

Cryopreservation media	Post-thaw Survival (%)				Hatched (%)
	n	0h	24h	48h	~72h
G10E30 (Control)	40	39(97.5)	30(75.0) a	23(57.5)	13(32.5) ab
G5CP5E30	36	35(97.2)	13(36.1) c	12(33.3)	4(11.1) b
G5CP2.5E30	37	35(94.6)	15(40.5) bc	12(32.4)	11(29.7) ab
G5CP1.25E30	21	21(100)	15(71.4) a	13(61.9)	10(47.6) a

a,b; Values lacking a common character in the same column indicate significant difference among the groups ($p < 0.05$).

Table 10. The results of conception rate of embryo transfer (ET).

Cryopreservation media	Number of ET	Conception rate (%)
Control	49	15 (30.6)
Control+7%COOH-PLL	93	42 (45.2)

Control group consisted of 5% ethylene glycol, 6% propylene glycol, 0.1mol sucrose and 20% fetal bovine serum.

COOH-PLL: Carboxylated Poly-L-Lysine

第3章

不凍ポリアミノ酸（Carboxylated Poly-L-Lysine）を
凍結保護材としたウシ精子の凍結保存

3.1 緒論

精子の凍結保存は、不妊治療や種の保存、家畜改良促進の観点からも重要な技術である。

ウシでは1949年にPolgeらが凍結保護材としてGlyを使用し、ウシ精子の凍結保存に初めて成功したことが報告されており[48]、Glyはウシ[3,66]、ウマ[17]、ブタ[20]、イヌ[9]などの家畜やヒト[6]の精子凍結保存において現在でも広く利用されている。ウシでは、凍結精液を使用することで、種雄牛の飼養費の削減、精子の遠隔地への輸送、雄ウシ側からの改良の促進が可能になったが、凍結融解した精液の人工授精の受胎率は自然交配の受胎率よりも低く[31]、この低い受胎率は農家の経済的損失につながる。受胎率の要因には、飼養管理、子宮、卵巣の状態など雌側の条件や、AI実施者による技術的な問題など、様々な条件が含まれるが、精子の凍結融解過程も主要な要因のひとつである。精子の凍結融解過程での、浸透圧ショックや酸化ストレスは精子運動性に影響を与えることが報告されている[47]。ウシ精子においては、GlyやDMSO、EGが凍結保護材として使用され、これらは細胞質内に浸透し、細胞質内の氷晶の形成を抑制することで、精子を保護している。Glyは精子の凍結保護材として、最も広く使用されているが、高濃度で使用すると毒性があること[17]や、他の凍結保護材に比べて、細胞膜透過性が低いため、浸透圧ショックが大きいこと[38]などが問題となる。そのため、EGやDMSOをGlyの代替として用いてGlyと組み合わせることで、凍結融解後生存性を改善する報告がされている[37]が、従来のGlyを用いた方法と比較し同等の効果が得られているものの、劇的な改善はみられていない[7,37,66]。そこで、本章

ではウシ精子を用いて COOH-PLL の有効性を検討した。

3.2 材料と方法

3.2.1 Carboxylated Poly-L-Lysine

1.2.1 参照

3.2.2 種雄牛と精液採取

精液採取時に活発な前進性の運動精子の割合が、70%以上かつ、精子濃度が 1.0×10^9 sperm/ml以上の黒毛和種雄ウシ（6歳齢）1頭（益華福）の精液を供試した。供試牛は鹿児島県肉用牛改良研究所で健全に飼養されており、供試前に一般状態が良好で生殖器疾患がないことを確認した。精液の採取は擬牝台を用いた人工膣法を用いて、週に2回の頻度で行った。

3.2.3 精子の凍結

射出された新鮮な精液は一次希釈液（13.65g トリスヒドロキシアミノメタン（35406-75, Tris(hydroxymethyl)aminomethane, Nacalai Tesque, Japan）、7.625g クエン酸一水和物（09106-15, Citric Acid Monohydrate, Nacalai Tesque, Japan）、3.75g フルクトース（16315-55, D(-)-Fructose, Nacalai Tesque, Japan）、15.0g ラクトース一水和物（20014-65, Lactose Monohydrate, Nacalai Tesque, Japan）、27.0g ラフィノース（188-00013, D(+)-Raffinose Pentahydrate, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan）、20%(v/v)卵黄液

/1000ml 超純水)で 5 倍希釈され、精子希釈液を作製し、2 時間で 10°Cまで冷却した。一次希釈液に 13%の Gly を添加した二次希釈液を精子希釈液に同量加え、3 時間で 4°Cまで冷却した。二次希釈後の最終的な Gly 濃度は 6.5%であった。二次希釈後の精液は 0.5ml ストロー (01123100, FUJIHIRA INDUSTRY CO., LTD., Japan) に詰め、液体窒素の蒸気中で冷却し、20 分間で-170°Cまで冷却した。その後、液体窒素内に投入し、使用まで 1 週間以上保存した。凍結時の精子濃度は 2.8×10^7 sperm/ml であった。COOH-PLL の有効性を検討するために、二次希釈液に異なる濃度の Gly と COOH-PLL を添加した。試験区は 6.5%(v/v) Gly を Control 区 と し 、 6.5%(v/v)Gly+0.5%(w/v)COOH-PLL (6.5%Gly+0.5%COOH-PLL 区) 、 3.25%(v/v)Gly(3.25 % Gly 区) 、 3.25%(v/v)Gly+0.3%(w/v)COOH-PLL (3.25%Gly+0.3%COOH-PLL 区) 、 3.25%(v/v)Gly+0.5%(w/v)COOH-PLL (3.25%Gly+0.5%COOH-PLL 区) 、 0.5%(w/v)COOH-PLL (0.5%COOH-PLL 区)、1.0%(w/v)COOH-PLL (1.0%COOH-PLL 区) の 6 つを試験区とした。

3.2.4 精子運動性と精子膜正常性

精子運動性は精子運動解析装置 (Sperm Motility Analysis System : SMAS) (SMASM 1914110124, Ditect Co., Ltd., Japan)を用いた[4]。評価項目は、運動率 (Motility, %)、前進性運動率 (Progressive Motility, %)、平均速度 (Average path velocity, $\mu\text{m/s}$)、直線速度

(Straight line velocity, $\mu\text{m/s}$)、曲線速度 (Curvilinear velocity, $\mu\text{m/s}$)、頭部振幅 (Amplitude of lateral head displacement, μm) の 6 項目とした。凍結精子は 35°C の水槽内で 10 秒間浸漬し、融解後、専用のチャンバー (MAK-CC, KEN MEDICAL Co., Ltd, Japan) に $7\mu\text{l}$ 滴下し、10 倍の対物レンズを使用し、画像を中継、デジタル化し、SMAS で解析した。

精子膜正常性は既報[76]を改変し行った。LIVE/DEAD Sperm Viability Kit (L7011, Thermo Fisher Scientific K.K., Japan)を用いた。凍結精液を 35°C のウォーターバス内で 10 秒間浸漬、融解後、D-PBS1000 μl に対し、精液 40 μl を加え、希釈、遠心後 (400g、7 分間、 35°C)、上澄みを 840 μl 除去し、洗浄した。精子ペレット 200 μl に対し、SYBR14 (0.02mM) を 1 μl 加え、 38.5°C の CO_2 インキュベーター内で 10 分間インキュベートした。その後、propidium iodide (2.4mM) を 1 μl 加え、さらに 10 分間インキュベートした。最終濃度は SYBR14 が 100nM、propidium iodide は 12 μM であった。インキュベート後、落射蛍光顕微鏡 (BX53, Olympus Corporation, Japan) で観察を行い、精子頭部が緑色に染色された精子を精子膜正常、赤色に染色された精子を精子膜異常と判定した (Figure5)。精子運動性と精子膜正常性はそれぞれ 5 回以上繰り返し、200 以上の精子をカウントした。

3.2.5 精子先体正常性

精子先体の正常性は既報[76]を改変し行った。Fluorescein isothiocyanate-labeled peanut agglutinin (FITC-PNA, L7381, SIGMA-ALDRICH, Japan) 染色を用いた。凍結精液を 35°C

のウォーターバス内で 10 秒間浸漬、融解後、D-PBS800 μ l に対し、精液 200 μ l を加え、希釈、遠心後（400g、7 分間、35 $^{\circ}$ C）、上澄みを 800 μ l 除去し、洗浄した。洗浄後、精子ペレット 200 μ l に対し、D-PBS で 1mg/ml に調整した FITC-PNA50 μ l を加え、37 $^{\circ}$ C の CO₂ インキュベーター内で 10 分間インキュベートした。インキュベート後、落射蛍光顕微鏡で観察を行った。精子先体正常性はそれぞれ 5 回以上繰り返し、100 以上の精子をカウントした (Figure6)。

3.2.6 体外受精後の卵割率、発生率および発育能の評価

体外受精の方法は第 2 章に準じて行った。それぞれの凍結精液を体外受精に使用し、受精後 48 時間での卵割率、その後の胚盤胞までの発生率を調査した。また受精後 8 日目に発生した拡張胚盤胞は二重染色を行い、内部細胞塊 (ICM: Inner cell mass) と栄養膜細胞 (TC: Trophoblast cell) の細胞数をそれぞれカウントした。発生した胚は、0.2% Triton X-100 (10789704001, SIGMA-ALDRICH, Japan)、0.1mg/ml ヨウ化プロピジウム (P21493, Thermo Fisher Scientific K.K., Japan) を添加した D-PBS に室温で 50 秒間浸漬後、25 μ g/ml Hoechst33342 (14533, SIGMA-ALDRICH, Japan) 添加 99.5%エタノールに投入し、4 $^{\circ}$ C で 3 時間染色、固定した。固定した胚は Gly で洗浄し、少量の Gly とともにスライドガラスに移して、カバーガラスに封入した。落射蛍光顕微鏡を用いて観察し、ICM と TC のそれぞれの細胞数を計測した (Figure7)。

3.2.7 人工授精 (Artificial insemination : AI)

明瞭な発情が発見された黒毛和種雌ウシ 77 頭に対し、発情発見後 12 時間後に雌ウシ 1 頭あたり、1 本の凍結精液ストローを用いて、計 111 回の AI を行った。1 農場で 1 人の技術者により、AI は行われ、妊娠診断は人工授精 50 日後に触診と超音波診断装置を用いて行った。

3.2.8 統計処理

すべてのデータは平均値±標準誤差で示し、運動率、前進性運動率、精子生存性はアークサイン変換後に分散分析法と Tukey 法を、平均速度、直線速度、曲線速度、頭部振幅は分散分析法と Tukey 法を、卵割率、胚盤胞発生率、移植結果は χ^2 検定、胚の二重染色は分散分析法を用いて有意差検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

3.3 結果

融解直後の精子運動性の結果を Table11 に示した。3.25%Gly 区、6.5%Gly+0.5%COOH-PLL 区、3.25%Gly+0.3%COOH-PLL 区、3.25%Gly+0.5%COOH-PLL 区ではすべての運動性のパラメーターにおいて、Control 区と比較し有意な差はみられなかった。凍結液に Gly を使用しない、0.5%COOH-PLL 区と 1.0%COOH-PLL 区では、Control 区と比較し、直線速度以外の運動性パラメーターは有意に低値で、凍結液中の COOH-PLL 濃度が上昇するに従い、運動率と前進性運動率は低下した。

融解直後の精子膜正常性の結果を Figure5、Table12 に示した。3.25%Gly+0.3%COOH-PLL 区と 3.25%Gly+0.5%COOH-PLL 区は Control 区と比較し、精子膜正常性が高値を示し、3.25%Gly+0.5%COOH-PLL 区は有意な高値を示した。凍結液に Gly を使用しない、0.5%COOH-PLL 区と 1.0%COOH-PLL 区では、Control 区と比較し、有意な低値を示し、凍結液中の COOH-PLL 濃度が上昇するに従い、精子膜正常性は上昇した。

融解直後の精子先体正常性の結果を Figure6、Table12 に示した。6.5%Gly+0.5%COOH-PLL 区は Control 区よりもやや高値を示したが、先体正常性に有意な差はみられなかった。また、凍結液に Gly を使用しない、0.5%COOH-PLL 区と 1.0%COOH-PLL 区では、その他の区と比較し、有意な低値を示し、凍結液中の COOH-PLL 濃度が上昇するに従い、精子膜正常性は上昇した。

凍結精液を用いた体外受精の結果を Figure8、Table13 に示した。卵割率、胚盤胞発生率

について、Control区とすべての試験区の間に有意な差はみられなかった。1.0%COOH-PLL区では6.5%Gly+0.5%COOH-PLL区、3.25%Gly+0.5%COOH-PLL区と比較し、卵割率が有意に低下した。胚の二重染色では、COOH-PLLを用いた試験区でもControl区と同様にICM、TCが確認できたが、ICM、TC、ICMとTCの合計の細胞数において、Control区と試験区の間には有意な差はみられなかった (Figure7、Table14)。

AIの結果をTable15に示した。Control区では49回のAIが実施され、26頭が妊娠した(53.1%)。3.25%Gly+0.5%COOH-PLL区では62回のAIが実施され、49頭が妊娠し(79.0%)、受胎率は有意に高値を示した。

3.4 考察

本章では精子の凍結保存に使用されていた従来の凍結保護材である Gly と、新規凍結保護材である COOH-PLL を用いて、ウシ精子に対する COOH-PLL の凍結保護効果の有効性について調査した。その結果、従来の凍結保護材である、Gly と COOH-PLL を混合した凍結液は従来の Gly のみの凍結液と比較して、有意に高い受胎率を得ることができた。

肉用牛における AI 受胎率は、平成 26 年度家畜改良事業団の報告によると、52.6%で、今回 Control 区の受胎率 53.1%と同様で、3.25%Gly+0.5%COOH-PLL 区の 79.0%は全国的な AI 受胎率と比較して大きな改善がみられた。

Gly 濃度は 2.5%以上で精子体積の増加、5%以上で細胞膜正常性に影響を与えることが報告されている[17]が、凍結保護効果の点から見ると Gly 濃度を 5%から 3%に減少した場合は運動性、精子膜正常性が低下するため、5%未満の Gly 濃度は凍結保護には不十分だとする報告[3]もある。また、COOH-PLL は Gly などの細胞膜透過性の凍結保護材とは異なる、細胞膜非透過性の凍結保護材で、細胞や卵母細胞の細胞膜に吸着することが報告されており[34,73]、今回、Gly 濃度を 6.5%から 3.25%に半減し、Gly の毒性、浸透圧の上昇を抑制し、COOH-PLL を 0.5%加えることで、細胞膜保護効果が見られ、その結果、融解後運動性、先体膜正常性、体外受精における発生能は従来と同等に維持でき、精子膜正常性が向上したことで、受胎率が向上したと考えられた。第 1 章より、COOH-PLL が融解後、除去することなく、培養液中に 1%程度含まれていても、細胞は良好な増殖を示すことが確認さ

れており、ウシ精子に対しても、凍結液組成中に 0.5%含まれていても、細胞と同様に凍結時の毒性が少ないと推察された。細胞と異なり、COOH-PLL のみの凍結液では、融解後成績について良好な結果が得られなかった。COOH-PLL は胚における凍結と同様に、単独で使用した場合、十分な細胞内脱水が起きず、細胞内に氷晶が形成され、融解後運動性、精子膜正常性、体外受精における発生能（卵割率）の低下が起こったと考えられる。精子に対する COOH-PLL の凍結保護効果に関する研究は現在のところ報告されておらず、細胞膜透過性の凍結保護材との併用と COOH-PLL の至適濃度については更なる検討が必要である。また、Gly と COOH-PLL を用いた 6.5%Gly+0.5%COOH-PLL 区、3.25%Gly+0.3%COOH-PLL 区、3.25%Gly+0.5%COOH-PLL 区と Gly を使用しなかった 0.5%COOH-PLL 区、1.0%COOH-PLL 区では、IVF における発生能は異なるが、Control 区と同様に、Day8 において発生した胚盤胞では ICM、TC が確認でき、COOH-PLL を用いて凍結した精液からも *in vitro* で正常な胚発生が認められた。さらに、授精試験を行い、分娩した子ウシの奇形等は認められず、COOH-PLL は安全な凍結保護材であることも確認された。

3.5 图表

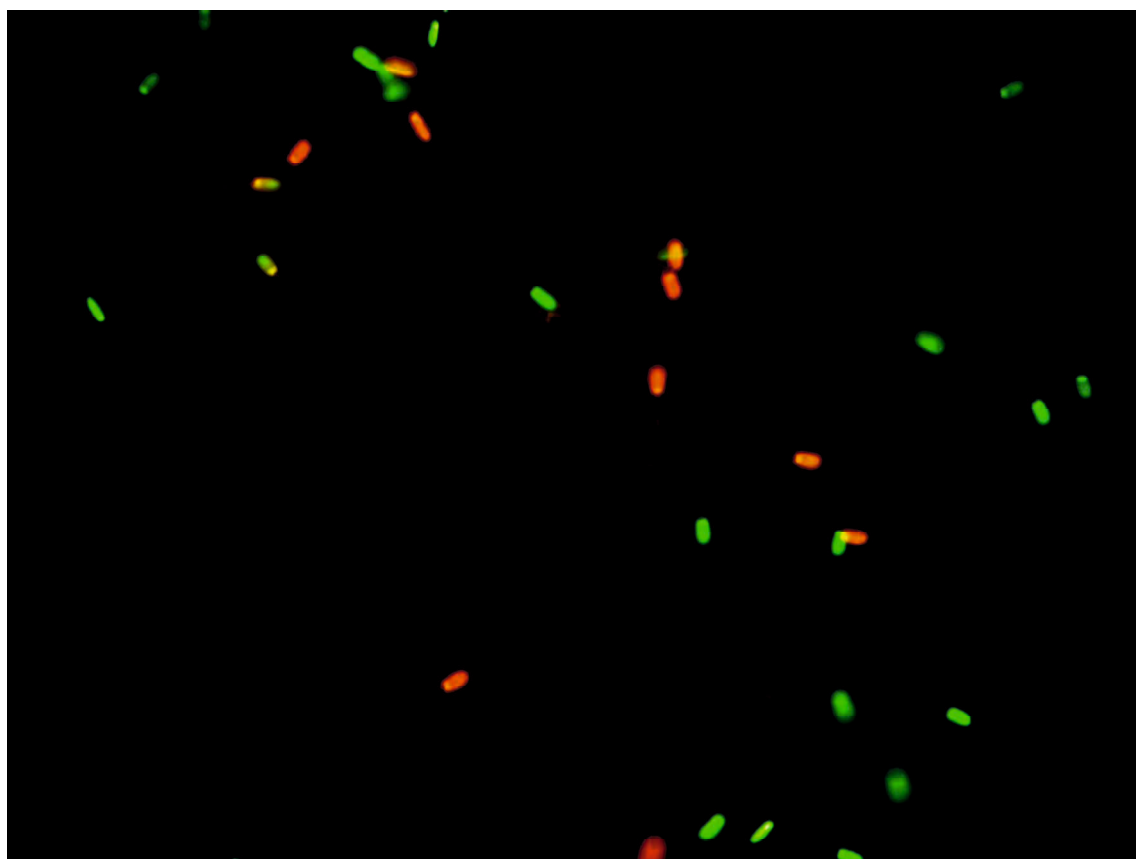


Figure 5. Post-thaw membrane integrity of cryopreserved sperm cells by fluorescence staining.

Sperm membrane stained green by SYBR14 judged intact membrane and sperm membrane stained red by propidium iodide judged defect membrane.

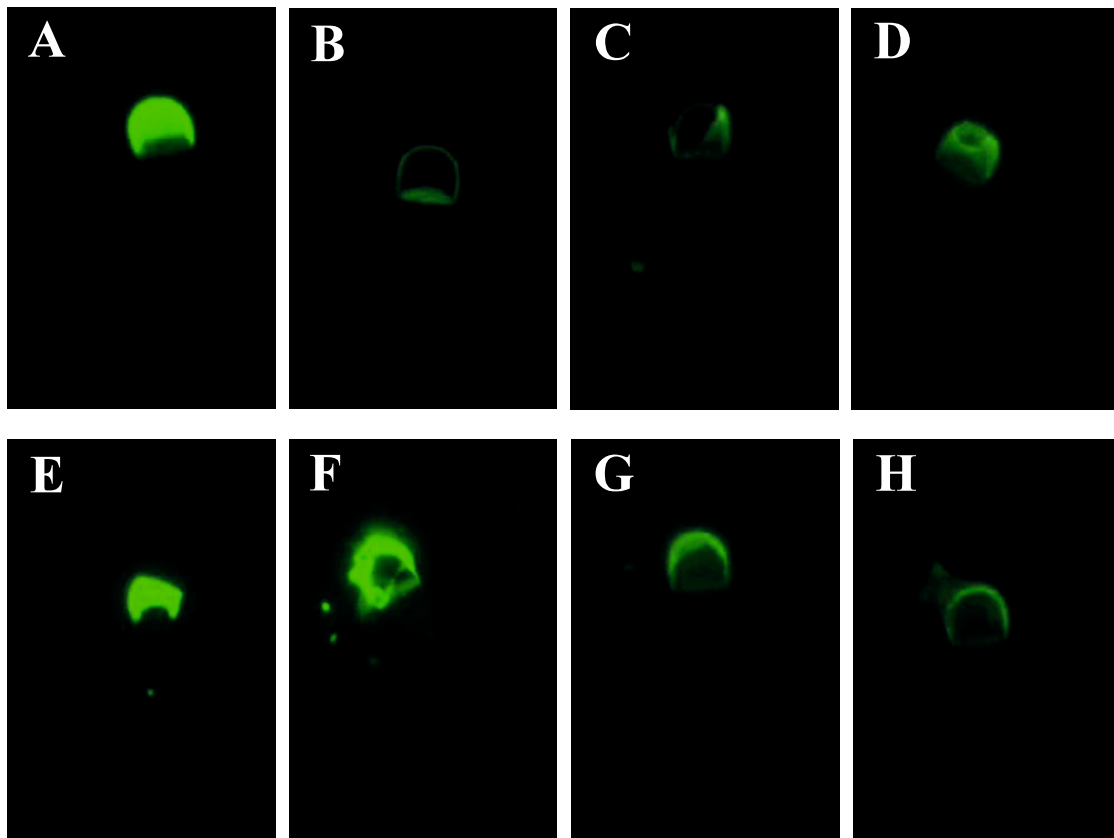


Figure 6. Post-thaw acrosome integrity of cryopreserved sperm cells by fluorescence staining.

Sperm acrosome stained by Fluorescein isothiocyanate-labeled peanut agglutinin.

(A) intact normal acrosome, (B~H) abnormal acrosome

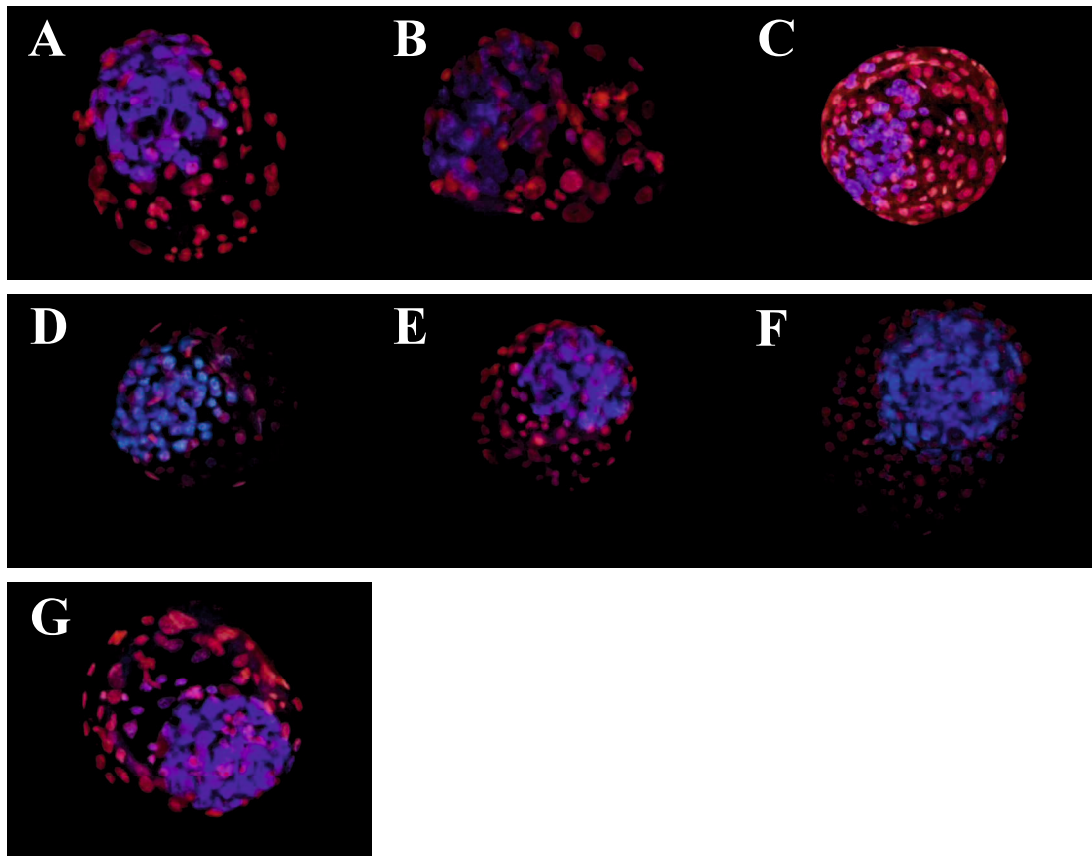


Figure 7. Bovine *in vitro* produced embryos double-stained at day8 fertilized with cryopreserved semen.

(A)6.5%Gly(Control), (B)6.5%Gly+0.5%COOH-PLL, (C)3.25%Gly,
 (D)3.25%Gly+0.3%COOH-PLL, (E)3.25%Gly+0.5%COOH-PLL, (F)0.5%COOH-PLL
 and (G)1.0%COOH-PLL.

Cell stained red by propidium iodide judged trophoblast cells and cell stained blue by hoechst33342 judged inner cell mass.

Gly: Glycerol, COOH-PLL: Carboxylated Poly-L-Lysine

Table 11. The results of sperm motility after frozen-thawed.

Cryopreservation Media	Mot (%)	Prog (%)	VAP (μ m/s)	VSL (μ m/s)	VCL (μ m/s)	AHL (μ m)
6.5%Gly (Control)	88.38 \pm 1.71 a	52.19 \pm 1.53 a	51.85 \pm 1.40 a	33.71 \pm 0.97 ab	86.85 \pm 3.06 a	1.86 \pm 0.08 a
6.5% Gly+0.5%COOH-PLL	75.97 \pm 4.38 a	43.47 \pm 1.89 a	43.15 \pm 1.92 ab	34.15 \pm 1.65 ab	72.19 \pm 3.08 ab	1.64 \pm 0.06 ab
3.25%Gly	74.72 \pm 2.86 a	48.51 \pm 1.74 a	50.42 \pm 1.39 a	38.93 \pm 1.18 a	84.35 \pm 2.14 a	1.86 \pm 0.05 a
3.25%Gly+0.3%COOH-PLL	73.06 \pm 2.71 a	43.80 \pm 1.54 a	49.78 \pm 1.68 a	38.31 \pm 1.40 a	83.67 \pm 2.59 a	1.92 \pm 0.06 a
3.25%Gly+0.5%COOH-PLL	79.46 \pm 1.67 a	51.37 \pm 1.43 a	46.37 \pm 1.24 a	36.54 \pm 0.93 a	75.01 \pm 1.52 a	1.58 \pm 0.03 abc
0.5%COOH-PLL	45.79 \pm 2.04 b	20.44 \pm 1.04 b	34.37 \pm 1.23 b	27.19 \pm 1.10 b	59.11 \pm 1.89 b	1.28 \pm 0.04 c
1.0%COOH-PLL	40.78 \pm 0.83 b	19.10 \pm 0.84 b	35.38 \pm 0.82 b	27.93 \pm 0.84 b	62.08 \pm 1.09 b	1.39 \pm 0.02 bc

The parameters of motile sperm (Mot), progressively motile sperm (Prog), average path velocity (VAP), straight line velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL) and amplitude of lateral head displacement (AHL) were shown when bull sperm was frozen with 7 different cryopreservation media.

a,b,c; Values lacking a common character in the same column indicate significant difference among the groups ($p < 0.05$).

Gly: Glycerol, COOH-PLL: Carboxylated Poly-L-Lysine

Test was replicated over 6 times and over 300 sperms were analyzed each time.

Table 12. The results of sperm plasma membrane integrity rate and acrosome integrity rate after frozen-thawed.

Cryopreservation media	Membrane integrity (%)	Acrosome integrity (%)
6.5%Gly (Control)	49.8±3.4 b	72.1±2.7 a
6.5%Gly+0.5%COOH-PLL	46.7±3.3 bc	72.3±6.0 a
3.25%Gly	48.5±3.1 bc	68.3±3.4 a
3.25%Gly+0.3%COOH-PLL	56.8±2.5 ab	70.8±2.0 a
3.25%Gly+0.5%COOH-PLL	61.0±1.4 a	70.5±5.0 a
0.5%COOH-PLL	30.5±3.2 d	57.7±1.6 b
1.0%COOH-PLL	37.3±3.4 cd	59.6±2.5 b

a,b,c,d; Values lacking a common character indicate significant difference among the group (p < 0.05).

Gly: Glycerol, COOH-PLL: Carboxylated Poly-L-Lysine

Test was replicated over 5 times and over 100 sperms were counted each time.

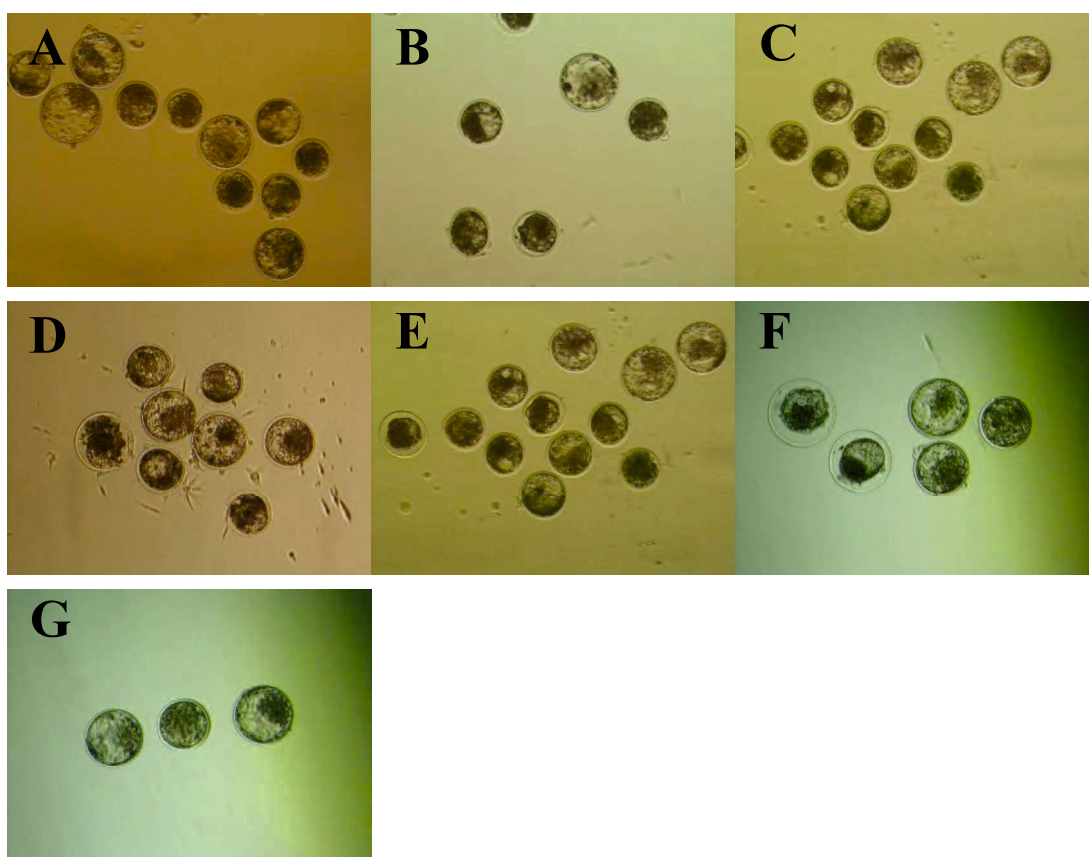


Figure 8. Bovine *in vitro* produced embryos at day8 fertilized with cryopreserved semen.

- (A) 6.5%Gly(Control), (B) 6.5%Gly+0.5%COOH-PLL, (C) 3.25%Gly,
 (D) 3.25%Gly+0.3%COOH-PLL, (E) 3.25%Gly+0.5%COOH-PLL, (F) 0.5%COOH-PLL,
 (G) 1.0%COOH-PLL.

Gly: Glycerol, COOH-PLL: Carboxylated Poly-L-Lysine

Table 13. The results of cleaved rate and blastocyst rate of *in vitro* fertilization using cryopreserved semen.

Cryopreservation media	No. of oocytes cultured	No. of oocytes cleaved (%)	No. of blastocysts (%)
6.5%Gly (Control)	365	247(67.7) ab	83(22.7)
6.5%Gly+0.5%COOH-PLL	240	184(76.7) a	53(22.1)
3.25%Gly	182	132(72.5) ab	43(23.6)
3.25%Gly+0.3%COOH-PLL	165	117(70.9) ab	39(23.6)
3.25%Gly+0.5%COOH-PLL	239	182(76.2) a	56(23.4)
0.5%COOH-PLL	63	43(68.3) ab	11(17.5)
1.0%COOH-PLL	64	36(56.3) b	7(10.9)

a,b; Values lacking a common character indicate significant difference among the group ($p < 0.05$).

Gly: Glycerol, COOH-PLL: Carboxylated Poly-L-Lysine

Table 14. The results of cell number of inner cell mass and trophoblast cell using *in vitro* produced embryos at day8 fertilized with cryopreserved semen.

Cryopreservation media	n	ICM	TC	Total
6.5%Gly (Control)	5	31.6 ± 1.0	65.0 ± 8.5	96.6 ± 9.2
6.5%Gly+0.5%COOH-PLL	4	29.8 ± 2.0	64.5 ± 5.1	94.3 ± 5.0
3.25%Gly	5	37.2 ± 3.2	63.8 ± 3.7	101.0 ± 6.2
3.25%Gly+0.3%COOH-PLL	3	36.6 ± 0.6	69.7 ± 9.9	105.7 ± 10.4
3.25%Gly+0.5%COOH-PLL	5	31.2 ± 3.3	86.8 ± 8.6	118.0 ± 6.7
0.5%COOH-PLL	4	38.8 ± 1.4	80.0 ± 3.7	118.8 ± 2.7
1.0%COOH-PLL	4	38.3 ± 3.2	63.5 ± 7.2	105.0 ± 7.8

Gly: Glycerol, COOH-PLL: Carboxylated Poly-L-Lysine

ICM: inner cell mass, TC: trophoblast cell

Table 15. The results of conception rate of artificial insemination (AI).

Cryopreservation media	Number of AI	Conception (%)
6.5%Gly (Control)	49	26 (53.1) a
3.25%Gly + 0.5%COOH-PLL	62	49 (79.0) b

a,b; Values lacking a common character indicate significant difference among the groups ($p < 0.01$).

Gly: Glycerol, COOH-PLL: Carboxylated Poly-L-Lysine

考察

ウシの精子や卵子、胚といった生殖細胞を凍結保存することは、遺伝子保存の点からも重要であるが、精子や胚の凍結手技により融解後の生存率は低下し、受胎率の低下を招き、これは農家の経済的な損失につながる。AI 受胎率は乳用牛、肉用牛ともに低下傾向で、平成元年（乳用種 62.0%、肉用種 66.4%）と比較し平成 26 年度は乳用種 43.4%、肉用種 52.6%と推移している。また、凍結胚移植の受胎率は 1997 年から生体内由来胚で 45%前後、IVF 胚で 35%前後と横ばいで推移しており、多くの研究がなされているにも拘わらず劇的な改善には至っていない。これまでの受胎率向上の研究は、ウシの飼養管理に関係することや既存の凍結保護材の濃度等の変更によるものが大半であった。細胞や胚に用いられる DMSO や EG、精子での Gly などの凍結保護材は、開発当時より 40 年以上経過しているが、代替となる物質が見つかっておらず、延々と使い続けられていることから、新規凍結保護材の開発も望まれている。本研究では、凍結精液、凍結胚を用いた受胎率向上を目的とし、不凍ポリアミノ酸（Carboxylated Poly-L-Lysine : COOH-PLL）を新規凍結保護材として使用し、ウシ体細胞である線維芽細胞と卵丘細胞、ウシ生殖細胞である精子、胚の *in vitro*, *in vivo* における融解後生存性を調査した。

第 1 章の体細胞の凍結保存では、ウシ体細胞である線維芽細胞と卵丘細胞に対する COOH-PLL の有効性を調査した。COOH-PLL は DMSO と組み合わせることで融解後増殖率が向上し、また DMSO を使用せず、COOH-PLL のみで凍結保存した場合でも良好な

増殖性を示した。また、線維芽細胞では、融解後 COOH-PLL を除去する必要がなく、希釈するだけで、培養液中に COOH-PLL が含まれていても線維芽細胞は良好な増殖を示した。そのような効果は DMSO を含む凍結液では認められず、融解後、凍結保護材を素早く除去する必要がなくなり、生存性の向上だけでなく、細胞培養の手技をシンプルかつ簡便にできるものと思われる。

第 2 章ではウシ胚の凍結保存に対する COOH-PLL の有効性を調査した。緩慢凍結法では、従来の凍結保護材を COOH-PLL に置き換えることで、生存性が有意に低下し、COOH-PLL を加えるだけでも生存率の向上はみられなかった。しかし、凍結液中に 7%まで添加しても生存性は低下せず、胚移植後の受胎率に有意差はないものの、改善する傾向を示したことから、緩慢凍結法を用いた凍結保存においても COOH-PLL は有効で、更なる検討が必要だと考えられる。ガラス化凍結では、クライオトップ法では、融解後生存性が有意に向上し、ストロー内希釈法では従来法と同等の生存性を示した。ガラス化凍結の場合、冷却を急速に行うため、胚を含むガラス化液の液量を最小化することが重要である。クライオトップ法では約 0.1 μ l と極めて微量のガラス化液で凍結することが可能だが、ストロー内希釈では液量が多くなり、冷却速度が低下することが問題である。さらに、ストロー内希釈の場合、融解し、希釈液と混合されるまで、胚がガラス化液に暴露されているため、第 1 章で認められた COOH-PLL の毒性の低さが、生存性向上につながるとは思われたが、今回はそのような効果は認められなかった。しかし、実際の野外での移植では融解後移植完了まで 5~10 分

ほどの時間が経過するため、*in vivo*での COOH-PLL の移植試験調査が必要である。さらに、今後は凍結保護材の濃度だけでなく、平衡液、ガラス化液の平衡時間等の検討が必要である。

第 3 章ではウシ精子の凍結保存に対する COOH-PLL の有効性を調査した。6.5%の Gly のうち、3.25%Gly を 0.5%COOH-PLL に置き換えることで融解後運動性、先体膜正常性、体外受精における発生能は従来と同等に維持でき、精子膜正常性が向上したことで、受胎率が向上したと考えられた。しかし、今回供試した種雄牛では Gly を従来の 6.5%から 3.25%に半減しても、融解後の運動性、精子膜正常性、先体正常性、体外受精における発生能に影響は見られなかった。ウシ精子の凍結時の Gly 至適濃度は 5.0~7.4%で幅があり [3,11]、射出後精子の耐凍能については種雄牛間で異なることから [27,72]、今回の供試牛は比較的耐凍能が高い種雄牛であると考えられ、複数頭の種雄牛での検討が必要であると考えられる。また、遺伝的に能力が高いウシでも耐凍能が低いため、融解後生存性が低く、受胎率が低い種雄牛の凍結精液は廃棄されることが多いため、一般には広く使用されることはない。また、雌雄産み分け技術が確立され、希望する性別の産子を得ることができる、性別別精液が普及しているが、フローサイトメーター法は X 精子と Y 精子の DNA 含量の差を利用して精子を分離するため、分離後の精子は、運動性、細胞膜正常性が低下し、受胎率が低下することが報告されている [12,64]。さらに、年齢や季節によっては精液性状が変化するため [53]、健康状態などの理由で一時的に、採精後の精子活力が低い場合、採取された

精液は凍結保存する前に廃棄される。今回供試した種雄牛では凍結前に活力が低い精液は認められなかったが、COOH-PLL はそのような種雄牛の精液を廃棄することなく有効に活用できる可能性があり、今後検討する必要がある。

COOH-PLL はウシ体細胞、生殖細胞に対しても、既報と同じく従来の凍結保護材と比較し、毒性が少ないことが示唆され、従来の凍結保護材を代替することで、融解後生存性を向上することができたと考えられた。また、COOH-PLL は細胞膜を保護することや氷晶のプリズム面に結合し、細胞内に形成される氷晶の成長や再結晶化を抑制するなど不凍タンパク質と類似した性質を持つことが報告されており[18]、ウシ体細胞、生殖細胞の凍結過程においても同様の効果が認められ、凍結時の損傷が減少したと示唆された。

COOH-PLL は 2009 年に Matsumura らにより、初めて報告され[34]、未だ解明されていない部分も多い。例えば、COOH-PLL の細胞膜透過性について、FITC をラベル化した COOH-PLL に浸漬した場合、マウス卵子やマウス前核期胚では細胞質に COOH-PLL が部分的に確認できるのに対し、ブタ前核期胚では全く確認されていない[25,73]。マウスとブタでは、ガラス化凍結に有効な COOH-PLL 濃度も異なることから、動物種差であると現在のところ考えられ、更なる研究が必要である。また、卵子ガラス化凍結では、第 2 成熟分裂中期に発育した卵子は未成熟卵子と比較し、卵丘細胞が膨化しているため、取り扱いにはある程度の技術が必要だが、Watanabe らは COOH-PLL の溶液に成熟卵子を浸漬した場合、未成熟卵子の様に卵丘細胞がコンパクトになり、取り扱いがしやすくなると報告してい

る[73]。詳細なメカニズムは不明であるが、卵子卵丘細胞複合体の細胞外マトリックスに直接的または間接的に作用していると考えられている。

COOH-PLL はウシ体細胞、生殖細胞である精子、胚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 は未だ未解明な部分も多く、現在みられていない影響が今後発見される可能性もあるが、更なる条件の検討、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。

謝辞

本稿を終えるにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました鹿児島大学共同獣医学部 窪田力教授、安藤貴朗准教授、山口大学共同獣医学部 角川博哉准教授に心より感謝申し上げます。

学位論文審査においては、副査としてご指導いただきました、鹿児島大学共同獣医学部 大和修教授、山口大学共同獣医学部 高木光博教授に深謝致します。

また、本試験を進めるにあたり、卵巣を提供していただいた鹿児島県知覧食肉衛生検査所の皆様、精液を提供していただいた鹿児島県肉用牛改良研究所の今村修二様、研究試薬を提供していただいた株式会社バイオベルデの玄丞侏様、玄優基様、技術研修を受け入れていただいた家畜改良センターの山之内忠幸様に感謝致します。

本研究に限らず日頃よりご協力をいただいた鹿児島大学共同獣医学部獣医繁殖学研究室の皆様、大学院生活を応援してくれた両親と妻に感謝の意を表し、謝辞と致します。

参考文献

- [1] Abbruzzese, L., Agostini, F., Durante, C., Toffola, R. T., Rupolo, M., Rossi, F. M., & Mazzucato, M. 2013. Long term cryopreservation in 5% DMSO maintains unchanged CD 34+ cells viability and allows satisfactory hematological engraftment after peripheral blood stem cell transplantation. *Vox sanguinis*. 105: 77-80.
- [2] Akagi, S., Yamaguchi, D., Matsukawa, K., Mizutani, E., Hosoe, M., Adachi, N., & Takahashi, S. 2011. Developmental ability of somatic cell nuclear transferred embryos aggregated at the 8-cell stage or 16-to 32-cell stage in cattle. *Journal of Reproduction and Development*. 57: 500-506.
- [3] Almeida, F. C., Silva, S. V., Souza, H. M., Gomes, W. A., Lima Filho, J. A. C., Wicke, A. A., & Guerra, M. M. P. 2017. Effects of glycerol, equilibration time and antioxidants on post - thaw functional integrity of bovine spermatozoa directly obtained from epididymis. *Andrologia* 49: e12623.
- [4] Awad, M. M. 2011. Effect of some permeating cryoprotectants on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Animal reproduction science*. 123: 157-162.
- [5] Brackett, B. G., & Oliphant, G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biology of reproduction*. 12: 260-274.
- [6] Boitrelle, F., Albert, M., Theillac, C., Ferfour, F., Bergere, M., Vialard, F., & Selva, J. 2012. Cryopreservation of human spermatozoa decreases the number of motile normal spermatozoa, induces nuclear vacuolization and chromatin decondensation. *Journal of andrology*. 33: 1371-1378.
- [7] Büyükleblebici, S., Tuncer, P. B., Bucak, M. N., Eken, A., Sariözkan, S., Taşdemir, U., & Endirlik, B. Ü. 2014. Cryopreservation of bull sperm: Effects of extender supplemented with different cryoprotectants and antioxidants on sperm motility, antioxidant capacity and fertility results. *Animal reproduction science* 150: 77-83.
- [8] Campbell, L. H., & Brockbank, K. G. 2007. Serum-free solutions for cryopreservation of cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*. 43: 269-275.

- [9] Cardoso, R. D. C. S., Silva, A. R., Uchoa, D. C., & da Silva, L. D. M. 2003. Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. *Theriogenology*. 59: 743-751.
- [10] Chang, Q., Cheng, C. C., Jing, H., Sheng, C. J., & Wang, T. Y. 2015. Cryoprotective Effect and Optimal Concentration of Trehalose on Aortic Valve Homografts. *The Journal of heart valve disease*. 24: 74-82.
- [11] Chaveiro, A., Machado, L., Frijters, A., Engel, B., & Woelders, H. 2006. Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bull sperm using two osmotic supports. *Theriogenology*. 65: 1875-1890.
- [12] DeJarnette, J. M., Nebel, R. L., & Marshall, C. E. 2009. Evaluating the success of sex-sorted semen in US dairy herds from on farm records. *Theriogenology*. 71: 49-58.
- [13] DeVries, A. L., & Wohlschlag, D. E. 1969. Freezing resistance in some Antarctic fishes. *Science*. 163: 1073-1075.
- [14] Fan, W. X., Ma, X. H., Ge, D., Liu, T. Q., & Cui, Z. F. 2009. Cryoprotectants for the vitrification of corneal endothelial cells. *Cryobiology*. 58: 28-36.
- [15] Forero - Gonzalez, R. A., Celeghini, E. C. C., Raphael, C. F., Andrade, A. F. C., Bressan, F. F., & Arruda, R. P. 2012. Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Andrologia*. 44: 154-159.
- [16] Gajda, B., Kątska-Książkiewicz, L., Ryńska, B., Bochenek, M., & Smorąg, Z. 2007. Survival of bovine fibroblasts and cumulus cells after vitrification. *Cryoletters*. 28: 271-279.
- [17] García, B. M., Ferrusola, C. O., Aparicio, I. M., Miró-Morán, A., Rodriguez, A. M., Bolaños, J. G., & Pena, F. J. 2012. Toxicity of glycerol for the stallion spermatozoa: effects on membrane integrity and cytoskeleton, lipid peroxidation and mitochondrial membrane potential. *Theriogenology* 77: 1280-1289.
- [18] Griffith, M., & Yaish, M. W. 2004. Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. *Trends in plant science*. 9: 399-405.

- [19] Hochi, S., Semple, E., & Leibo, S. P. 1996. Effect of cooling and warming rates during cryopreservation on survival of in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*. 46: 837-847.
- [20] Hu, J. H., Li, Q. W., Li, G., Jiang, Z. L., Bu, S. H., Yang, H., & Wang, L. Q. 2009. The cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality. *Reproduction in Domestic Animals*. 44: 571-575
- [21] Inaba, Y., Aikawa, Y., Hirai, T., Hashiyada, Y., Yamanouchi, T., Misumi, K., & Matoba, S. 2011. In-straw cryoprotectant dilution for bovine embryos vitrified using Cryotop. *Journal of Reproduction and Development*. 57: 437-443.
- [22] Iwasaki, S., Yoshida, N., Ushijima, H., Watanabe, S., & Nakahara, T. 1990. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized in vitro and in vivo. *Journal of reproduction and fertility*. 90: 279-284.
- [23] Jeon, B. G., Betts, D. H., King, W. A., & Rho, G. J. 2011. *In Vitro* Developmental Potential of Nuclear Transfer Embryos Cloned with Enucleation Methods using Pre - denuded Bovine Oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*. 46: 1035-1042.
- [24] Jiang, G., Bi, K., Tang, T., Wang, J., Zhang, Y., Zhang, W., & Wang, Y. 2006. Down-regulation of TRRAP-dependent hTERT and TRRAP-independent CAD activation by Myc/Max contributes to the differentiation of HL60 cells after exposure to DMSO. *International immunopharmacology*. 6: 1204-1213.
- [25] Kamoshita, M., Kato, T., Fujiwara, K., Namiki, T., Matsumura, K., Hyon, S. H., & Kashiwazaki, N. 2017. Successful vitrification of pronuclear-stage pig embryos with a novel cryoprotective agent, carboxylated ϵ -poly-L-lysine. *PloS one*. 12: e0176711.
- [26] Kang, M. H., Das, J., Gurunathan, S., Park, H. W., Song, H., Park, C., & Kim, J. H. 2017. The cytotoxic effects of dimethyl sulfoxide in mouse preimplantation embryos: a mechanistic study. *Theranostics*. 7: 4735-4752.
- [27] Koess, C., & Bollwein, H. 2008. Variability in plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and acrosomal status before and after cryopreservation of bull sperm. *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift*. 121: 73-77.

- [28] Kubota, C., Yang, X., Dinnyes, A., Todoroki, J., Yamakuchi, H., Mizoshita, K., & Tabara, N. 1998. In vitro and in vivo survival of frozen - thawed bovine oocytes after IVF, nuclear transfer, and parthenogenetic activation. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*. 51: 281-286.
- [29] Kuwayama, M., Vajta, G., Kato, O., & Leibo, S. P. 2005. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reproductive biomedicine online*. 11: 300-308.
- [30] Lane, M., Schoolcraft, W. B., Gardner, D. K., & Phil, D. 1999. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertility and sterility*. 72: 1073-1078.
- [31] Landivar, C., Galina, C. S., Duchateau, A., & Navarro-Fierro, R. 1985. Fertility trial in Zebu cattle after a natural or controlled estrus with prostaglandin F2 alpha, comparing natural mating with artificial insemination. *Theriogenology*. 23: 421-429.
- [32] Lovelock, J. E., & Bishop, M. W. H. 1959. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature*. 183: 1394-1395.
- [33] Ma, H., Liu, D., Wang, W., Wang, L., Fu, B., Li, Z., & He, X. 2015. Effect of Semen Extender Supplementation with Trehalose, Vitamin C and E on Post-Thaw Min Pig Sperm Qualities. *CryoLetters*. 36: 308-312.
- [34] Matsumura, K., & Hyon, S. H. 2009. Polyampholytes as low toxic efficient cryoprotective agents with antifreeze protein properties. *Biomaterials*. 30: 4842-4849.
- [35] Matsumura, K., Bae, J. Y., & Hyon, S. H. 2010. Polyampholytes as cryoprotective agents for mammalian cell cryopreservation. *Cell transplantation*. 19: 691-699.
- [36] Mazur, P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American journal of physiology-cell physiology*. 247: C125-C142.
- [37] Mehmood, S., Ahmed, H., Shah, S. A. H., Wattoo, F. H., Akhtar, S., & Andrabi, S. M. H. 2017. Determination of an Optimal Membrane-permeable Cryoprotectant Addition and Dilution Protocol for Water Buffalo Spermatozoa. *CryoLetters* 38: 239-249.

- [38] Meyers, S. A. 2005. Spermatozoal response to osmotic stress. *Animal reproduction science*. 89: 57-64.
- [39] Mucci, N., Aller, J., Kaiser, G. G., Hozbor, F., Cabodevila, J., & Alberio, R. H. 2006. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology*. 65: 1551-1562.
- [40] Murphy, E. M., O'Meara, C., Eivers, B., Lonergan, P., & Fair, S. 2018. Comparison of plant-and egg yolk-based semen diluents on in vitro sperm kinematics and in vivo fertility of frozen-thawed bull semen. *Animal reproduction science*. 191: 70-75.
- [41] Nicacio, A. C., Simões, R., de Paula-Lopes, F. F., de Barros, F. R. O., Peres, M. A., Assumpção, M. E. O. D. A., & Visintin, J. A. 2012. Effects of different cryopreservation methods on post-thaw culture conditions of in vitro produced bovine embryos. *Zygote*. 20: 117-122.
- [42] Numabe, T., Oikawa, T., Kikuchi, T., & Horiuchi, T. 2000. Production efficiency of Japanese black calves by transfer of bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology*. 54: 1409-1420.
- [43] Osei-Bempong, C., Ghareeb, A. E., Lako, M., Figueiredo, F. C., & Armitage, W. J. 2018. Defining the optimal cryoprotectant and concentration for cryopreservation of limbal stem cells. *Cryobiology*. 84: 98-102.
- [44] Papis, K., Shimizu, M., & Izaike, Y. 2000. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology*. 54: 651-658.
- [45] Payne, S. R., Oliver, J. E., & Upreti, G. C. 1994. Effect of antifreeze proteins on the motility of ram spermatozoa. *Cryobiology*. 31: 180-184.
- [46] Pedro, P. B., Zhu, S. E., Makino, N., Sakurai, T., Edashige, K., & Kasai, M. 1997. Effects of hypotonic stress on the survival of mouse oocytes and embryos at various stages. *Cryobiology*. 35: 150-158.

- [47] Perumal, P., Chang, S., Baruah, K. K., & Srivastava, N. 2018. Administration of slow release exogenous melatonin modulates oxidative stress profiles and in vitro fertilizing ability of the cryopreserved mithun (*Bos frontalis*) spermatozoa. *Theriogenology* 120: 79-90.
- [48] Polge, C., Smith, A. U., & Parkes, A. S. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*. 164: 666.
- [49] Polge, C., & Rowson, L. E. A. 1952. Fertilizing Capacity of Bull Spermatozoa after Freezing at -79° C. *Nature*. 169: 626-627.
- [50] Rajaei, F., Karja, N. W. K., Agung, B., Wongsrikeao, P., Taniguchi, M., Murakami, M., & Otoi, T. 2005. Analysis of DNA fragmentation of porcine embryos exposed to cryoprotectants. *Reproduction in domestic animals*. 40: 429-432.
- [51] Rosenkrans, C. F. 1991. Culture of bovine zygotes to the blastocyst stage: effects of amino acids and vitamins. *Theriogenology*. 35: 266.
- [52] Rubinsky, B., Arav, A., & Fletcher, G. L. 1991. Hypothermic protection—a fundamental property of “antifreeze” proteins. *Biochemical and biophysical research communications*. 180: 566-571.
- [53] Sabés-Alsina, M., Johannisson, A., Lundeheim, N., Lopez-Bejar, M., & Morrell, J. M. 2017. Effects of season on bull sperm quality in thawed samples in northern Spain. *The Veterinary record*, p. vr.103897.
- [54] Sanches, B. V., Lunardelli, P. A., Tannura, J. H., Cardoso, B. L., Pereira, M. H. C., Gaitkoski, D., & Seneda, M. M. 2016. A new direct transfer protocol for cryopreserved IVF embryos. *Theriogenology*. 85: 1147-1151.
- [55] Seong Jin, O., Ho Lee, J., Cheol Shin, Y., Ji Lee, E., Jae Lee, J., Matsumura, K., & Han, D. W. 2013. Cryoprotection of fibroblasts by carboxylated poly-L-lysine upon repeated freeze/thaw cycles. *CryoLetters*. 34: 396-403.
- [56] Seshoka, M. M., Mphaphathi, M. L., & Nedambale, T. L. 2016. Comparison of four different permitting and combination of two best cryoprotectants on freezing Nguni sperm evaluated with the aid of computer aided sperm analysis. *Cryobiology* 72: 232-238.

- [57] Shahverdi, A., Rastegarnia, A., & Topraggaleh, T. R. 2014. Effect of extender and equilibration time on post thaw motility and chromatin structure of buffalo bull (*bubalus bubalis*) spermatozoa. *Cell Journal (Yakhteh)*. 16: 279-288.
- [58] Sheyn, D., Ben-David, S., Shapiro, G., De Mel, S., Bez, M., Ornelas, L., & Tawackoli, W. 2016. Human induced pluripotent stem cells differentiate into functional mesenchymal stem cells and repair bone defects. *Stem cells translational medicine*. 5: 1447-1460.
- [59] Shibao, Y., Fujiwara, K., Kawasaki, Y., Matsumura, K., Hyon, S. H., Ito, J., & Kashiwazaki, N. 2014. The effect of a novel cryoprotective agent, carboxylated ϵ -poly-l-lysine, on the developmental ability of re-vitrified mouse embryos at the pronuclear stage. *Cryobiology*. 68: 200-204.
- [60] Simões, R., Feitosa, W. B., Siqueira, A. F. P., Nichi, M., de Paul-Lopes, F., Marques, M. G., ... & Assumpção, M. E. O. 2013. Influence of bovine sperm DNA fragmentation and oxidative stress on early embryo in vitro development outcome. *Reproduction*. 146: 433-441.
- [61] Stringfellow, D. A., & Givens, M. D. 2009. A procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures. *Manual of the International Embryo Transfer Society*, editor. *International Embryo Transfer Manual*. 4th ed. Savoy, IL, USA: IETS Publish, 151.
- [62] Sudano, M. J., Caixeta, E. S., Paschoal, D. M., Martins, A., Machado, R., Buratini, J., & Landim-Alvarenga, F. D. 2014. Cryotolerance and global gene-expression patterns of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro- and in vivo-produced blastocysts. *Reproduction, Fertility and Development*. 26: 1129-1141.
- [63] Sugie, T. 1965. Successful transfer of a fertilized bovine egg by non-surgical techniques. *Journal of reproduction and fertility*. 10: 197-201.
- [64] Suh, T. K., Schenk, J. L., & Seidel Jr, G. E. 2005. High pressure flow cytometric sorting damages sperm. *Theriogenology*. 64: 1035-1048.
- [65] Széll, A., Shelton, J. N., & Széll, K. 1989. Osmotic characteristics of sheep and cattle embryos. *Cryobiology*. 26: 297-301.

- [66] Taşdemir, U., Büyükleblebici, S., Tuncer, P. B., Coşkun, E., Özgürtaş, T., Aydın, F. N., & Gürcan, İ. S. 2013. Effects of various cryoprotectants on bull sperm quality, DNA integrity and oxidative stress parameters. *Cryobiology* 66: 38-42.
- [67] Vajta, G. 1997. Vitrification of porcine embryos using the Open Pulled Straw (OPS) method. *Acta vet scand.* 38: 349-352.
- [68] von Bomhard, A., Elsässer, A., Ritschl, L. M., Schwarz, S., & Rotter, N. 2016. Cryopreservation of endothelial cells in various cryoprotective agents and media–vitrification versus slow freezing methods. *PloS one.* 11: e0149660.
- [69] Vorontsov, D. A., Sazaki, G., Hyon, S. H., Matsumura, K., & Furukawa, Y. 2014. Antifreeze effect of carboxylated ϵ -poly-L-lysine on the growth kinetics of ice crystals. *The Journal of Physical Chemistry B.* 118: 10240-10249.
- [70] Wada, T., Goparaju, S. K., Tooi, N., Inoue, H., Takahashi, R., Nakatsuji, N., & Aiba, K. 2012. Amyotrophic lateral sclerosis model derived from human embryonic stem cells overexpressing mutant superoxide dismutase 1. *Stem cells translational medicine.* 1: 396-402.
- [71] Walter, Z., Szostek, M., Weglarska, D., Raguszewska, D., Jabłoński, M., Lorenz, F., & Skotnicki, A. B. 1999. Methods for freezing, thawing and viability estimation of hemopoietic stem cells. *Przegląd lekarski.* 56: 34-39.
- [72] Wang, P., Wang, Y. F., Wang, H., Wang, C. W., Zan, L. S., Hu, J. H., & Ma, G. J. 2014. HSP90 expression correlation with the freezing resistance of bull sperm. *Zygote.* 22: 239-245.
- [73] Watanabe, H., Kohaya, N., Kamoshita, M., Fujiwara, K., Matsumura, K., Hyon, S. H., & Kashiwazaki, N. 2013. Efficient production of live offspring from mouse oocytes vitrified with a novel cryoprotective agent, carboxylated ϵ -poly-L-lysine. *PloS one.* 8: e83613.
- [74] Wharton, D. A. 2011. Cold tolerance of New Zealand alpine insects. *Journal of Insect Physiology.* 57: 1090-1095.
- [75] Wilmut, I., & Rowson, L. E. 1973. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Veterinary Record.* 92: 686-690

[76] Wu, Z., Zheng, X., Luo, Y., Huo, F., Dong, H., Zhang, G., & Chen, J. 2015. Cryopreservation of stallion spermatozoa using different cryoprotectants and combinations of cryoprotectants. *Animal reproduction science*. 163: 75-81.

[77] Young, D. A., Gavrilov, S., Pennington, C. J., Nuttall, R. K., Edwards, D. R., Kitsis, R. N., & Clark, I. M. 2004. Expression of metalloproteinases and inhibitors in the differentiation of P19CL6 cells into cardiac myocytes. *Biochemical and biophysical research communications*. 322: 759-765.