

(第5号様式)

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	Qiu Juan
審査委員	主査 枝重 圭祐
	副査 橘 哲也
	副査 益本 俊郎
	副査 松本 由樹
	副査 松川 和嗣

論文名

Studies on equilibrium vitrification of oocytes and embryos using low concentrations of cryoprotectants  
(低濃度の耐凍剤を用いた卵子と胚の平衡ガラス化凍結法に関する研究)

審査結果の要旨

哺乳動物の卵子と胚の凍結保存には、ガラス化法が普及している。この方法は、簡便で数分間の操作で凍結保存できる上、細胞外に氷晶が形成されないので融解後に高い生存率が期待できる。しかしながら、脱水・濃縮が不十分で非平衡状態で凍結保存されるため、ドライアイス温度（約-80°C）では保持できない上、急速に融解しなければ死滅してしまう。一方、オリジナルの緩慢法で凍結された卵子と胚は、十分に脱水・濃縮され、過冷却度の低い近平衡状態で凍結保存されるので、-80°C で一時的に保持したり緩慢に融解したりしても生存率は低下しない。しかしながら、操作に2時間以上かかるため、現在はほとんど使われていない。そこで、細胞非透過性耐凍剤であるシュクロースの濃度を高めた保存液で細胞をより脱水・濃縮する平衡ガラス化法が開発された。この方法は、二つの凍結保存法の利点を併せ持つ優れた方法であったが、耐凍剤の毒性に対する感受性や高浸透圧に対する感受性の高い細胞では有効ではなかった。そこで、申請者の Qiu Juan 氏は、保存液に浸した卵子と胚が最も脱水・濃縮された時に液体窒素で凍結すれば、低濃度の細胞透過性耐凍剤と細胞非透過性耐凍剤を用いても十分に脱水・濃縮でき、近平衡状態で凍結保存できるのではないかと考え、新しい平衡ガラス化法の開発を試み、以下のような有用な知見を得ている。

1. 従来の平衡ガラス化法の保存液（EFS35c）は、高濃度の細胞透過性耐凍剤（35%エチレングリコール）と細胞非透過性耐凍剤（1 M シュクロース）を含み、浸透圧（重量モル濃度 23.3 mols/kg water）も極めて高かった。新しい平衡ガラス化法の保存液には、細胞透過性耐凍剤の濃度は 20%と低く、細胞非透過性耐凍剤であるシュクロースの濃度も 0.4 M と低く、浸透圧（重量モル濃度 6.4 mols/kg water）もかなり低い保存液を用いることにした。まず、申請者は、適した細胞透過性耐凍剤を調べるため、4つの細胞透過性耐凍剤およびその混合物を用いてマウス卵子を液体窒素でガラス化凍結し、それから-80°C

で4日間保持して融解し、細胞内氷晶形成による傷害の有無と生存率から近平衡状態で凍結保存できているかどうかを調べた。その結果、10%エチレングリコールと10%DMSOを含む保存液(EDFS10/10a)が適していることを明らかにした。

2. 次に、申請者は、この保存液を用いて、マウス2細胞期胚を高い発生能を維持したまま近平衡状態で凍結保存できる条件について調べた。その結果、25°Cの5%エチレングリコールと5%DMSOを含む前処理液で2分間処理したのち、25°CのEDFS10/10aで1分間処理して液体窒素で凍結すると、高い発生能を維持したまま近平衡状態で凍結保存できることがわかった。そこで、ドライアイス入り簡易輸送箱を用いて凍結胚を高知大学農林海洋学部からつくば市の理化学研究所バイオリソースセンターまで宅配便で輸送し、液体窒素で再冷却して保存したのち、融解して移植したところ、高率に新生子まで発生したことから、ドライアイス輸送も可能であることがわかった。

3. 次に、この方法が他の発生段階のマウス胚に有効かどうかを調べた。その結果、4~8細胞期胚は2細胞期胚と同じ凍結保存条件で高い発生能を維持したまま近平衡状態で凍結保存できた。一方、桑実胚と胚盤胞は、近平衡状態では凍結保存できなかった。しかしながら、胚盤胞については胞胚腔をマイクロニードルで潰すと発生能を維持したまま近平衡状態で凍結保存することができた。したがって、この方法は様々な発生段階のマウス胚で有効であることがわかった。

4. 最後に、この方法がマウス卵子で有効かどうか調べた。その結果、精子と受精させるためには融解後に透明帯を一部切開する必要があるが、2細胞期胚の同じ凍結保存条件で高い受精能と発生能を維持したまま近平衡状態で卵子を凍結保存できることがわかった。

本論文に記載された上記の研究成果は、他の実験動物や家畜の卵子と胚の凍結保存に応用できるだけでなく、ヒトの不妊症治療への応用も可能と考えられ、今後の発展が期待される。

本論文に関する公開審査会は、令和3年2月2日にリモートシステムを利用して開催され、論文発表と質疑応答が行われた。引き続き行われた学位論文審査委員会で、本論文の内容を慎重に審議した結果、審査委員全員一致して博士(学術)の学位を授与するものと判定した。