

様式4（公表用）

氏名	楊力 (Yang Li)
博士の専攻分野の名称	博士（生命工学）
学位記番号	医工農甲 第132号
学位授与年月日	令和5年9月26日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
専攻名	統合応用生命科学専攻
学位論文題目	凍結乾燥マウス精子のシート保存技術の開発と長期保存の試み
論文審査委員	主査 教授 若山 照彦
	教授 岸上 哲士
	教授 幸田 尚
	教授 永松 剛
	助教 若山 清香
	准教授 石内 崇士

学位論文内容の要旨

本論文は、マウス精子を凍結乾燥で保存する技術における問題点を、様々な角度から検討し改善策を提案したものである。

精子を凍結乾燥すると、液体窒素などを使わずに室温保存できることが知られている。しかし現在の方法では、残念ながら凍結乾燥精子は加水しても生き返らないため、精子を卵子内へ直接注入する顕微授精技術を用いなければならない。顕微授精を行えば凍結乾燥精子でもほぼ100%受精できるが、その受精卵からの産仔率は、新鮮精子を用いた場合に比べ1/3にまで低下してしまう。また、凍結乾燥精子の室温保存には真空状態のガラスアンプル瓶の使用が必須であったが、高真空に耐えられるアンプル瓶は高価であり、保管中にぶついたり落としたりするとガラスが破損し、精子の質を維持できなくなってしまう。本論文では、顕微授精技術の改善、凍結乾燥精子のより簡便な保存方法、および凍結乾燥精子由来の産仔率の改善について、マウス精子を用いて解決を試みた。

第一章で精子の凍結乾燥保存技術の重要性と、普及に向けた問題点について紹介し、第二章から第四章までの3つの章で、この問題を解決するための研究を行った。

第二章では、本研究で必要となる顕微授精技術において、いままであまり顧みられてこなかった培地のpHに焦点を当てて、顕微授精の成功率とpHの関係を詳細に検討し

様式4 (公表用)

た。また、保存中にpHが変化する程度も明らかにした。顕微授精時に培地のpHを4.0から12まで変化させたところ、生存卵子はpH6から10までで得られ、pH7と8で最も高い卵子の生存率となった。そこで次にpHを7から8まで0.1ずつ変化させて顕微授精を行ったところ、pH7.4が最も高く、pH7.6まで良好な成績を得られることが明らかとなった。この方法で得られた受精卵を4日間培養したところ、pH7.6から8までで作製した受精卵であれば高率に胚盤胞へ発育できることが明らかとなった。一方培養液を保存する場合、pH7.6以下で調整した培地は、保存中にpHが0.1~0.2程度高くなる傾向がみられたのに対し、pH7.6以上で調整した培地は保存中pHが最高で0.3まで低下する傾向がみられた。これらのことから、顕微授精を行う際は、pH7.6程度で調整した培地を、あまり長く保存せずに使用することが一番良い、ということが判明した。

第三章では、これまで凍結乾燥精子の作製に用いられていたガラスアンプルピンは高額で入手しにくいこと、管理中にぶつかったり落としたりすると割れる危険性が高いことなどから、最適な保存容器とはいいがたかった。そこで本研究ではガラスアンプルにかわり、プラスチックチューブを用いる方法を検討した。市販の、どこからでも購入可能かつ安価なプラスチックチューブであれば、凍結乾燥精子の作製が低コストで容易になるだけでなく、特注品のガラスアンプルではロット差が出てしまうが、プラスチックチューブであれば世界共通でありロット差を防ぐことが出来る。そこで最初にプラスチックチューブの真空に対する耐性、気密性および乾燥に要する時間など詳細を調べた。次に最適条件を用いて精子をプラスチックチューブに入れ、凍結乾燥を行った。まず冷凍庫(-30℃)での保存を試みたところ、最長9か月間このチューブで保存しても、顕微授精後に成績を低下させずに産仔を得られることが分かった。しかしチューブの気密性は弱く、作製後1日ではほぼすべてのチューブに空気が混入してしまい、室温で保存すると最長で1週間しか凍結乾燥精子を保存できなかった。作製した真空のチューブを水中することで常温でも真空を保てると思ったが、水中であってもわずか数日でチューブ内には空気が混入してしまった。そこでチューブ内に脱酸素剤(シリカゲル)および除湿剤(CaCl₂)を入れて、凍結乾燥精子の室温保存を試みた。その結果2細胞期胚への発生成績は改善されたが、産仔への発育率は、それらの試薬を加えても改善されなかった。これらの結果から、凍結乾燥精子は市販の低コストで利用しやすいプラスチックチューブでも、冷凍庫内であれば長期間の保存が可能であり、液体窒素不要の新たな保存方法になりえると思われた。室温でも1週間保存できることから、本方法は輸送にも適していると思われる。

第四章では、マウス精子を凍結乾燥ではなく、高濃度の凍結乾燥保護剤を用いてガラス化保存する技術の開発を試みた。琥珀内に閉じ込められた蚊のように、精子もガラス化状態で保存すれば、室温で長期化保存可能になるかもしれない。そこで保護効果が認められるトレハロースやシュクロースを用いて、様々な濃度でガラス化保存してみた。まずそれらの試薬のガラス化方法を確立した。後日精子を利用することを考慮し、スライドグラスの上に数μlから数十μlたらし、風乾(Air Dry)、70℃の加温(Hot Dry)、および電子レンジ(Microwave Dry)で加温しガラス化を観察した。その結果、Hot Dryだけはガラス化後の表面が変化していた。加水して元に戻すと、Microwave法では精子を取り扱うことが出来なくなった。そこで本研究ではもっとも利用しやすいAir Dry法

を用いることにした。このガラス化法で精子を保存すると、室温で1日程度ならガラス化保存しても顕微授精後に胚盤胞へ発育させることが出来たが、今回試した条件ではより長期間の保存は出来なかった。しかしガラス化前に精子細胞膜を溶かしておけば、最長で3日間の室温保存も可能であることが明らかになった。

本論文は凍結乾燥マウス精子の実用化に向けた様々な基礎研究を行い、多数の有用な結果を得ることが出来た。とくに第三章の結果は国際誌である *Journal of Reproduction and Development* (Yang et al., A novel, simplified method to prepare and preserve freeze-dried mouse sperm in plastic microtubes. 69: 198-205, 2023)に掲載されており、国際的にも高い評価が得られている。

論文審査結果の要旨

統合応用生命科学専攻及び同専攻生命工学コースの審査内規に基づき、最終試験を実施した。主査は若山照彦、5名の委員は全員が博士の審査資格を有する教授、准教授、助教らの合計6名である。審査委員からは、おもに本研究の意義、研究の問題点、および未解決問題の対策などを詳しく聞かれた。

楊さんは研究意義、すなわち遺伝資源の室温保存の実用化について、当研究の背景や当時の問題点とその解決方法などを多数の論文を正しく引用しながら的確に説明することが出来た。委員がより詳細な項目を質問しても、すぐに正しい回答や自分の意見を言うことができたことから、楊さんが自分の博士論文の研究について十分勉強し、その背景や価値、将来性を完全に理解していることが確認できた。

一方、実施した研究について質問されると、研究手法の原理や手順、結果の解釈方法などははっきり答えられるのに対して、実験結果にばらつきが出た理由や、予想と反した結果が出たことに対して、はっきり答えられない場合があった。これは得られた結果に対して、疑問に思わず素直に納得するという楊さんの性格のためだと思われた。博士研究員としては、疑問を持つ、疑ってかかる、という研究姿勢も重要であり、ややそれらの習得が足りないと思われた。ただし楊さんはどんな実験も、非常に多くの予備実験を行い、技術を確立してからしか本実験を始めない傾向があるため、その結果得られた実験結果は絶対に正しい、と考えてしまったためだと思われる。予備実験をしっかり行う点は高く評価できるが、疑う姿勢も身に着ける必要があるだろう。一方、本研究で解決できなかった問題について、たとえばプラスチックチューブの気密性が保てない原因や、その改善方法の案を聞かれても、うまく答えることが出来なかった。これらの結果から楊さんは、自分からアイデアを出し実験計画を立てて問題を解決するための能力はまだ十分ではないが、幅広く論文を読み、研究に対する理解力はたかく、高度な技術を取得し最適な実験計画を立てる能力は高い、と判断された。この能力は若手研究者にとって重要であり、楊さんはそれを取得できていることから、今後の研究にも不安は感じられない。

また、楊さんは高度な実験技術を多数取得していることから、私の研究室で実施して

様式4（公表用）

いる大規模プロジェクトには積極的に参加し、データを出すことに多大な貢献をしてくれた。その一部は共著として一流誌に発表されている（Sakamoto et al., *Development* 2022 (IF6.9); Wakayama S. et al., *Science Advances* 2022 (IF15))。他の研究者に頼りにされる能力を有する点も、研究者になるための重要な要素である。

楊さんは本博士論文の研究内容を国際誌である *Journal of Reproduction and Development* に第一著者として発表している（Yang et al., 69 : 198-205, 2023）。共著論文も多数あり、国際学会での口頭発表も複数回行っている。および上述した通り、博士論文の内容の検討および公聴会の質疑応答を通して、楊さんは、基礎的および専門的な知識を十分有し博士号取得の条件を見たいしていると判断し、楊さんへ博士号を授与するのに値するものであると全員が判断した。