

|         |                              |
|---------|------------------------------|
| 氏名      | 葛西孫三郎<br>かさいまごさぶろう           |
| 学位の種類   | 農学博士                         |
| 学位記番号   | 農博第315号                      |
| 学位授与の日付 | 昭和55年1月23日                   |
| 学位授与の要件 | 学位規則第5条第1項該当                 |
| 研究科・専攻  | 農学研究科農学専攻                    |
| 学位論文題目  | 哺乳動物卵子の凍結保存に関する研究            |
| 論文調査委員  | (主査) 教授 入谷 明 教授 石橋武彦 教授 川島良治 |

### 論 文 内 容 の 要 旨

哺乳動物卵子の凍結保存は比較的新しい研究分野であり、なお多くの解決されるべき問題点を残している。本論文では、卵子の耐凍メカニズム、動物種および卵子の発育段階による耐凍性の差異、さらにより簡便な凍結方法の開発などに関して研究を行ない、つぎのような知見をえている。

1) 卵子の耐凍メカニズムに関する実験では、凍結速度と細胞の脱水との関係をしらべるためにマウス受精卵を用いて最適凍結速度と急冷可能温度域をしらべた。その結果、 $-5^{\circ}\sim-50^{\circ}\text{C}$ の温度域を毎分 $1^{\circ}\text{C}$ 以下の緩慢な速度で冷却することが必要であった。しかし毎分 $5^{\circ}\text{C}$ のやや急速度で $-50^{\circ}\text{C}$ まで凍結後、 $-50^{\circ}\text{C}$ に30分間以上保持すれば、ほぼ上記の緩慢冷却に代用しうることを明らかにした。これは、緩慢凍結あるいは $-50^{\circ}\text{C}$ での30分間保持によって卵細胞質内の脱水が進み、細胞内凍結による傷害を避けることができたものと結論している。

2) マウス卵巣から採取したいわゆる未受精卵の成熟段階による耐凍性をしらべた結果、卵核胞崩壊期以前の卵胞卵で最も耐凍性が弱く、成熟のすすむにつれて耐凍性が強まり、さらに受精卵では格段に凍結融解後の生存率の高まることを明らかにした。またウシやブタの卵核胞期の卵胞卵の耐凍性についてしらべた結果、両者ともに凍結には耐えられないが、ウシ卵胞卵は少なくとも $0^{\circ}\text{C}$ までの冷却には耐えうることを明らかにした。

3) 従来一般に用いられてきた緩慢冷却、緩慢融解法に対して著者は、マウス受精卵の急速凍結法を開発した。すなわち、試験管に入れた受精卵を $-20^{\circ}\text{C}$ のアルコールと $-100^{\circ}\text{C}$ の液体窒素ガスに10分間ずつ静置させたのち、 $-196^{\circ}\text{C}$ の液体窒素に保存するもので、従来は細胞内凍結を防ぐために緩慢凍結が必要とされていたのに対し、細胞内凍結が生じても生存しうることを明らかにした。この方法では、急速融解(毎分 $360^{\circ}\text{C}$ )およびやや高濃度の耐凍剤(Dimethyl-sulfoxide: DMSO)の使用が必要であった。またこの方法ではDMSOの除去過程に受ける傷害を防ぐために、新しい耐凍剤の除去方法が考案された。すなわち、融解された受精卵を、DMSOおよび蔗糖を含む液中に浮遊させて収縮させ、次に蔗糖のみを含む液中に移し、卵子を収縮させたままDMSOを除去する方法で、これによって水分の流入ひいては卵子

の膨張による損傷を避けうるものと結論した。

なおこの方法で受精卵を急速凍結融解し、DMSOを除去することによって高い生存率がえられ、移植後計15匹の産子がえられている。

### 論文審査の結果の要旨

卵子の凍結保存は近年急速に発展してきた研究分野である。すでに、いくつかの動物種において凍結卵子による産子が報告されているが、なお多くの問題点を残している。本論文では、卵子の耐凍メカニズム、動物種および卵子の発育段階による耐凍性の差異、簡便な凍結方法の開発などに関して研究を行ない、つぎのような知見をえている。

1) 卵子の耐凍メカニズムに関する実験では、凍結速度と細胞の脱水との関係をしらべるためにマウス受精卵を用いて最適凍結速度と急冷可能温度域をしらべた。その結果、 $-5^{\circ}\text{C}$ ~ $50^{\circ}\text{C}$ の温度域を毎分 $1^{\circ}\text{C}$ 以下の緩慢な速度で冷却することが必要であった。しかし毎分 $5^{\circ}\text{C}$ のやや急速度で $-50^{\circ}\text{C}$ まで凍結後 $-50^{\circ}\text{C}$ に30分間以上保持するという方法を行なっても、ほぼ上記の緩慢冷却の場合と同等の結果をえた。これは、緩慢凍結あるいは $-50^{\circ}\text{C}$ での30分間保持によって卵細胞質内の脱水が進み、細胞内凍結による傷害を避けえたものと考えられ、過去に報告のみられない成果であると同時に、耐凍メカニズムに対する一つの解答を与えている。

2) 簡易急速凍結法の開発に関する研究では、試験管に入れたマウス受精卵を $-20^{\circ}\text{C}$ のアルコールと $-100^{\circ}\text{C}$ の液体窒素ガスに10分間ずつ静置させたのち、 $-196^{\circ}\text{C}$ の液体窒素に投入して凍結する方法を検討した。その結果従来は細胞内凍結を防ぐために緩慢凍結が必要とされていたのに対し、細胞内凍結が生じても生存しうることを明らかにした。この方法では、急速融解(毎分 $360^{\circ}\text{C}$ )およびやや高濃度の耐凍剤(Dimethylsulfoxide : DMSO)の使用が必要であった。またこの方法では、DMSOの除去過程に受ける傷害を防ぐために、新しい耐凍剤の除去方法が考案された。すなわち、融解された受精卵を、DMSOおよび蔗糖を含む液中に浮遊させて収縮させ、次に蔗糖のみを含む液中に移し、卵子を収縮させたままDMSOを除去する方法で、これによって水分の流入ひいては卵子の膨張による損傷を避けたものである。

この方法で受精卵を急速凍結融解し、耐凍剤を除去することによって高い生存率がえられ、移植後計15匹の産子がえられている。

以上のように本論文は卵子の耐凍メカニズムに関して一つの重要な解答を与え、また従来の緩慢凍結法とは根本的に異なる簡易急速凍結法の開発に成功しており、低温生物学ならびに家畜繁殖学に貢献するところが大きい。

よって、本論文は農学博士の学位論文として価値あるものと認める。