

## 不凍ポリアミノ酸 (Carboxylated- $\epsilon$ -poly-L-lysine, cPLL) や還元剤を用いた生殖細胞 (精子・胚) の新規保存技術

試験研究計画名：新たな細胞保護技術の活用と高付加価値・優良産子の増殖による肉用牛・乳用牛生産基盤強化

地域戦略名：新たな細胞保護技術の活用と高付加価値・優良産子の増殖による肉用牛・乳用牛生産基盤強化

研究代表機関名：(国) 鹿児島大学

地域の競争力強化に向けた技術開発のねらい：

人工授精や受精卵移植の牛精液や牛胚では凍結と融解が必要であり、その際の細胞へのダメージは必ず生じ、受胎率に影響します。しかし、これらの凍結保存液は長い間、大きな改良が成されていませんでした。この長い間手つかずであった凍結保存液の改良は受胎率向上の一助となる可能性があります。今回は、凍結・融解時の細胞保護の目的で新規材料の有効性を確認し、市販品として広く汎用できるものを調査した。

開発技術の特性と効果：

細胞の凍結保存方法は、1950年代に確立された、ジメチルスルホキシド (DMSO) もしくはグリセリン等の低分子凍結保護物質を用いた手法が一般的に用いられています。しかし、DMSOには細胞毒性があり、細胞によっては分化因子として働くことが知られています。本研究では、細胞や組織に対して安全性が高く、高効率で凍結保存できる新たな凍結保護剤として、 $\epsilon$ -ポリ-L-リジンを無水コハク酸で処理し、カルボキシル基を導入した『不凍ポリアミノ酸 (Carboxylated- $\epsilon$ -poly-L-lysine, cPLL)』は、多数の生物学的安全性試験により潜在的なリスクが評価されており、ウシ精液・受精卵 (胚) の凍結保存においても安全に利用できる材料です。写真1に示すように、赤インクを添加した水を凍結すると、通常は左のように色素と氷が分離する (凍結濃縮) が、cPLLを添加すると色素の分離が起きずに均一な氷が得られることが分かります。



写真1 凍結濃縮 (右：水、左：cPLL 添加水)

実際に cPLL の効果を確認するために、凍結保存精液の凍結融解後の精子生存率と運動性の評価を行いました。活力の低い (60%程度) の精子でも cPLL の 0.5% により、従来の保護剤を半量した場合との比較で、活力の低下が抑制されました (図1)。また、牛受精卵 (胚) の融解後の生存率・脱出率に対する cPLL の影響も確認し、7%の添加が良好な傾向が示されました (表1)。実際にこの2つの条件で、実証試験を行った結果は、新規法で受胎率が15%高い結果となりました。

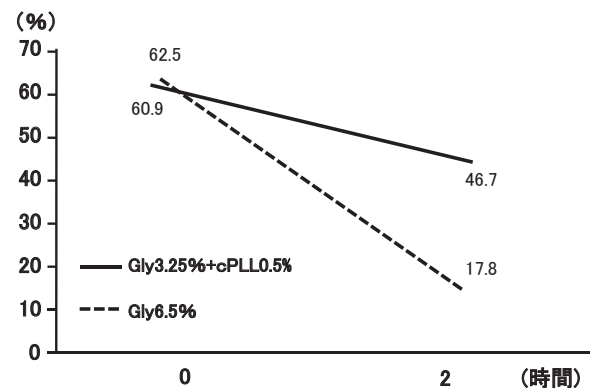


図1 cPLL添加による精子運動率の変化

表 1 ウシ体外受精卵(胚)の凍結融解後の胚の生存性と発育(体外受精卵:緩慢凍結法)

	凍結保護材				供試数	生存胚の割合			脱出胚率
	EG	PG	Suc	cPLL		融解直後	24 時間後	48 時間後	
従来法	5%	6%	0.1M	-	43	86%	28%	12%	4%
新規法	5%	6%	0.1M	7%	82	95%	40%	18%	6%

### 開発技術の経済性：

本技術は、従来の精液や受精卵の保存液に新規の保護剤を添加するのみの、非常に単純なものです。凍結精液と受精卵に対して、cPLL を添加するのみで効果が得られます。

受胎率向上の効果が望めるにも関わらず、添加する cPLL は溶液に対して僅か（精液 0.5%、胚 7%）で良く、技術導入に係る追加の経費は非常に軽微で、費用は、従来の保護剤に対して、精液ストロー 1 本に対して 160～200 円、受精卵 1 個に対して 600～750 円程度のアップを目指しています。既に cPLL を含有したストックソリューション製品（CryoBov™ シリーズ）が製品化されており（写真 2）、普及が可能です。



写真 2 製品化されたストックソリューション製品

（左）ウシ精液凍結用 cPLL 溶液（商品名：CryoBov™ for Sperm）：グリセリンと cPLL の混合溶液

（右）ウシ受精卵（胚）凍結用 cPLL 溶液（商品名：CryoBov™ for Embryo）：ウシ受精卵（胚）の緩慢凍結液（別途血清添加が必要）

### こんな経営、こんな地域におすすめ：

本技術は肉用牛生産農家、乳用牛生産農家へ直接の経済効果があります。また、人工授精師、受精卵移植を行う技術者が導入する技術と考えられます。同時に精液も受精卵も対象であり、広く畜産繁殖業界がターゲットとなります。

### 技術導入にあたっての留意点：

本技術は、特に新規の機材の導入は必要としません。新規細胞保護液の作製時も従来の、凍結精液、凍結受精卵の機材が利用できます。本技術は、単純な方法であり従来の人工授精や胚移植技術を有する技術者には特に問題となる留意点はないと思われま。添加濃度を大きく間違えてしまうと、予想される繁殖成績が得られないことに留意してください。

研究担当機関名：(国) 鹿児島大学、鹿児島県肉用牛改良研究所、(独) 家畜改良センター本所・鳥取牧場、(株) バイオベルデ、鹿児島県きもつき農業協同組合

お問い合わせは：(国) 鹿児島大学

電話 099-285-8750 E-mail vethos1@kuas.kagoshima-u.ac.jp

執筆分担 ((国) 鹿児島大学 三浦直樹、窪田力)