

| | | | |
|---------|---|----------|-----------|
| 氏 名 | GALABADA RALALAGE RUKMALI RUWANTHIKA ATHURUPANA | | |
| 授与した学位 | 博 士 | | |
| 専攻分野の名称 | 学 術 | | |
| 学位授与番号 | 博甲第5173号 | | |
| 学位授与の日付 | 平成27年 3月25日 | | |
| 学位授与の要件 | 環境生命科学研究科 農生命科学専攻 (学位規則第5条第1項該当) | | |
| 学位論文の題目 | CRYOPRESERVATION OF BOAR SPERMATOZOA USING TREHALOSE IN A GLYCEROL-FREE FREEZING EXTENDER (グリセロール無添加希釈液中でのトレハロースを用いた豚精子の凍結保存) | | |
| 論文審査委員 | 教授 舟橋 弘晃 | 教授 国枝 哲夫 | 准教授 若井 拓哉 |

学位論文内容の要旨

Frozen-thawed boar spermatozoa are still considered as suboptimal, due to the low conception rates and smaller litter sizes after artificial insemination. The relatively low fertility of frozen-thawed boar semen is associated with many factors including cytotoxicity of cryoprotectants, osmotic stress, injuries due to ice formation, cold shock damages and even inter and intra variations present in boars. These areas were addressed in the current study using Berkshire boar semen after freezing in straws. Results of the first study revealed that trehalose, a non-permeable sugar, could be replaced glycerol completely. It was capable of maintaining good levels of the motility, viability, acrosome integrity, mitochondrial membrane potential and in-vitro penetrability of boar spermatozoa after cryopreservation in a glycerol-free freezing extender. The optimum trehalose concentration was found to be 100 mM. According to the findings of the second study, rapid thawing at 60, 70 and 80 °C enhanced the motility, viability, acrosome integrity, mitochondrial membrane potential and in vitro penetrability of boar spermatozoa frozen in glycerol free tehalose extender, as compared with control (thawed at 39-40 °C). Keeping straws at 39 °C for 52 sec just after rapid transient thawing at 70 °C for 8 seconds was found to be the optimum thawing conditions. Results of the third experiment revealed that supplementing 2% skim milk in a glycerol-free trehalose extender improved the motility, viability, and mitochondrial membrane potential while 2 % coconut milk reduced the acrosome damage. Viability was also preserved when the extender was supplemented with both skim milk and coconut milk at 2%. In conclusion, better cryosurvival and post-thaw parameters were achieved when the boar spermatozoa were cyopreserved in a glycerol-free trehalose extender at 100 mM concentration and thawed rapidly with maintaining procedure at 39 °C. Cryosurvival of boar spermatozoa can also be improved by supplementing trehalose medium with 2 % skim milk and/or coconut milk.

論文審査結果の要旨

本研究は、ブタ精子凍結保存時の凍結液組成および融解条件について、画像解析技術および免疫細胞化学的手法、体外受精技術を用いて調べたものである。ブタ精子の凍結保存は、既に長い歴史を有しているが、ブタの生殖細胞が低温に極めて弱い性質を持つことから、ファームレベルで普及する技術には至っておらず、効率の良い凍結融解技術の開発が期待されている。

このテーマに取り組む本研究は、精子を凍結する際に必須である凍結保護物質の再検討から開始した。従来は、歴史的背景から細胞浸透性のグリセロールが広く用いられているが、凍結融解時の細胞膜や細胞小器官での傷害を考慮して、細胞非透過性のトレハロースへの置換を検討したところ、精子の運動性やミトコンドリア膜活性などで顕著な改善が見られ、ブタ精子の凍結保護物質としてトレハロースの有効性を見出した。

続いて、凍結精液の融解には古くから凍結精液の入ったストローを39℃の温水中で融解する方法がとられているが、ストロー内の精液の温度変化を解析したところ、ブタ精子が低温傷害を受けるとされている15℃までの到達時間が非常に長く、融解時に低温感作による傷害を受けている可能性を示した。そこで、60～80℃の高温水にストローを短時間さらして早い加温速度で融解された場合の精子性状および機能を解析したところ、70℃で8秒保持後に39℃で52秒保温した後に洗浄を開始する手法が最も正常で受精率の高い精子が得られることを見出した。

さらに、比較的安価で抗酸化物質や細胞膜保護機能の指摘されているココナッツミルクおよびスキムミルクのブタ精子凍結液への添加効果について検討し、それらの2%程度の添加が精子の性状を更に改善することを見出し、発展途上国などでの本技術の普及が見込める安価なブタ精液の凍結保存技術の改良に寄与した。

以上の成果から、RUKMALI ATHURUPANA氏は環境生命科学研究科の博士（学術）の学位を受けるに値すると判断した。