

学 位 論 文 題 名

Studies on the developmental potential of reconstituted  
mouse embryonic cells

(マウス胚細胞から作製された再構築胚の発育能に関する研究)

学位論文内容の要旨

哺乳類の胚細胞を用いた核移植の基礎的研究は主にマウスで行われてきた。その際、レシピエント細胞質として主に除核前核期胚が用いられ、除核未受精卵（Metaphase II期）を用いた研究は少ない。一方、家畜の胚細胞を用いた核移植研究のほとんどが、レシピエント細胞質として未受精卵を用いており、未受精卵が核移植のレシピエント細胞質として適していることを報告している。そこで、除核した受精前後のマウス卵子に2細胞期胚の単一割球を融合することによって作製した再構築胚の発育能を調べることによって、受精前後の異なる細胞質環境が2細胞期胚の核に与える影響について検討し、さらにその際、短期間に多数の卵子を除核し、再構築胚を作製する技術の確立を試みた。

まず、透明帯の除去・実体顕微鏡下での微細ガラス針による受精前後の卵子の核あるいは染色体の除去・フィトヘムアグルチニン-P (PHA-P) による除核卵子と単一割球の接着・電気融合・アルギン酸ゲルへの包埋という簡単なマニピレーション法を確立するため、2細胞期胚単一割球の融合に最適な電気融合条件およびアルギン酸ゲルへの包埋条件を検討した。透明帯を除去し、割球を分離した2細胞期胚をPHA-Pによって再凝集し、様々な条件下で電気融合した場合、2細胞期胚単一割球の電気融合に適した条件は幅広く、30-90 $\mu$ sec, 1.0-1.5kv/cm条件下で高い融合率(91.2-100%)と胚盤胞への発育率(86.2-100%)が得られた。胚細胞の保護に適当な硬度のアルギン酸ゲルは、0.5%アルギン酸ナトリウムを2.0%塩化カルシウム溶液中でゲル化した場合に形成された。

次に、透明帯の除去・微細ガラス針による前核期胚の切断二分離・電気融合アルギン酸ゲルへの包埋という簡単なマニピレーション法によって再構築された前核置換胚のin vitroおよびin vivoでの発育能を調べ、同法の胚細胞のクローニングへの応用の可能性について検討した。ICR系マウスとF1(C57/BLx CBA)マウス前核期胚を、微細ガラス針を用いて実体顕微鏡下

で切断二分離して、核を含まないフラグメント（サイトプラスト：CP）と核を含むフラグメント（カリオプラスト：KP）を作製し、CPとKPを交換して融合することによって前核置換胚を作製した。アルギン酸ゲル中に包埋した前核置換胚を *in vitro* で培養したところ74%が胚盤胞に発育し、レシピエントの子宮内に移植したところ9.1%が産子に発育した。以上の結果から、前核置換に用いられた一連の簡単なマニピレーション操作には胚細胞の発育に有害な影響は認められず、再構築胚の作出に有効であることが示された。

そこで、同法を胚細胞のクローニングへ応用するため、受精前後のマウス卵子を微細ガラス針を用いて実体顕微鏡下で前核あるいは染色体を除去することによって作製した細胞質フラグメント（CP）に初期あるいは後期2細胞期胚の単一割球（SB2）を電気融合することによって再構築胚を作製した。再構築胚の *in vitro* での発育能を指標として、異なる核と細胞質環境下での核と細胞質の相互作用について検討した。CPとSB2の融合率は、前核期胚のCPを用いた場合、91.2-97.6%と高い値を示したが、未受精卵（Metaphase II期）のCPを用いた場合は38.1-41.5%と有意に低い値を示した（ $P < 0.001$ ）。同様に、再構築胚の分割率でも、未受精卵のCPを用いた場合（56.3-61.2%）には、前核期胚のCPを用いた場合（91.0-91.2%）と比べ有意に低かった。（ $P < 0.001$ ）。再構築胚の *in vitro* での胚盤胞への発育率は、前核期胚のCPを用いた場合には、18.6-20.7%と低かったが、未受精卵のCPを用いた場合（2.0-3.1%）と比べ有意に高かった。さらに、エタノール処理によって、未受精卵のCPを用いて作製した再構築胚の活性化（Activation）を試みたところ、後期2細胞期胚の割球を融合させた再構築胚では、分割率は高まる傾向を示し（76.1%）、胚盤胞への発育率は有意に改善された（21.7%： $P < 0.05$ ）。以上の結果から、未受精卵の細胞質は融合した単一割球の発育を阻害する作用が強いこと、その作用は再構築胚の活性化によって解除されることが示唆された。

未受精卵は排卵後時間の経過するほど活性化しやすくなることが知られている。そこで、未受精卵のCPを用いた再構築胚の発生能と活性化の関係を調べるため、排卵後経時的に採卵した未受精卵のCPを用いて再構築胚を作製し、その発育能を検討した。hCG投与後14、18および22時間後に採卵したF1マウスの未受精卵から染色体を除去することによって作製したCP（14CP、18CP、22CP）をICR系マウスの初期あるいは後期2細胞期胚の単一割球と融合させて再構築胚を作製し、*in vitro* での発育能を検討したところ、hCG投与後時間の経過したCPを用いた場合ほどCPとSB2の融合率は高まる傾向が見られた（14CP；42.7-47.2%、22CP；75.3-77.6%： $P < 0.01$ ）。再構築胚の分割率においても同様な傾向が認められた（14CP；56.3-61.2%、22CP；82.2-90.7%： $P < 0.01$ ）。再構築胚の *in vitro* での胚盤胞への発育率は全体的に

低かったが、22CP と後期 2 細胞期胚の単一割球を融合した再構築胚 (20.8%) は他の組合せの再構築胚 (2.0-8.2%) と比べ有意に高い発育率を示した (2.0-8.2% および 20.8%)。これらの結果は、未受精卵に融合時と同じ電気刺激を与えた場合に、排卵後時間の経った未受精卵ほど高い活性化率が得られたことと一致していた (前核形成率: 14hr ; 12.4%, 22hr ; 86.5% ; 分割率: 14hr ; 12.4%, 22hr ; 86.5%)。以上の結果から、活性化され易い aging した未受精卵の CP を用いると再構築胚の発生率は増加することが示された。

本研究により、特別な機器を必要としない簡単な再構築胚作製法が確立された。さらに、同法を用いて様々な再構築胚を作製することにより、受精後および未受精の卵子の細胞質が再構築胚の発育に与える影響の相違を明らかにした。未受精卵をレシピエント細胞質として使用した場合には、再構築胚の融合後の発育のために活性化が必要であることを示す知見を得た。さらに、活性化され易い aging した未受精卵の細胞質を用いて再構築胚を作製し、未受精卵の細胞質を用いた再構築胚の発育能と活性化の相関関係が明確となった。

## 学位論文審査の要旨

主 査	教 授	金 川 弘 司
副 査	教 授	波 岡 茂 郎
副 査	教 授	杉 村 誠
副 査	助 教 授	高 橋 芳 幸

本研究は、哺乳類の胚細胞を用いた核移植の基礎研究として、除核した受精前後のマウス卵子に 2 細胞期胚の単一割球を融合することによって作製した再構築胚の発育能を調べることに より、受精前後の異なる細胞質環境が 2 細胞期胚の核に与える影響について検討した。さらにその際、短時間に多数の卵子を除核し、再構築胚を作製する技術の確立を試みたものであり、英文 95 頁からなる論文に 7 篇の参考論文を付している。

透明帯の除去・実体顕微鏡下での微細ガラス針による受精前後の卵子の核あるいは染色体の除去・フィトヘムアグルチニン-P (PHA-P) による除核卵子と単一割球の接着・電気融合・アルギン酸ゲルへの包埋という簡単なマニピュレーション法を確立するため、2 細胞期胚単一割球の融合に最適な電気融合条件およびアルギン酸ゲルへの包埋条件を検討した。透明帯を除去し、

割球を分離した2細胞期胚をPHA-Pによって再凝集し、様々な条件下で電気融合した結果、2細胞期胚単一割球の電気融合に適した条件は幅広く、30-90 $\mu$ sec、1.0-1.5kv/cm条件下で高い融合率(91.2-100%)と胚盤胞への発育率(86.2-100%)が得られた。胚細胞の保護に適当な硬度のアルギン酸ゲルは、0.5%アルギン酸ナトリウムを2.0%塩化カルシウム溶液中でゲル化した場合に形成された。上述の簡単なマニピレーション法を応用し、ICR系マウスとF1(C57/BLxCBA)マウス前核期胚を、微細ガラス針を用いて実体顕微鏡下で切断二分離した。前核置換胚は、核を含まないフラグメント(サイトプラスト:CP)と核を含むフラグメント(カリオプラスト:KP)を交換して融合することによって作製した。アルギン酸ゲル中に包埋した前核置換胚をin vitroで培養したところ74%が胚盤胞に発育し、レシピエントの子宮内に移植したところ9.1%が産子に発育した。以上の結果から、前核置換に用いられた一連の簡単なマニピレーション操作には胚細胞の発育に有害な影響は認められず、再構築胚の作出に有効であることが示された。

そこで、同法を胚細胞のクローニングへ応用するため、受精前後のマウス卵子を微細ガラス針を用いて実体顕微鏡下で前核あるいは染色体を除去することによって作製した細胞質フラグメント(CP)に初期あるいは後期2細胞期胚の単一割球(SB2)を電気融合することによって再構築胚を作製した。再構築胚のin vitroでの発育能を指標として、異なる核と細胞質環境下での核と細胞質の相互作用について検討した。CPとSB2の融合率は、前核期胚のCPを用いた場合、91.2-97.6%と高い値を示したが、未受精卵(Metaphase II期)のCPを用いた場合は38.1-41.5%と有意に低い値を示した( $P < 0.001$ )。同様に、再構築胚の分割率でも、未受精卵のCPを用いた場合(56.3-61.2%)には、前核期胚のCPを用いた場合(91.0-91.2%)と比べ有意に低い値を示した( $P < 0.001$ )。再構築胚のin vitroでの胚盤胞への発育率は、前核期胚のCPを用いた場合(18.6-20.7%)には、未受精卵のCPを用いた場合(2.0-3.1%)と比べ有意に高い値を示した( $P < 0.001$ )。さらに、エタノール処理によって、未受精卵のCPを用いて作製した再構築胚の活性化(Activation)を試みたところ、後期2細胞期胚の割球を融合させた再構築胚では、胚盤胞への発育率は有意に改善された(21.7% :  $P < 0.05$ )。以上の結果から、未受精卵の細胞質は融合した単一割球の発育を阻害する作用が強いこと、また、その作用は再構築胚の活性化によって解除されることが示唆された。

hCG投与後14、18および22時間後に採卵したF1マウスの未受精卵から染色体を除去することによって作製したCP(14CP, 18CP, 22CP)をICR系マウスの初期あるいは後期2細胞期胚の単一割球と融合させて再構築胚を作製し、in vitroでの発育能を調べることにより、未成熟

卵の aging の影響について検討した。hCG 投与後時間の経過した CP を用いた場合ほど CP と SB2 の融合率は高まる傾向が見られた(14CP ; 42.7-47.2%, 22CP ; 75.3-77.6% :  $P < 0.01$ )。再構築胚の分割率においても同様な傾向が認められた (14CP ; 56.3-61.2%, 22CP ; 82.2-90.7% :  $P < 0.01$ )。再構築胚の *in vitro* での胚盤胞への発育率は全体的に低かったが、22CP と後期 2 細胞期胚の単一割球を融合した再構築胚 (20.8%) は他の組合せの再構築胚 (2.0-8.2%) と比べ有意に高い発育率を示した (2.0-8.2% および 20.8%)。これらの結果は、未受精卵に融合時と同じ電気刺激を与えた場合に、排卵後時間の経った未受精卵ほど高い活性化率が得られたことと一致していた (前核形成率 : 14hr ; 12.4%, 22hr ; 86.5% ; 分割率 : 14hr ; 12.4%, 22hr ; 86.5%)。以上の結果から、活性化され易い aging した未受精卵の CP を用いると再構築胚の発生率は増加することが示された。

以上のように申請者は、特別な機器を必要としない簡単な再構築胚作製法を確立し、さらに、同法を用いて様々な再構築胚を作製することにより、受精後および未受精の卵子の細胞質が再構築胚の発育に与える影響の相違を明らかにした。未受精卵をレシピエント細胞質として使用した場合には、再構築胚の融合後の発育のために活性化が必要であることを確認し、さらに、活性化され易い aging した未受精卵の細胞質を用いて再構築胚を作製し、未受精卵の細胞質を用いた再構築胚の発育能と活性化の関係を明確にした。これらの成果は、この分野の発展に貢献するところが大きいので審査員一同は申請者、谷口 隆秀氏が博士 (獣医学) の学位を受ける資格があるものと認める。