

学位論文題名

Parthenogenesis in Mice and its
Application to Animal Reproduction

（マウスの単為発生および繁殖分野への応用）

学位論文内容の要旨

この研究では、まずエタノール刺激によるマウス単為発生卵の発育に影響を与えるいくつかの要因について調べた。つづいて、単為発生卵が4細胞期胚の単離割球の産子への発育を助けるか否かを調べた。

第1章では、排卵後の経過時間が単為発生卵の発育に及ぼす影響を調べた。Human Chorionic Gonadotropin (hCG) 投与後13.5時間目（排卵直後）に回収された卵子は、7% エタノール処理（1分間）により活性化することができなかった。しかし、hCG投与後17.5、21.5、25.5および29.5時間目に回収された卵子は、90%以上の割合で活性化された。半数体単為発生卵が得られる割合はhCG投与後、卵子が回収されるまでの時間が長くなるにつれ、89.5%から42.0%へと減少した。二倍体単為発生卵はhCG投与21.5時間目に活性化された卵子において、最も多く得られた（20.6%）。単為発生卵の胚盤胞への発育率は、排卵後の経過時間が長くなるに従って、半数体では51.9%から1.4%に、また二倍体では100%から83.3%に減少した。

第2章では、卵丘細胞の存在およびエタノール処理時間がサイトカラシンBにより誘起された二倍体単為発生卵の発育に与える影響を調べた。卵丘細胞の有無に関わらず、7% エタノールで1分間および4分間処理した卵子は、7分間処理した卵子より高い割合で胚盤胞へ発育した（卵丘細胞に包まれた卵子、96.7, 88.2 vs 48.8%；卵丘細胞を除去した卵子、97.1, 96.5 vs 52.3%）。エタノール活性化処理時の卵丘細胞の有無は、胚盤胞への発育率

に影響を与えなかった。しかし、1および4分間エタノールで処理した場合、卵丘細胞に包まれた卵子由来の単為発生胚盤胞は、卵丘細胞を除去した卵子由来の単為発生胚盤胞より細胞数が多かった（エタノール処理1分、63.5 vs 59.7個；エタノール処理4分、63.5 vs 58.8個）。

第3章では、胚の培養密度が、胚盤胞への発育率とその細胞数に与える影響を調べた。半数体および二倍体の単為発生卵は、Whittenの培養液25 μ lあたり1、5、10および20個ずつ培養した。半数体単為発生卵は、培養液あたりの培養胚数を1から20個に増加させると胚盤胞への発育率は28.9%から62.6%へ増加し、得られた胚盤胞の細胞数も65.5個から91.7個へ増加した。二倍体単為発生卵では、胚盤胞の細胞数のみ54.5個から68.0個へと増加した。

第4章では、二倍体単為発生卵と4細胞期胚の単離割球との集合により産子を得ることができるか否かを調べた。また、得られた産子のキメラ出現率を調べた。単為発生卵は、エタノールによる活性化後、31から32時間、48から49時間および53から54時間に得られた2、4および8細胞期胚を用いた。透明帯除去後、4細胞期胚の単離割球1個と1個の単為発生卵はピペットを用いて互いに押しつけることによって集合させた。使用した単為発生卵の発育ステージ（2、4および8細胞）によって集合胚の胚盤胞（82.0、73.0および72.3%）および産子（12.2、16.4および13.6%）へ発育する割合に有意差は認められなかった。2、4および8細胞期単為発生卵と4細胞期胚の集合胚からは高い割合で毛色キメラ産子が得られた（60.0、71.4および57.1%）。

この研究では、エタノール刺激によるマウス単為発生卵の発育は、卵子の老化、卵丘細胞の有無、エタノール処理時間および培養密度によって影響を受けることを明らかにした。また、マイクロマニプレーターを使用せずに、ピペット操作のみで胚を集合させる簡便な技術を開発した。更に、それ自体では産子へ発育する能力のない4細胞期胚の単離割球と単為発生卵とを集合させることにより、産子へ発育させることに成功した。

学位論文審査の要旨

主査 教授 金川 弘 司
副査 教授 板倉 智 敏
副査 教授 渡邊 智 正
副査 助教授 高橋 芳 幸

学位論文題名

Parthenogenesis in Mice and its Application to Animal Reproduction

(マウスの単為発生および繁殖分野への応用)

本研究では、エタノール刺激によるマウス単為発生卵の発育に影響を与える要因を調べた。つづいて、単為発生卵が4細胞期胚の単離割球の産子への発育を助けるか否かについて検討し、以下の新所見を得た。

1. 卵子の老化が単為発生卵の発育に及ぼす影響を調べた。排卵直後の卵子は、1分間の7%エタノール処理により活性化されないことが示された。排卵後の時間経過に伴い、単為発生卵の胚盤胞への発育率は減少した。

2. 卵丘細胞の存在およびエタノール処理時間が、二倍体単為発生卵の発育に及ぼす影響を調べた。卵丘細胞の有無に関わらず、7%エタノールで1および4分間処理した卵子は、7分間の処理に比べ高い割合で胚盤胞へ発育した。しかし、1および4分間処理では、卵丘細胞を有する卵子を用いた場合、卵丘細胞を除去した卵子に比べ得られた胚盤胞の細胞数が多かった。

3. 胚の培養密度が、単為発生卵の発育に及ぼす影響を調べた。胚の培養密度を増加させた場合、単為発生卵の胚盤胞への発育率あるいは得られた胚盤胞の細胞数は増加した。

4. 二倍体単為発生卵と4細胞期胚の単離割球との集合胚の産子への発育および得られた産子のキメラ出現率を調べた。2、4および8細胞期の単為発生卵を、透明帯

除去後、ピペットを用いて4細胞期胚の単離割球1個と集合させた。単為発生卵の発育段階により、集合胚の胚盤胞および産子への発育率に差異はなかった。各発育段階の単為発生卵との集合胚から高い割合で毛色キメラ産子が得られた。

本研究では、エタノール刺激によるマウス単為発生卵の発育は、卵子の老化、卵丘細胞の有無、エタノール処理時間および培養密度により影響を受けることを明らかにした。また、ピペット操作のみで胚を集合させる簡便な技術を開発した。更に、4細胞期胚の単離割球と単為発生卵との集合胚から産子を得ることに成功した。よって、審査員一同は、ピンヨブウムミン・アヌチャイ氏が博士（獣医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。