

学 位 論 文 題 名

ウシの体外成熟卵子と体外受精卵を用いた核移植に
関する研究

学位論文内容の要旨

本研究では、体外成熟卵子と体外受精卵をそれぞれレシピエントとドナーに用いたウシの核移植技術について検討した。

まず、レシピエントとなる卵子およびドナーとなる胚を体外成熟－体外受精－体外培養技術で作出するため、と体卵巢からの卵胞卵子の採取法を検討し、さらに、と殺したリピートブリーダー牛から採取した卵子の体外成熟－体外受精後の発育能を調べた。その結果、吸引法と2 mm間隔の5枚のカミソリの刃による細切法の併用あるいは破裂法により多数の卵子を効果的に回収できた。また、リピートブリーダー牛から1頭当たり平均45個の卵子が採取され、平均5個の胚盤胞が得られ、得られた胚は産子にまで発育することも確認した。さらに、体外成熟由来の加齢卵子と体外受精卵由来で媒精後116時間の胚を核移植に用いて作出した再構築胚は胚盤胞に発育することも確認されたが、その発育率は10%以下と低率であった。

そこで、再構築胚の発育率を改善するため次の実験を行った。はじめに、ウシ核移植において、ドナー核が再構築胚の発育に与える影響を明らかにするために、ドナー核として使用する割球の分裂同期化法を検討した。すなわち、各種濃度（0～20 μM ）のノコダゾールで体外受精由来の16細胞期胚を処理し、細胞分裂阻止に必要なノコダゾールの濃度およびノコダゾール解除後の割球分裂再開率への影響を調べた。さらに、ノコダゾール処理時の胚の培養条件が割球分裂再開率に及ぼす影響も調べた。その結果、10 μM ノコダゾールを用いて胚を12時間処理した場合、高率（90%）に細胞分裂は停止し、ノコダゾール解除後5時間以内の割球分裂再開率が最も高い（47%）ことが分かった。またノコダゾールへの暴露時間を36時間に延長すると

割球分裂再開率は低下することも判明した。さらに、修正TCM199を用いた5%CO₂および95%空気の湿度飽和気相からなる炭酸ガス培養装置内での培養に比べて、修正SOFを用いてCO₂およびO₂濃度をそれぞれ5%に調整した湿度飽和気相からなるN₂-O₂-CO₂ガス培養装置内での培養により、ノコダゾール解除後の割球分裂再開率の改善されることが分かった。そこで、ドナー割球の同期的分裂後の時間が再構築胚の胚盤胞期への発育率に与える影響も調べ、作出された胚盤胞の一部をレシピエント牛に移植した。その結果、ノコダゾール解除後6時間目（分裂再開後推定3～6時間目）の分裂ドナー割球を用いて作出した再構築胚は、ノコダゾール無処理の割球を用いた場合より有意に高い胚盤胞期への発育率が得られ（ $P < 0.01$ ）、得られた胚盤胞は産子にまで発育することが明らかとなった。

次に、核移植におけるレシピエント卵子への活性化処理が再構築胚の発育に与える影響を検討した。すなわち、加齢卵子へのエタノールの単一活性化処理が再構築胚の発育に及ぼす影響および若齢卵子と加齢卵子へのエタノールとシクロヘキシミドの複合活性化処理が再構築胚の発育に及ぼす影響を調べた。その結果、加齢卵子にエタノール単一活性化処理を施した場合、無処理の卵子に比べ再構築胚の分割率と胚盤胞期への発育率は有意に向上した（ $P < 0.05$ ）。複合活性化処理を施した若齢卵子をレシピエントに用いて作出された再構築胚の胚盤胞期への発育率は他の卵子に比べ有意に高くなった（ $P < 0.05$ ）。単一活性化処理された若齢卵子がレシピエントに用いた場合のみ、早期染色体凝縮および分裂期の核相が再構築胚の核に観察された。しかし、他の3群の卵子をレシピエントに用いた場合すべて再構築胚の核は膨化した。割球と卵子の膜融合時、単一活性化処理された若齢卵子はMPF活性が高く、他の3群の卵子ではMPF活性の低いことが示唆された。

以上の研究結果から、ドナー胚として用いる体外受精由来16細胞期胚は、10 μ Mノコダゾール添加修正SOFを用いてCO₂およびO₂濃度をそれぞれ5%に調整した湿度飽和気相からなるN₂-O₂-CO₂ガス培養装置内で12～24時間培養すればより多くの割球の分裂同期化がはかれ、さらに、ノコダゾール解除後6時間目（分裂再開後推定3～6時間目）の分裂割球をドナー割球として用いた場合、再構築胚の胚盤胞期への発育率は無処理の割球での10%以下から約30%に改善することが明らか

となった。レシピエント卵子に、8加齢卵子の代わりに複合活性化処理された若齢卵子を用いれば、再構築胚の胚盤胞期への発育率は約30%から43%に向上することが明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 金 川 弘 司

副 査 教 授 板 倉 智 敏

副 査 教 授 岩 永 敏 彦

副 査 助 教 授 高 橋 芳 幸

学 位 論 文 題 名

ウシの体外成熟卵子と体外受精卵を用いた核移植に関する研究

体外成熟卵子と体外受精卵を用いたウシ核移植技術について検討を加えた。まず、予備実験として、ウシと体の卵胞卵子の採取法および体外成熟・体外受精後の発育能を検討し、さらに、作出した胚を核移植に用いた。その結果、卵胞卵子の採取法としては吸引法と細切法の併用あるいは破裂法が効果的であること、採取した卵子を体外成熟・体外受精により得られた胚は産子にまで発育することが確認された。また、体外成熟卵子と体外受精卵の16細胞期胚によって作出した再構築胚は胚盤胞に発育することも確認されたが、発育率は10%以下の低率であった。

そこで、再構築胚の発育を改善するため、核移植におけるドナー割球としてドナー胚の細胞分裂を同期化した割球の再構築胚の発育に与える影響を検討した。その結果、ドナー胚は10 μ Mノコダゾール添加修正合成卵管液を用いて炭酸ガスおよび酸素濃度をそれぞれ5%に調整した湿度飽和気相からなる培養装置内で12～24時間培養し、ノコダゾール解除後6時間（分裂再開後推定3～6時間）の分裂割球を用いることにより、再構築胚の胚盤胞期への発育率（30%）が改善された。この条件で作出した再構築胚をレシピエント牛に移植して産子にまで発育することを確認した。

ついで、核移植におけるレシピエント卵子の培養時間と活性化処理法が再構築胚の発育に与える影響を検討した。その結果、エタノールとシクロヘキシミドの複合活性化処理を加えた若齢卵子（体外成熟培養；24時間）をレシピエントとして用いた場合、胚盤胞期への発育率（43%）が改善されることが明らかとなった。

以上、ウシ体外成熟卵子と体外受精卵を用いた核移植に関する研究を行い、特に、ドナー核とレシピエント細胞質との調整が大切なことなど核移植に関する多くの要因を解明した。これらは、核移植に関する基礎的研究として、発生機序の解明や今後の畜産の発展に寄与するものと考え

えられた。よって、審査員一同は、田中穂積氏が博士（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。