

学位論文題名

Peri - and Post - implantation Development of Mouse
Half Embryos *In Vivo* and *In Vitro*(In Vivo および In Vitro におけるマウス 2 分離胚の着床期
とその後の発育に関する研究)

学位論文内容の要旨

本研究では、マウス桑実胚における細胞数の減少がその後の発育と形態形成に及ぼす影響を調べる目的で、2分離胚の着床期以後の発育を *in vivo* および *in vitro* で調べた。

第1章では、収縮桑実胚を切断2分離し、受胚雌マウスへ移植後、*in vivo* における胚の発育と子宮の脱落膜反応を観察した。収縮桑実胚は decompaction 処理後に、ガラス微細針を用いて切断した。2分離胚はBMOC-3培地で36時間培養後に、明瞭な内細胞塊と栄養膜を有する eu-blastocyst (eu-blast), 内細胞塊が不明瞭な pseudo-blastocyst (pseudo-blast), 内細胞塊を有しない trophectodermal vesicle (TV) および不規則な細胞塊である nonintegrated form (NIF) の4種類に分類した。偽妊娠3.5日目の雌マウスの片方の子宮角に2分離胚を移植し、反対角には切断していない対照胚を移植した。Eu-blastの細胞数は、対照胚の51%であった。Eu-blast移植後の脱落膜形成率は69.6~80.4%であり、対照胚の脱落膜形成率(77.3~81.5%)との間に有意差は認められなかった。しかし、妊娠5.5日目におけるeu-blast移植後の脱落膜組織は、対照胚に比べて有意に小さかった($P<0.001$)。6.5日目における卵円筒期以後へのeu-blastの発育率は47.3%であり、対照胚の発育率(76.5%)よりも有意に低かった($P<0.05$)。Eu-blastでは、7.5日目から9.5日目にかけて発育率が44.6%から27.6%に有意に減少し($P<0.05$)、胚の消失が認められたが、対照胚ではこの期間に発育率の有意な低下はみられなかった。Eu-blastでは、5.5日目から9.5日目の間に対照胚に比べて発育の遅延が認められたが、10.5日目には対照胚と同じ発育ステージに到達した。5.5日目における

eu-blast由来の卵円筒の長さは対照胚の68%であったが、10.5日目の胎子の頭尾長は対照胚の90%であった。Pseudo-blastの細胞数は、対照胚の25%であった。Pseudo-blast移植後の脱落膜形成率は50.0~62.5%と低く、卵円筒への発育率は10%以下であった。Pseudo-blast由来の卵円筒には、原始線条や中胚葉の形成は認められなかった。TVとNIFの細胞数は、対照胚の18%以下であった。TVとNIFの移植による脱落膜形成率は25.0~50.0%と低く、卵円筒は形成されなかった。

第2章では、収縮桑実胚を切断2分離し、*in vitro*の着床モデルを作成して胚の付着、栄養膜細胞のout growthと侵入および卵円筒の形成を観察した。2分離胚は、BMOC-3培地で36時間培養し、さらに第1章と同様に形態別に4種類に分けて20%ウシ胎子血清添加CMRL-1066培地で培養を行った。2分離胚をプラスチック上および単層を形成したマウス子宮内膜上皮細胞上で72時間培養した結果、eu-blastとpseudo-blastにおける胚の付着率および栄養膜細胞のout growth率は、対照胚の値と比べて差は認められなかった。しかし、TVとNIFのout growth率は対照胚に比べて有意に低い値を示した($P<0.01$)。2分離胚をI型コラーゲン・ゲル上で培養した結果、eu-blastでは、培養36時間後における原始内胚葉形成率(89.7%)は対照胚との間に差は認められなかったが、72時間後における卵円筒の形成率は有意に低下した(90.0 vs. 98.8%, $P<0.05$)。Pseudo-blastでは、36時間後における原始内胚葉形成率は75.0%であり、72時間後における卵円筒形成率は61.1%であった。TVとNIFでは、out growth率が低く、原始内胚葉と卵円筒の形成はみられなかった。細胞質突起による栄養膜細胞のコラーゲン・ゲル内への侵入は、胚の発育ステージに関わらず、4種類全ての2分離胚で観察された。

本研究では、*in vivo*におけるマウス2分離胚の消失、発育の遅延および大きさの減少が明らかになった。Eu-blastでは、妊娠7.5日目から9.5日目で発育率が著しく低下するが、10.5日目には正常な発育ステージに到達し、90%まで大きさの調節が行われた。しかし、桑実胚における細胞数の著しい減少は、胚の代償的な発育を調節する能力だけでなく、子宮の脱落膜反応や*in vitro*における原始内胚葉と卵円筒の形成に影響を及ぼすことが明らかになった。

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

Peri - and Post - implantation Development of Mouse Half Embryos *In Vivo* and *In Vitro*

(*In Vivo* および *In Vitro* におけるマウス 2 分離胚の着床期
とその後の発育に関する研究)

申請者は、マウス桑実胚における細胞数の減少が発育と形態形成に及ぼす影響を調べる目的で、2 分離胚の着床期以後の発育を *in vivo* および *in vitro* で検討し、以下の所見を得た。

1. 桑実胚を切断 2 分離し、培養後に受胎雌マウスへ移植して *in vivo* における観察を行った。内細胞塊が明瞭で、切断していない対照胚の 51% の細胞数を有する胚盤胞を移植した場合には、脱落膜形成率は対照胚と同程度であったが、脱落膜組織は小さかった。また、卵円筒期以後への発育率は対照胚よりも低く、妊娠 7.5 日目から 9.5 日目にかけて著しく減少した。内細胞塊が明瞭な胚盤胞を移植して得られた胚および胎子は対照胚に比べて小さく、発育ステージが遅延していたが、10.5 日目には正常な発育ステージに到達し、大きさも対照胚の 90% まで増加した。内細胞塊が不明瞭で対照胚の 25% の細胞数を有する胚盤胞を移植した場合には、脱落膜形成率は低く、卵円筒への発育率は 10% 以下であった。

2. 桑実胚を切断 2 分離し、*in vitro* の着床モデルにおける観察を行った。2 分離胚をプラスチック上および単層を形成したマウス子宮内膜上皮細胞上で培養した結果、内細胞塊が明瞭な胚盤胞と不明瞭な胚盤胞は、対照胚と同程度の付着率および栄養膜細胞の伸展率を示した。しか

し、2分離胚をI型コラーゲン・ゲル上で培養した結果、内細胞塊が明瞭な胚盤胞における卵円筒の形成率は対照胚に比べて低下した。内細胞塊が不明瞭な胚盤胞では、原始内胚葉の形成率も低下した。

本研究では、マウス2分離胚の *in vivo* における胚の消失、発育ステージの遅延、大きさの減少および発育ステージと大きさの調節を証明した。また、桑実胚における細胞数の著しい減少は、胚の発育や大きさを調節する能力だけでなく、子宮の脱落膜反応や *in vitro* における原始内胚葉と卵円筒の形成に影響を及ぼすことを新たに証明した。よって、審査員一同は、菱沼 貢氏が博士（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。