

学 位 論 文 題 名

ウシの体外受精由来胚盤胞のガラス化保存に関する研究

学位論文内容の要旨

ウシの体外受精由来胚盤胞に適した実用的なガラス化保存法の開発を目的として、基礎的ならびに応用的研究を行った。

1. グリセロールとプロピレングリコールを用いたウシの体外受精由来胚盤胞のガラス化保存

ウシの体外受精由来胚盤胞のガラス化保存法を検討するためにグリセロールとプロピレングリコールを用いたガラス化液で実験を行った。まず、ガラス化液に必要な凍害保護物質の最低濃度を検討した結果、グリセロール22.5%およびプロピレングリコール22.5%であった。次に、この最低有効濃度の凍害保護物質を添加したガラス化液に1、2、4、8および16段階で胚を平衡し、ガラス化液への平衡条件が胚の生存率に及ぼす影響を調べた。各区の生存率はそれぞれ56、89、100、100および100%だった。また、平衡後ガラス化保存した胚の生存率はそれぞれ0、10、79、82および87%で、4段階以上の区で有意に高い値が得られた。次に2段階法（10%グリセロール、20%プロピレングリコール液中へ10分間胚を平衡後、ガラス化液へ胚を投入）および16段階法で処理した胚のガラス化保存後の生存性を検査するとともに、フリーズレプリカ法を用いて微細構造の変化を観察した。16段階法では高い生存率(83%)が得られたが、2段階法では生存胚は得られなかった。また、両群とも細胞内外には氷晶の形成は観察されず、溶液の完全なガラス化が確認された。16段階法では原形質膜の微細構造に大きな変化は見られなかったが、2段階法では原形質膜と細胞内器官が著しく接近して膜内粒子の凝集、あるいは膜内粒子が著しく減少した部位(aparticulate domain)の発生が顕著に観察された。さらに、ガラス化保存胚を10頭の受胚ウシに移植した結果、6頭が受胎、5頭の正常な子ウシが得られ、ガラス化保存胚が正常な胎子および産子へ発育することが確認された。

## 2. エチレングリコールとシヨ糖を用いたウシの体外受精由来胚盤胞のガラス化保存

体外受精由来ウシ胚の簡易かつ有効なガラス化保存法と野外応用のための凍害保護物質のストロー内希釈法を開発するため、エチレングリコールとシヨ糖を用いたガラス化保存法の検討を行った。10%グリセロールを添加した基本液（平衡液）に胚を5分間平衡後、1 Mシヨ糖と30%のグリセロールまたはエチレングリコールを添加した基本液に胚を曝露した結果、それぞれ87および100%の生存率が得られた。また、同様に平衡後ガラス化保存した胚の生存率は70および73%であった。次に、1 Mシヨ糖と30%エチレングリコールを添加したガラス化液でガラス化保存した胚を融解後、0~20%の卵黄と0.5 Mシヨ糖を添加した希釈液で凍害保護物質の希釈を行い生存率を調べた結果、5~15%の卵黄添加区では無添加区に比較して有意に高い生存率が得られた。また、胚を1 Mシヨ糖と30%エチレングリコールを添加したガラス化液に平衡後、2種類のストロー内希釈法を検討した。あらかじめ150  $\mu$ lの希釈液（10%卵黄 + 0.5 Mシヨ糖添加）とその下部に25  $\mu$ lのガラス化液を吸引しておいたストローへピペットにより胚を導入するストロー内希釈法を用いた場合、ガラス化保存後に高い生存率（93%）が得られた。さらに、ストロー内希釈したガラス化保存胚を20頭の受胎ウシに1個ずつ移植を行ったところ、11頭が受胎し9頭の正常な子ウシが得られた。

以上のことから、グリセロールとプロピレングリコールを用いたガラス化法においては、ガラス化液への平衡を緩慢にすることによって平衡時の胚の障害を緩和し、ガラス化保存後のウシの体外受精由来胚盤胞の高い生存性を得られることが明かとなった。また、30%エチレングリコールと1 Mシヨ糖を含むガラス化液および0.5 Mシヨ糖と5~15%卵黄を添加した希釈液を使用することによって、2段階の簡易な平衡方法でもウシの体外受精由来胚盤胞を高率にガラス化保存することができ、さらに、ガラス化保存胚は凍結ストロー内で凍害保護物質の希釈を可能にすることが示された。すなわち、ウシの体外受精由来胚盤胞の簡易なガラス化保存とストロー内希釈法による実用化の可能性が示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	金川弘司
副査	教授	斉藤昌之
副査	教授	渡邊智正
副査	助教授	高橋芳幸

## 学位論文題名

### ウシの体外受精由来胚盤胞のガラス化保存に関する研究

本研究では、ウシの体外受精由来胚盤胞のガラス化保存法を開発するとともに、ガラス化保存過程における胚の障害の機構に関する知見を得る目的で実験を行った。まず、グリセロールとプロピレングリコールを含むガラス化液への平衡がガラス化保存後の生存性に及ぼす影響を検討した結果、16段階で緩慢に平衡を行うことにより、高い生存率の得られることが明らかとなった。次に、16段階で平衡後にガラス化保存した胚の微細構造の観察を行ったところ、細胞内外溶液の完全なガラス化と微細構造の維持が観察された。一方、生存胚が得られなかった2段階で平衡後にガラス化した胚では原形質膜と細胞内器官が著しく接近して、膜内粒子の凝集、あるいは著しく減少した部位が顕著に観察された。さらに、より実用的なガラス化保存法を開発するため、各種ガラス化溶液とストロー内封入法の検討を行った。その結果、1Mショ糖と30%のエチレングリコールを含むガラス化液および5~15%の卵黄と0.5Mショ糖を添加した希釈液を用い、連続した希釈液とガラス化液のカラムを作成することによりガラス化保存胚のストロー内希釈が可能で、移植後、正常な産子率(45%)の得られることが分かった。これらの実験結果より、ウシの体外受精由来胚盤胞はガラス化保存が可能であることをはじめて明らかにし、また、ガラス化保存後の高い胚生存率を得るためには、細胞内外溶液のガラス化と胚の微細構造変化は最小であることが必要なことも明らかにした。さらに、本研究で開発されたガラス化保存胚のストロー内希釈法は、簡易でかつ高い生存性の得られることも実証した。

これらの成果は、ウシ胚の保存技術を効率化し、畜産および発生工学の発展に貢献するところが大きい。よって、審査員一同は、桑山正成氏が博士(獣医学)の学位を受ける資格を有するものと認めた。