

学 位 論 文 題 名

Development *in vitro* of mouse embryonic nuclei
fused to chemically enucleated oocytes

（化学的除核卵子と融合したマウス胚細胞核の体外発育）

学位論文内容の要旨

哺乳動物の核移植においては、機械的に除核を行った第二減数分裂中期（MII期）の卵子がレシビエント細胞質として用いられている。機械的除核法は技術習得に時間を要するため、核移植技術の普及に支障を与えている。また、機械的除核法は分裂中期染色体だけでなく、一部の細胞質も除去するので、再構築胚の生存性を低下させる可能性がある。したがって、本研究では薬剤を用いて化学的に除核した卵子の核移植研究への利用の可能性について検討した。

まず、第1章では、細胞質と核体の融合のモデルとしてマウス2細胞期胚を用いて、電解質溶液中での電気融合条件について検討した。透明帯除去マウス2細胞期胚は、10%ウシ胎子血清（FCS）を含むリン酸緩衝液（PBS）中で異なる電気融合条件下で融合を行った。2細胞期胚に70V/mmの直流パルスで30～90 μ sec通電する電気刺激を1～4回与え、5～10V/mmの交流電流を通電することで、高い融合率（92.5～100%）および胚盤胞期への発育率（82.4～94.5%）が得られた。上述の融合条件を用いた場合、10%FCSを含むPBS中で、卵子細胞質と核体の高い電気融合率の得られることが示された。

第2章では、染色体の結合を維持することでマウス卵子の化学的除核を引き起こすことの知られているエトボシド（ETO）およびシクロヘキシミド（CHXM）の適切な濃度条件を検討するために、第一減数分裂中期（MI期）のマウス卵子を異なった濃度のETOおよびCHXMを含む培養液中で培養した。ETOおよびCHXMはいずれも36～50 μ g/ml濃度で、染色体を高率（93.5～

98.0%)に極体として放出・除去したため、この濃度のETOおよびCHXMが、MI期のマウス卵子の化学的除核に最適であることが示された。さらに、化学的除核卵子の加齢が再構築胚の発育に及ぼす影響を調べるために、後期2細胞期胚の単一割球と化学的除核卵子の電気融合を行った。後期2細胞期胚由来の単一割球は、ETO処置後4~8、15および24時間後の卵子と、フェトヘマグルチニン(PHA-P)を含む培養液中で集合させた後、PBS中で電気融合した。加齢段階の増加に伴い、融合率および分割率は有意に増加した。しかし、加齢段階の進んだ化学的除核卵子と融合した再構築胚でも、胚盤胞へは発育せず、再構築胚の85.5%は中期核板の形態異常を示した。この結果から、本実験の条件で化学的に除核した卵子の細胞質は、後期2細胞期胚由来の割球の発育に対して抑制的な効果を持つことが分かった。

第3章では、化学的除核処理を施した卵子細胞質に残存するETOの除去を目的に ETO処理卵子をショ糖へ暴露して、化学的除核卵子の質を改善する可能性を調べた。卵核胞期(GV期)のマウス卵子はTCM-199中でMI期まで成熟培養を行ったのち、化学的除核処理を施した。その後、0.75Mのショ糖に暴露する試験区と暴露しない試験区とに分け、前核期胚由来の核体と電気融合させた。再構築胚は、7%エタノールによる活性化処置を施したのち、体外培養を行い、胚盤胞への発育を調べた。さらに、胚盤胞へ発育した再構築胚は、染色体数を検査した。ショ糖へ暴露された化学的除核卵子では、21.5%の再構築胚が胚盤胞へ発育したが、ショ糖へ暴露しなかった卵子を用いて作成した再構築胚では、まったく胚盤胞へ発育しなかった。ショ糖へ暴露した卵子を用いて作成した再構築胚では、正常な倍数体(40染色体)を示した。ついで、ETOへの暴露によるMII期のマウス卵子の機能的な除核を試みた。MII期の卵子は、7%エタノール刺激による単為発生誘起処理の前後に50 μ g/ml ETOで処理したのち、0.75Mショ糖へ暴露した。ETOで処理した単為発生誘起卵子は、単独あるいは後期2細胞期胚由来の単一割球との融合を行ったのち体外培養した。また、対照群として、ETO無処理の単為発生誘起卵子の体外培養を行った。ETOで処理した単為発生誘起卵子は2細胞期胚以上に発育しなかったが、再構築胚および対照群では、それぞれ4.0および35.5%が胚盤胞へ発育した。これら結果から、MI期で

ETOによる化学的除核を行い、さらにショ糖へ暴露したマウス卵子は、核移植のレシビアント細胞質として利用可能なこと、また、ETOによりDNAトポイソメラーゼIIの酵素作用を抑制することでMII期マウス卵子の機能的な除核も可能なことが示唆された。

上述の実験で作成された再構築胚は透明帯が除去されているため、人工透明帯（AZP）のような保護層で被うことにより発育の改善される可能性がある。そこで、第4章ではマウス前核期胚をモデルとして用いて、顕微操作を加えた胚の体外発育へ及ぼすAZPの影響を調べた。完全な透明帯を有する胚（ZI）、切開処置を施した透明帯を有する胚（ZS）あるいは透明帯を除去した胚（ZF）は、1.5%アルギン酸ナトリウムにより作製されたAZPを用いて包埋した後、体外培養を行った。AZPは、4細胞期胚の細胞接触およびZI、ZSおよびZF胚の胚盤胞への発育を有意に改善した（ $p<0.05$ ）。この結果から、AZPは、再構築胚の体外発育を改善するために利用できることが示唆された。

本研究の結果から、ETOを用いて化学的に除核したマウス卵子は、核移植研究のためのレシビアント細胞質として利用できることが明らかになった。また、ETO処理卵子に対するショ糖への暴露は、再構築胚の発育を左右する重要な処理であることが分かった。さらに、人工透明帯を用いた包埋により、再構築胚の発育を改善できることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 金 川 弘 司
副 査 教 授 渡 邊 智 正
副 査 教 授 岩 永 敏 彦
副 査 助教授 高 橋 芳 幸

学 位 論 文 題 名

Development *in vitro* of mouse embryonic nuclei fused to chemically enucleated oocytes

(化学的除核卵子と融合したマウス胚細胞核の体外発育)

通常、核移植に用いるレシピエント卵子の除核は機械的に行われているが、この操作は熟練を要する。そこで、申請者は簡単な除核法を開発するため、マウスの卵子を用いて化学的除核法について検討を加えた。

まず、細胞質と核体の融合モデルとしてマウス2細胞期胚を用い、高い融合率が得られ、しかも融合胚の発育に障害を及ぼさないような電気融合条件を確立した。ついで、DNAトポイソメラーゼIIの作用を抑制するエトボシド(ETO)と蛋白合成阻害作用を有するシクロヘキシミド(CHXM)を用いて、第一減数分裂中期(MI期)のマウス卵子を化学的に除核するために必要な条件を検討した。高い除核成績の得られる条件を見だし、その条件で処理した卵子と後期2細胞期胚の単一割球の電気融合を行った。その結果、融合率も融合して得られた再構築胚の分割率も高かったが、再構築胚は胚盤胞へ発育しなかった。そこで、ETOとCHXMによる除核処理を施したMI期の卵子をショ糖(0.75M)に暴露し、前核期胚の核体と電気融合させた結果、再構築胚の22%が胚盤胞へ発育した。さらに、ETOとCHXM処理の後ショ糖へ暴露した第二減数分裂中期(MII期)の卵子と前核期胚の核体を電気融合して作成した再構築胚も低率(4%)ながら胚盤胞へ発育することが確認された。また、透明帯に核移植用の穴を開けたマウス前核期胚をアルギン酸ナトリウムの人工透明帯で覆うと胚の体外発育が改善されることも明らかにした。

本研究からETOとCHXM処理によりマウス卵子(MIおよびMII期)を化学的に除核することができ、とくにETOとCHXM処理卵子をショ糖へ暴露することによって核移植のレシピエント細胞質として利用できることを初めて明らかにした。よって、審査員一同は、申請者が博士(獣医学)の学位を受ける資格を有すると認めた。