

学 位 論 文 題 名

Bovine nuclear transfer using embryonic blastomeres and cumulus cells

（割球および卵丘細胞を用いたウシの核移植）

学位論文内容の要旨

割球および体細胞を核質として用いたウシの核移植技術を確立するために、発生能の高いレシビエント細胞質体を効率的に作出できる除核法を開発するとともに、核質と細胞質体の細胞周期の適切な調整法および組み合わせを検討した。

レシビエント細胞質体には、ウシ屠体卵巣から採取して体外成熟および除核操作を行った卵子を用いた。卵子の除核操作は活性化処理の前あるいは後に行った。核質のドナーには、ウシ体外受精由来32細胞期胚の割球と体外成熟卵子に付着する卵丘細胞を供試した。割球は、予めカルシウム・イオノホアA23187とシクロヘキシミドによる活性化処理を行った除核卵子と電気融合させた。一方、卵丘細胞は除核卵子と電気融合後にシクロヘキシミド処理を加えるか、あるいは予め活性化処理を行った除核卵子と電気融合させた。

第Ⅰ章では、卵胞から回収した未成熟卵子を形態的に2群の品質に分けて、レシビエント細胞質体としての卵子の品質が核移植胚の発育に及ぼす影響について検討した。形態的に高品質と判定された卵子は低品質と判定された卵子よりも体外成熟率が高かった。さらに、高品質と判定された卵子を用いて作製した核移植胚は、低品質と判定された卵子を用いて作製した核移植胚に比べて胚盤胞への発育率が高く、得られた胚盤胞の細胞数も多かった。これらの結果から、核移植のレシビエント細胞質体として使用する卵子の形態的な選抜の重要性が示された。

第Ⅱ章では、従来の除核法における低い除核成功率の原因を調べるとともに、活性化処理を加えた後に除核する方法について検討した。まず、体外成熟培養終了直後の卵子と成熟培養後に活性化処理を加えた卵子の核の位置を調べた。その結果、成熟培養直後では第一極体の直下に卵細胞核が存在する卵子の割合は41%であったが、活性化処理を加えた場合には、すべての卵子で第二極体の直下に卵細胞核が観察された。また、成熟培養直後の卵子の除核成功率は60%であったが、除核前に活性化処理を加えた卵子では92%の高い除核成功率が得られた。両群の除核卵子と割球を用いて核移植を行ったが、核移植胚の胚盤胞への発育率に差異は見られなかった。これらの結果から、卵子を活性化処理してから除核すると除核成功率は高く、この除核操作は核移植胚の発育に対して悪影響のないことが分かった。

第Ⅲ章では、卵丘細胞を血清飢餓処理あるいはコンフルエントになるまで培養処理してサイズと細胞周期の関係を調べるとともに、これらの培養細胞を核質のドナーとして用いた核移植胚の発育能を検討した。培養卵丘細胞のサイズ別の分布には培養処理法による差異がなく、直径15～20 μm の中型細胞が最も高頻度（約65%）で回収された。フローサイトメーターを用いて培養細胞の細胞周期を調べた結果、いずれの培養処理法でも小型お

よび中型細胞におけるG0/G1期細胞の割合（95～98%）は、大型細胞（82%）に比べて高い値を示した。血清飢餓処理後に得られた小、中および大型細胞を核質ドナーとして用いて核移植を行ったが、融合率、卵割率および胚盤胞への発育率にドナー細胞のサイズによる差異は見られなかった。また、2種類の培養処理で得られた中型細胞を用いて作製した核移植胚の発育率を比較したが培養処理法による差異はなかった。これらの結果から、卵丘細胞を血清飢餓あるいはコンフルエント処理した場合、最も高頻度に回収される中型細胞をG0/G1期の核質のドナー細胞として核移植に使用できることが明らかになった。

第IV章では、体細胞を用いた核移植における核質ドナー細胞とレシビエント細胞質体の細胞周期の適切な組み合わせについて検討するため、まず、コンフルエント処理あるいはアフジコリン処理した卵丘細胞の生存性、サイズおよび細胞周期を調べた。アフジコリン処理した卵丘細胞はコンフルエント処理した細胞に比べてサイズは大きかったが、両者の生存性に差異を認めなかった。また、コンフルエント処理した細胞の約95%はG0/G1期であり、アフジコリン処理解放後2時間目の細胞の約70%はS期であることが分かった。コンフルエント処理（G0/G1期）あるいはアフジコリン処理（S期）卵丘細胞を核質のドナーに、第二減数分裂中期（M期）あるいは活性化処理（S期）除核卵子をレシビエント細胞質体として用いて、核質+レシビエント細胞質体の組み合わせが異なる3種類の核移植胚（G0/G1期+M期、G0/G1期+S期およびS期+S期）を作製して、体細胞核移植における核質と細胞質体の最適な細胞周期の組み合わせについて検討した。その結果、G0/G1期+M期の組み合わせにより作製した核移植胚は、他の組み合わせに比べて胚盤胞への発育率が高かった（38.3 vs 1.5 および2.1%）。これらの結果から、卵丘細胞を核質ドナーとして用いた核移植ではG0/G1期の核質とM期の細胞質体の組み合わせにより発生能の高い核移植胚の得られることが明らかになった。また、割球を核質ドナーとする核移植（第IおよびII章）には有効であったS期+S期の組み合わせは、体細胞を核質ドナーに用いた核移植には適していないことが示唆された。

第V章では、コンフルエント処理した卵丘細胞を用いて作製した核移植胚（G0/G1期の核質とM期の除核卵子）および割球を核質として用いた核移植胚（S期の核質とS期の除核卵子）の胚盤胞までの発育過程を体外受精胚の発育過程と比較した。3者の卵割率、胚盤胞への発育率および胚盤胞の細胞数に差異は認められなかったが、2種類の核移植胚の初回卵割から胚盤胞形成までの時間は体外受精胚に比べて約6時間短かった。染色体構成が正常な胚盤胞の割合は卵丘細胞を用いた核移植胚と体外受精胚の間に差異は認められず、核移植胚における核の再構築が正常に行われていることが示唆された。

以上、本研究によりS期レシビエント細胞質体としての除核卵子を効率良く作製できる除核法、すなわち成熟卵子を予め活性化させてから除核する方法を開発することができた。このS期除核卵子（細胞質体）とS期核質の組み合わせは、割球を核質のドナーとする核移植には有効であるが、体細胞を核質のドナーとして用いた核移植には適していないことが示唆された。体細胞を用いた核移植では、G0/G1期核質とM期除核卵子の組み合わせにより正常な胚盤胞の得られることが分かった。また、G0/G1期の卵丘細胞を得るためには、血清飢餓あるいはコンフルエント培養処理が有効であることも明らかになった。

学位論文審査の要旨

主査	教授	高橋芳幸
副査	教授	渡辺智正
副査	教授	岩永敏彦
副査	助教授	片桐成二

学位論文題名

Bovine nuclear transfer using embryonic blastomeres and cumulus cells

(割球および卵丘細胞を用いたウシの核移植)

申請者は、割球および体細胞を核質として用いたウシの核移植技術を確立するために、発生能の高い細胞質体と核質の作製・調整法について検討した。

割球を用いた核移植の実験では、細胞質体となる卵子を形態的に分類・選抜して核移植に供用することにより核移植胚の発生率が高くなることを明らかにした。ついで、第一極体の位置を指標にした従来の卵子除核法における低い除核率（約60%）は、卵細胞核が第一極体から離れた位置に存在する卵子に対して除核操作を行うことに起因することを突き止めた。さらに、卵子に活性化処理を加えて減数分裂を再開させてから第二極体の位置を指標にして除核操作を行い、高い除核率（約90%）を得ることに成功した。

卵丘細胞（体細胞）を用いた核移植の実験では、卵丘細胞に血清飢餓、コンフルエント培養あるいはアフィジコリン処理を施して細胞のサイズと細胞周期の関係を調べた。その結果、いずれの培養・処理においても高頻度に採取できる中型の細胞は、血清飢餓およびコンフルエント培養では約95%がG0/G1期、アフィジコリン処理では約70%がS期に同調されていることを明らかにした。ついで、これらの処理を施した卵丘細胞を核質とし、第二減数分裂中期（M期）あるいは活性化処理後（S期）に除核した卵子を細胞質体として用いた核移植を行い、核質と細胞質体の細胞周期の組合せについて検討した。その結果、G0/G1期の核質とM期の細胞質体の組み合わせで作製した核移植胚は発生率が最も高く、その胚盤胞までの発生過程と染色体の数的異常の程度は体外受精胚とほとんど差異のないことを明らかにした。

以上のように、申請者は割球を用いた核移植に適した細胞質体の効率的な作製法を開発するとともに、卵丘細胞を用いた核移植に適した核質と細胞質体の細胞周期の組合せと調整法を明らかにした。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。