

博士（獣医学） ユフロシナ デラペニア アタバイ

学 位 論 文 題 名

Vitrification of Mouse Preantral Follicles Using a Mixture of Ethylene Glycol and Raffinose

（エチレングリコールとラフィノースを添加した
ガラス化溶液によるマウス前胞状卵胞の低温保存）

学位論文内容の要旨

卵胞培養技術が開発されれば、卵巣内に多数存在する前胞状卵胞に由来する卵子を用いて多数の優良家畜や希少動物の産子を作出できる。さらに、前胞状卵胞の低温保存法を開発して卵胞培養技術と組み合わせれば、前胞状卵胞を有効に活用できるようになる。低温保存法の中でもガラス化保存は簡便で、しかも高い生存率が期待される。しかし、現在、卵胞培養が可能な動物はマウスだけである。そこで本研究では、マウスの前胞状卵胞の低温保存法を開発するため、6 M エチレングリコールと 0.3 M ラフィノースを添加したガラス化溶液を用いて検討を行った。

まずはじめに、ガラス化保存において重要な前処理とガラス化溶液への暴露時間についてマウスの体内成熟卵子（排卵卵子）を用いて検討した。卵子は前処理として 2 M エチレングリコールに 0、2 あるいは 5 分間暴露、もしくは 0.15 と 0.3 M ラフィノースにそれぞれ 2、5 あるいは 10 分間ずつ暴露した。前処理を加えた卵子は、ガラス化溶液に 0.5、1、2 あるいは 5 分間暴露した後、液体窒素中で冷却・保存した。融解後、それぞれの処理を施した卵子の生存性を体外受精後の胚盤胞への発生能をもって比較した。その結果、エチレングリコールを用いて前処理を行った場合には、ガラス化溶液への暴露時間を短縮することにより生存率の向上することが明らかになった。また、ラフィノースを用いて 5 分間ずつ前処理を行うと、ガラス化溶液への暴露時間が 0.5～2 分の範囲で安定した高い生存率の得られることも判明した。さらに、前処理およびガラス化溶液へ暴露した卵子の体積変化から、エチレングリコールもしくはラフィノースを用いて適当な時間だけ前処理を加えるとエチレングリコールの浸透や脱水により、卵細胞質内のエチレングリコールと溶質の濃度がガラス化に適した状態になり、生存性が向上することが示唆された。

次に、排卵卵子を用いた実験で得られた成績に基づき、前胞状卵胞の前処理およびガラス化溶液への暴露条件を検討した。前胞状卵胞はマウスの卵巣から機械的あるいは酵素処理により採取し、2 M エチレングリコールに2あるいは5分間暴露、もしくは0.15および0.3 M ラフィノースに2あるいは5分間ずつ暴露した。前処理後、ガラス化溶液に0.5、1あるいは2分間暴露し、液体窒素中で冷却・保存した。融解後の生存性は、前処理時間およびガラス化溶液への暴露時間に拘わらず、機械的に採取した卵胞の方が酵素処理で採取した卵胞より高かった。また、機械的に採取した卵胞を2 M エチレングリコールで5分間前処理した後、ガラス化溶液に0.5あるいは1分間暴露して冷却した場合、最も高い生存率（約80%）が得られた。0.3 M ラフィノースによる前処理では2分間ずつの暴露の後、ガラス化溶液に1分間暴露した場合、最も高い生存率（約70%）が得られた。そこで、機械的に採取した卵胞をエチレングリコールあるいはラフィノースの最適な条件で前処理を加えてガラス化保存し、融解後に10日間培養して卵胞の発育能と卵胞内卵子の体外成熟能も比較検討した。その結果、エチレングリコールで前処理した卵胞はラフィノースで前処理した卵胞に比べて、発育率（約70% vs. 40%）も卵子成熟率（約50% vs. 30%）も高かった。融解後の卵胞の形態からラフィノースによる前処理は顆粒層細胞と卵子に過度の脱水を招き、顆粒層細胞同士および卵子と顆粒層細胞の結合が傷害を受けるため、卵胞生存率も卵子成熟率も低下するものと推察された。

最後に、卵巣から機械的に採取し、最適と判断された処理条件（2 M エチレングリコールに5分間暴露したのちガラス化溶液に1分間暴露）でガラス化保存した前胞状卵胞に由来する卵子の発生能を調べた。融解卵胞を10日間培養した後、得られた卵子に体外成熟と体外受精を施し、無処理の前胞状卵胞（ガラス化保存せずに10日間培養）および体内発育卵胞に由来する卵子の発生能と比較した。その結果、ガラス化保存した前胞状卵胞に由来する卵子の胚盤胞への発生率（約30%）は無処理の前胞状卵胞と同等であった。しかし、体内発育卵胞由来の卵子の発生率（約50%）に比べて低い値であり、卵胞培養法を改善する必要があることが示唆された。また、ガラス化保存した前胞状卵胞に由来する卵子を体外成熟・体外受精させて得られた胚盤胞をレシビエントマウスに移植した結果、産子が得られた。

本研究により、エチレングリコールとラフィノースを添加したガラス化溶液を用いたマウス前胞状卵胞の低温保存法が開発され、ガラス化したマウス前胞状卵胞に由来する産子を世界で初めて得ることに成功した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 橋 芳 幸

副 査 教 授 岩 永 敏 彦

副 査 教 授 渡 邊 智 正 (農学研究科)

副 査 助 教 授 片 桐 成 二

学 位 論 文 題 名

Vitrification of Mouse Preantral Follicles Using a Mixture of Ethylene Glycol and Raffinose

(エチレングリコールとラフィノースを添加した
ガラス化溶液によるマウス前胞状卵胞の低温保存)

前胞状卵胞の培養法と低温保存法が開発されれば、多数の卵胞内卵子を優良家畜や希少動物の産子の作出に有効利用できるようになる。そこで、申請者は体外培養が可能なマウス前胞状卵胞の低温保存法、とくにガラス化保存法を開発するため、毒性の低いエチレングリコール (6 M) とガラス転移温度を上昇させるラフィノース (0.3 M) を添加した溶液を用いて検討を行った。

はじめに、ガラス化溶液の特性を明らかにするため、マウス排卵卵子を用いて前処理とガラス化溶液への暴露時間が生存性に及ぼす影響について検討した。卵子はエチレングリコール (2 M) あるいはラフィノース (0.15 M と 0.3 M) で前処理を加えた後、ガラス化溶液に暴露して液体窒素中で冷却保存した。その結果、前処理により卵子生存率は向上するが、ガラス化溶液への最適暴露時間は前処理法に応じて変化することを明らかにした。

次に、マウス前胞状卵胞について、排卵卵子と同様の前処理とガラス化溶液への暴露時間および前胞状卵胞の採取方法が生存性や発育能に及ぼす影響について検討した。その結果、機械的に採取した卵胞は酵素処理で採取した卵胞よりも生存率の高いことと、エチレングリコールで前処理した卵胞の方がラフィノースで前処理した卵胞よりも生存率、発育率および卵胞内卵子の成熟率が高いことを明らかにした。さらに、機械的に採取してガラス化保存した前胞状卵胞に由来する卵子の受精能と発生能を調べた。その結果、ガラス化保存卵胞由来卵子はガラス化保存しなかった無処理の前胞状卵胞由来卵子

と同等の受精能を有し、正常産子へ発生することを実証した。

以上のように、申請者はマウス前胞状卵胞のガラス化保存法を開発し、ガラス化保存した前胞状卵胞に由来する産子の作出に世界で初めて成功した。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。