

学 位 論 文 題 名

Preparation and cryopreservation of cytoplasts
for the production of bovine somatic cell
nuclear transfer embryos

（牛体細胞核移植における細胞質体の調製と低温保存）

学位論文内容の要旨

牛の体細胞核移植胚は、体外成熟により得られた第二減数分裂中期（MII 期）の卵子を除核し、細胞質体として使用する。しかし、MII 期卵子の除核率は低く、また核移植胚産生は体外成熟に供する卵子の供給によりその産生数および産生時期が制約を受ける。そこで本研究では、牛卵子の効率的な除核・調製法と低温保存による利用性向上について検討した。

第 1 章では、まず卵子に付着した卵丘細胞を除去するためのボルテックス処理が除核成功率に及ぼす影響を検討した。その結果、長時間ボルテックス処理した卵子では、ピペッティングにより卵丘細胞を除去した卵子に比べて卵細胞核が第一極体の近傍に存在する割合と除核成功率が低いことが分かった。また、第一極体直下に卵細胞核の存在する卵子を選んでボルテックス処理すると、60%の卵子で第一極体が移動していた。これらの結果から、牛卵子のボルテックス処理時間を延長すると第一極体の位置が変化して除核成功率の低下することが明らかになった。次いで、除核に伴い除去される細胞質量を卵細胞質の 10 および 20% として除核率と核移植胚の発生率を比較したところ、20%の卵細胞質を除去しても胚盤胞への発生率を低下させることなく、除核率も向上することが分かった。以上の結果より、MII 期の卵子は低張液中で卵細胞質を膨張させて第一極体の移動を制限し、短時間ボルテックス処理することにより卵丘細胞を除去し、第一極体とそれに隣接する 20%の卵細胞質を除去することにより高い除核率の得られることが分かった。

第 2 章では、除核率およびその後の核移植胚の発生率向上が期待できる第二減数分裂終期での除核に必要な MII 期卵子の活性化処理法を検討した。MII 期卵子をカルシウムイオノフォア A23187 とシクロヘキシミド、あるいはエタノールとシクロヘキシミドの組み合わせで活性化処理した後、牛卵丘細胞（核体）と融合して体細胞核移植胚を作出し、融合後の核の形態変化と発生率について無処理の MII 期卵子を用いて

作出した体細胞核移植胚と比較した。無処理の MII 期卵子およびエタノールとシクロヘキシミドで処理した卵子を用いて作出した核移植胚の約 50%は、融合後 3 時間目までに 1 つの前核を形成した。また、エタノールとシクロヘキシミドで処理した卵子を用いて作出した核移植胚は、無処理の MII 期卵子を用いて作出した核移植胚と同等の融合率と胚盤胞への発生率を示した。一方、カルシウムイオノフォア A23187 とシクロヘキシミドで処理した卵子を用いて作出した核移植胚は、融合後 3 時間までに前核形成がみられず、その後の培養により胚盤胞は得られなかった。これらの結果より、第二減数分裂終期に除核するための卵子の活性化には、エタノールとシクロヘキシミドを組み合わせた処理が適切であることが示された。

第 3 章では、まず細胞質体の低温保存法として微小滴ガラス化法による MII 期卵子の低温保存法を検討した。35%エチレングリコール、5%ポリビニルピロリドンおよび 0.4 M トレハロースを含むガラス化溶液の微小滴中でガラス化保存した MII 期卵子は高い生存率（約 90%）を示し、ガラス化保存していない無処理卵子と同等の除核率が得られた。また、ガラス化保存した卵子あるいは無処理の卵子と牛卵丘細胞を用いて作出した核移植胚の胚盤胞への発生率にも差異はなかった。次いで、ガラス化保存した MII 期卵子を細胞質体とし、牛（同種間）あるいは水牛（属間）の皮膚を培養して得られた線維芽細胞を核体として体細胞核移植胚を作出し、発生能を比較した。その結果、同種間および属間体細胞核移植胚の融合率と胚盤胞への発生率に差異はみられなかったが、得られた胚盤胞の細胞数は属間体細胞核移植胚の方が少なかった。以上の結果より、体細胞核移植の細胞質体に用いる MII 期卵子は、微小滴法によりガラス化保存することで、ガラス化保存していない無処理卵子と同等の発生能を保持したまま低温保存できることが分かった。また、ガラス化保存した牛の MII 期卵子を細胞質体として利用することにより、属間での体細胞核移植胚の作出が可能であることが示された。

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 (医学研究科)
副 査 教 授 梅 村 孝 司
副 査 助 教 授 片 桐 成 二

学 位 論 文 題 名

Preparation and cryopreservation of cytoplasts for the production of bovine somatic cell nuclear transfer embryos

(牛体細胞核移植における細胞質体の調製と低温保存)

申請者は、牛の体細胞核移植胚の作出効率を向上させるため、細胞質体として使用する牛体外成熟（第二減数分裂中期、MII 期）卵子の効率的な除核・調製法と低温保存について検討した。

まず、卵子に付着した卵丘細胞を除去するためのボルテックス処理時間が長くなると、除核（卵子染色質の存在部位）の指標となる第一極体の位置が変わり除核成功率を低下させることを明らかにした。また、除核に伴い卵細胞質の 20% を除去すると高い除核率が得られ、核移植後の発生能も低下しないことを示した。次に、高い除核率の期待できる第二減数分裂終期（TII 期）での除核に必要な MII 期卵子の活性化法を検討した。その結果、あらかじめエタノールとシクロヘキシミドを組み合わせ活性化した卵子を用いて作出した核移植胚は、無処理の卵子と融合させた後に活性化した通常の核移植胚と同等の発生能を有し、TII 期での除核の可能性を示唆した。最後に、MII 期卵子のガラス化低温保存法について検討し、エチレングリコール、ポリビニルピロリドンおよびトレハロースを含むガラス化溶液を用いて微小滴ガラス化を行えば、高い卵子生存率（90%）が得られ、除核および核移植後の発生能にも悪影響のないことを示した。また、ガラス化保存した牛卵子と水牛の皮膚由来線維芽細胞を用いて作出した属間体細胞核移植胚は、牛卵子と皮膚由来線維芽細胞を用いて作出した同種内体細胞核移植胚と同等の胚盤胞への発生能を有することを明らかにした。

以上のように申請者は、牛体細胞核移植胚生産に細胞質体として使用する卵子の除核・調製法およびガラス化低温保存法を開発し、牛体細胞

核移植胚の作出効率を向上させた。また、ガラス化保存した牛卵子を利用して牛と水牛の属間体細胞核移植胚の作出が可能であることを示した。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。