

学 位 論 文 題 名

Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*)
primordial germ cells by embryo vitrification

(胚のガラス化によるゼブラフィッシュ始原生殖細胞の低温保存)

学位論文内容の要旨

ゼブラフィッシュは多数の変異体を有する重要な実験動物であり、その配偶子および胚の低温保存が必要とされているが、卵子および胚の低温保存技術は開発されていない。ゼブラフィッシュでは、体節期の胚（ドナー）から回収した始原生殖細胞（PGC）を不妊化処理した胚（レシピエント）に移植することで、移植PGC由来の精子および卵子を生産する成魚を作出する技術（借腹生産技術）が開発されている。したがってPGCの低温保存は配偶子および胚の低温保存の代替となるだけではなく、借腹生産技術の実用化にも必須の技術である。しかし、ゼブラフィッシュの体節期胚から回収されるPGCは少数（10~20個）である。そこで本研究では、PGCの生存率が高く、回収率も高い低温保存技術を開発するため、胚のガラス化によるPGCの低温保存法について検討した。

第1章では、まず、5種類の凍害防止剤について、それぞれのガラス化能と胚への毒性を検討した。その結果から、6 Mの凍害防止剤を含むガラス化液を用いた2段階暴露による胚（体節期）のガラス化実験を行った。その結果、エチレングリコール（EG）を添加したガラス化液では、ほぼ全ての胚から生存PGCが回収され、PGCの生存率は約20%であった。他の凍害防止剤を添加したガラス化液では、PGCの生存率は4%以下であった。また、EGとプロピレングリコール（PG）を添加したガラス化液では、全ての胚から生存PGCが回収され、PGCの生存率は約25%であった。以上のことから、体節期胚のガラス化により、PGCの低温保存が可能であることが示唆された。

第2章では、まず、6種類の各凍害防止剤にスクロース（0.5 M）を添加することにより、溶液のガラス化能が高くなることを確認した。その結果から、5 Mの凍害防止剤とスクロースを含むガラス化液を用いて胚のガラス化実験を行った。その結果、メタノール、PG、1,3-ブチレングリコールおよびグリセリンを用いた場合、生存PGCはほとんど回収されなかった。EGあるいはジメチルスルフォキシド（DMSO）を用いてガラス化した場合、ほとんど

の胚から生存PGCが回収され、PGCの生存率はそれぞれ約40%および約20%であった。また、EGを用いてガラス化した胚から回収された生存PGCの約30%に偽足運動が見られた。以上のことから、ガラス化液へスクロースを添加することにより、ガラス化保存胚のPGCの生存性が改善されることが明らかとなった。

第3章では、まず、卵黄を一部除去した胚（卵黄除去胚）と無処理の胚を5 Mの凍害防止剤（EG、DMSOあるいはPG）と0.5 M スクロースを添加したガラス化液を用い、PGCの生存性を比較した。その結果、卵黄を除去することによりガラス化保存胚のPGCの生存性が改善された。次に、2種類の凍害防止剤とスクロースを添加したガラス化液を用いて卵黄除去胚のガラス化実験を行った。その結果、3 M EG、2 M DMSOおよび0.5 Mスクロースを添加したガラス化液を用いてガラス化した卵黄除去胚で約80%のPGC生存率が得られ、約60%の生存PGCに偽足運動が見られた。そこで、この条件でガラス化保存した卵黄除去胚のPGCを不妊化処理レシピエント胚へ1個ずつ移植した。移植後2日目には、形態的に正常な胚の11.8%（18/152）で生殖隆起にPGCが観察された。そのうち成魚へ発育したものは移植PGCに由来する精子あるいは卵子を有していた（雄6匹、雌1匹）。すなわち、交配によりPGCのドナーの特徴を備えた子孫が得られた。以上のことから、EG、DMSOおよびスクロースを添加したガラス化液を用いて卵黄除去胚をガラス化低温保存することでPGCの生存性が改善されることが明らかになった。また、ガラス化した胚から回収されたPGCは、機能的な配偶子に発生・分化することが示された。

第4章では、前章のEG、DMSOおよびスクロースを添加したガラス化液と類似組成のヒト卵巣組織ガラス化保存液（3.59 M EG、2.82 M DMSOおよび 0.5 M スクロースを含む）を用いてガラス化保存した胚のPGCの発生・分化能を確認した。卵黄除去胚と無処理胚のガラス化実験を行った結果、卵黄除去胚のPGCの生存性が高いことが確認された。卵黄除去胚で約90%のPGC生存率が得られ、約50%の生存PGCに偽足運動が見られた。そこで、この条件でガラス化保存した卵黄除去胚のPGCを不妊化レシピエント胚へ1個ずつ移植した。移植後2日目には、形態的に正常な胚の7.5%（14/187）で生殖隆起にPGCが観察された。そのうち成魚へ発育したものは移植PGCに由来する精子あるいは卵子を有していた（雄5匹、雌1匹）。以上のことから、EG、DMSOおよびスクロースを添加したガラス化液を用いた卵黄除去胚のガラス化がPGCの低温保存に有効であることが確認された。

本研究により開発された卵黄除去体節期胚のガラス化によるPGCの低温保存技術は、ゼブラフィッシュの配偶子および胚の低温保存の代替となるだけでなく、小型硬骨魚類の借腹生産技術にも有用であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	高 橋 芳 幸
副 査	教 授	昆 泰 寛
副 査	准教授	佐々木 宣 哉
副 査	准教授	永 野 昌 志

学 位 論 文 題 名

Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) primordial germ cells by embryo vitrification

(胚のガラス化によるゼブラフィッシュ始原生殖細胞の低温保存)

論文提出者は、ゼブラフィッシュの借腹生産技術の実用化に必要な始原生殖細胞 (PGC) の低温保存、とくに、体節期胚をガラス化することにより PGC を低温 (液体窒素) 保存する簡便な方法について検討した。

まず、各種の凍害防止剤の毒性とガラス化能を調べ、ガラス化が可能と推定される濃度の凍害防止剤を添加した溶液を用いて急速冷却した胚の PGC の生存性を検討した。その結果、エチレングリコール (EG) とスクロースを添加した溶液を用いて急速冷却した場合、胚がガラス化され、PGC の生存率が高い (約 40%) ことを突き止めた。

次に、卵黄の一部を除去した胚 (卵黄除去胚) をガラス化保存すると PGC の生存率が改善されることを見だし、とくに、EG とジメチルスルホキシド (DMSO) とスクロースを添加した溶液を用いて卵黄除去胚をガラス化すると、PGC の生存率は 80%以上になり、生存 PGC の 50%以上が活発な偽足運動を示すことを明らかにした。さらに、EG と DMSO とスクロースを添加した溶液を用いてガラス化した卵黄除去胚から回収された PGC を異系統のレシピエント胚へ移植した。その結果、移植 PGC の約 10%がレシピエント胚の生殖隆起に移動することと、生殖隆起に生存 PGC を有するレシピエント胚を成魚に発育させると、その 85%が妊性を有し、移植 PGC 由来の精子あるいは卵子を生産していることを実証した。

以上のように、論文提出者は独創的な PGC の低温保存法を開発し、世界で初めてゼブラフィッシュ PGC の低温保存に成功した。本研究で開発された PGC の低温保存法は改善の必要があるものの、ゼブラフィッシュを含む小型硬骨魚類の借腹生産技術での利活用が期待される。よって、審査委員一同は、上記博士論文

提出者檜垣彰吾氏の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第 6 条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。