



Title	Developmental Competence of In Vitro Matured Porcine Oocytes after Electrical Activation
Author(s)	栗原, 隆
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43768
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	栗 原 たかし 隆
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 6 9 0 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 14 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学 位 論 文 名	Developmental Competence of <i>In Vitro</i> Matured Porcine Oocytes after Electrical Activation (電氣的活性化後のブタ体外成熟卵の発生能力)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 白 倉 良 太 (副査) 教 授 岡 部 勝 教 授 宮 崎 純 一

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

異種移植研究において、ブタは臓器の大きさ、繁殖力、倫理面などから、ドナーとして最適であると考えられている。ブタ臓器の移植では、超急性拒絶反応が最大の問題となっている。我々はその制御を目的とし、発生工学技術のひとつである前核注入法により、雌ブタより集めた受精卵の前核へヒト補体制御因子の Decay-Accelerating Factor 遺伝子 (DAF) を注入し、DAF を臓器に発現したトランスジェニックブタを作出した。しかし、体内成熟卵を利用する方法は、手技が煩雑で多大な経費と労力を必要とするため、屠場由来の体外成熟卵の利用が望まれるが、ブタの場合未だ方法が確立していない。

現在まで、ブタ卵の体外成熟培養 (IVM) には主に次の2種類の系が用いられている。即ち、直径4-6 mm程度の卵胞から採取した卵丘卵子複合体 (GCOCs) を Tissue Culture Medium (TCM) 199培地を基本とする培養液で成熟させる TCM199-based IVM system (以下 T-system)、または直径3-6 mm程度の卵胞から採取した卵丘卵子複合体 (COCs) を North Carolina State University (NCSU) 23培地を基本とする培養液で成熟させる NCSU23-based IVM system (以下 N-system) である。これらを用いた体外成熟卵の発生能力は *in vitro* で検討されることが多く、*in vivo* での発生能力に関する研究は少ない。体外成熟卵の発生能力を判定する指標としては未受精卵の活性化による単為発生能力と、受精後の発生能力がある。近年、体細胞核移植がトランスジェニックブタ作出の効率的な方法として有望視されており、卵の単為発生能力はその効率を予想するよい指標となる。また、手技に熟練を要する T-system により得られた体外成熟卵は胎仔までの単為発生能力を有することが確認されているが、N-system は手技が簡便であるにもかかわらず、これにより得られた体外成熟卵の胎仔までの単為発生能力は調べられていない。本研究では体外成熟卵を発生工学的研究に応用するため、単為発生能力を指標として N-system の有用性を検討した。

【方法】

IVM 前に T-system、N-system で用いた卵丘卵子複合体中の卵核を染色してその核相の分布を調べた。核相は減数分裂過程の進行順に7段階に分類した。次に、2種類の系から得られた体外成熟卵を電氣的活性化後、7日間体外培養することにより胚盤胞までの発生能力を検討した。さらに N-system 由来の単為発生卵を1または2日間体外培養した後に雌ブタの卵管に移植し、活性化から19または20日後に剖検することにより胎仔への発生能力を確認した。

【成績】

IVM 前の核相を観察したところ、T-system で用いた GCOCs の68.6%が十分に成長した網状期の卵に見られる核相を持っていたのに対し、N-system で用いた COCs ではその他の様々な核相を持つ卵が66.2%を占めた。T-system、N-system から得られた体外成熟卵の成熟率 (93.2%, 82/88 vs 91.3%, 63/69)、電気的活性化後の正常分割率 (70.7%, 58/82 vs 65.1%, 41/63)、胚盤胞形成率 (37.8%, 31/82 vs 34.9%, 22/63) は両システムで同等であった。しかし、胚盤胞内の細胞数は N-system 由来のものの方が有意に多く (22.6 ± 2.0 vs 35.6 ± 4.5 , $p < 0.01$)、IVM 後の体外成熟卵の細胞質成熟は N-system から得られた卵のほうが優れていることが示唆された。N-system 由来の単為発生卵を雌ブタの卵管に移植したところ、9頭のレシピエント中4頭に胎仔が認められた。これら4頭のレシピエントには約40個/頭の単為発生卵を移植しており移植卵の胎仔への発生率は、26.9% (45/167) であった。回収された胎仔の頭殿長は4.7mm 程であり、正常胎仔のそれと同程度であった。またこの胎仔には、形態的に正常胎仔と同様の心臓、肝臓および肢芽の形成が認められた。

【総括】

本研究では、発生工学的研究に応用するため、単為発生能力を指標として体外成熟培養法を検討した。

- 1) 卵胞から採取した卵丘卵子複合体の核相には採取法によってばらつきが認められた。
- 2) N-system による体外成熟卵の成熟率、電気的活性化後の正常分割率、胚盤胞形成率は T-system の体外成熟卵と比較し同等であった。
- 3) N-system による体外成熟卵は胎仔までの単為発生能力を持つことが示された。
- 4) 以上より、手技的に簡便な N-system による体外成熟卵が体細胞核移植時のレシピエント卵としても利用可能と考えられ、ブタ発生工学的研究に広く応用可能であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

移植医療における深刻なドナー不足を解消する方法として人工臓器などとともにヒト以外の動物の臓器を用いる異種移植が期待されている。繁殖力が旺盛で、飼育が容易であることや、解剖学的、生理学的に類似性、共通性が多いこと、倫理的にも感情面で受け入れられ易いことなどから、ドナーとしてブタが最適であると考えられている。ブターヒト間の移植に見られる超急性拒絶反応に対する戦略としてブタの遺伝子を改変し、拒絶反応を回避することが考えられている。

しかし、この遺伝子改変ブタの作出には、体内成熟卵を利用しているため、手技が煩雑で多大な経費と労力を必要とし、しかも十分な量の卵を準備できないという問題点がある。そこで、体外成熟卵の利用が望まれるが、ブタの場合未だ体外成熟培養の方法が確立していない。

卵胞の大きさ、卵丘卵子複合体の調整法、培養液と培養条件などの選択が重要になるが、われわれが確立をめざす、手技の煩雑性が少なく多数の卵胞を採取でき、安定して成熟率の高い培養法の組み合わせを検討した。屠場由来ブタ卵巣を用い、成熟過程、電気的活性化後の単為発生能力を詳細に検討した結果、直径3.0-6.0mm の卵胞から吸引法によって採取した COCs を North Carolina State University (NCSU) 23培地を基本とする培養液で40から42時間成熟させるシステムによって、単為発生卵が高率に胚盤胞へ発生すること、生体内(卵管内移植法)で胎仔へと発生することを明らかにした。

体外成熟卵がブタ発生工学的研究に広く応用可能であることが示唆され、大量の移植用代替臓器が準備できる可能性を示唆した。よってこの研究は学位の授与に値すると考える。