

氏 名	あか き さと し 赤 木 悟 史
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2510 号
学位授与の日付	平 成 16 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	Developmental Potential of Bovine Nuclear Transfer Embryos Using Somatic Cells and Postnatal Growth of Cloned Calves (牛体細胞を用いた核移植胚の発生能とクローン牛の生後の発育に関する研究)

論文調査委員 (主 査) 教 授 宮 本 元 教 授 今 井 裕 教 授 佐々木義之

論 文 内 容 の 要 旨

体細胞核移植技術は、優良家畜や形質転換動物の作出及び遺伝資源の保存に有用な技術として期待されている。しかしながら、現在のクローン産子生産効率は著しく低く、この効率を改善するためには核移植技術の様々な過程を最適化することが重要である。本論文は、核移植胚の発生能に影響を及ぼす諸要因を明らかにする目的で、核移植のドナー細胞の種類や培養条件、レシピエント卵子の由来や品種及び活性化のタイミングが、胚発生能に及ぼす影響について検討を行ったものである。さらに、クローン牛の正常性の検討のために発育調査及び血液の生化学的検査を行っている。

本論文は7章より構成されており、主な内容は以下に示すとおりである。

第1章では、クローン動物の作出技術についての歴史的背景を紹介し、本論文の目的について述べた。

第2章では、成体及び胎子由来の様々なドナー細胞を用いて作出された核移植胚の発生能について検討を行った。核移植のドナーとして、成体細胞では雌雄皮膚由来線維芽細胞、乳腺上皮細胞及び卵丘細胞、胎子細胞では雌雄皮膚由来線維芽細胞及び雌肺由来線維芽細胞を用いた。その結果、細胞種により除核卵子との融合条件や体外発生能に違いが認められるが、全ての細胞が移植可能胚である胚盤胞期胚への発生能を有していることを示した。また、乳腺上皮細胞では核移植前の細胞密度が融合効率に影響を及ぼすことを明らかにした。

第3章では、個々の牛から卵子の採取が可能である経膈採卵と核移植技術を組み合わせることにより、レシピエント卵子の品種や個体の違いが核移植胚の発生能に及ぼす影響について検討を行った。その結果、レシピエント卵子の由来（経膈採卵及び食肉処理場の卵巣）あるいは品種（黒毛和種及びホルスタイン種）により、黒毛和種卵丘細胞由来の核移植胚の発生能に有意な差が認められないことが明らかになった。また、ドナー（卵丘）細胞提供牛と同一個体、同一品種あるいは異なる品種のレシピエント卵子を用いて、ドナー細胞と全ての組み合わせからクローン牛の作出に成功した。しかし、卵子の違いにかかわらず、生後の死亡例が全てで認められ、ドナーと同一品種あるいは同一個体の卵子を用いるだけで、クローン牛の生産効率を改善することは難しいことが示唆された。

第4章では、ドナー細胞の培養条件の違いが胚発生能に及ぼす影響について検討した。ドナー細胞として採取直後、成熟培養後、血清添加培養後及び血清飢餓培養後の卵丘細胞を用いた。その結果、採取直後及び成熟培養後の卵丘細胞より、培養卵丘細胞をドナーとして用いることで体外発生能が改善されることを明らかにした。また、全ての条件の卵丘細胞からクローン牛を作出することに成功した。

第5章では、細胞融合と活性化のタイミングが胚発生能に及ぼす影響について検討した。その結果、細胞融合と活性化のタイミングは体外発生能に影響を及ぼし、活性化処理を細胞融合3時間後に行うと胚盤胞への発生率が改善されることが明らかになった。

第6章では、卵丘細胞由来クローン牛の発育調査と血液の生化学的検査を行った。その結果、3ヶ月以上生存するクローン牛では、血液の生化学的性状は正常範囲内で推移していることが確認できた。

第7章は本研究の総合的な考察と結論である。本研究により核移植胚の発生能に影響を及ぼすいくつかの要因を明らかにすることができた。

論文審査の結果の要旨

体細胞の核移植によってクローン動物を作出することが可能となったが、その成功率は極めて低い。牛核移植胚の作出のためには、ドナー細胞の処理、レシピエント卵子の除核、細胞融合及び活性化等、様々な過程が存在する。しかし、それぞれの過程の最適条件や個体作出効率に及ぼす影響については、十分には検討されていない。本研究は核移植胚の発生能に影響を及ぼす諸要因を明らかにすることを目的としている。評価すべき主な点は以下のとおりである。

1. 様々な細胞種を用いて核移植を行い、除核卵子との融合効率及び胚発生能に及ぼすドナー細胞種の影響について検討した。乳腺上皮細胞では核移植前の細胞密度が融合効率に影響を及ぼすこと、皮膚由来線維芽細胞では成体胎子、性別及び採取部位の違いにより体外発生能に有意な差が認められないこと、卵丘細胞では採取個体により体外発生能に有意な差は認められず、高率に胚盤胞期胚に発生することを明らかにした。

2. 経膈採卵と核移植技術を組み合わせることにより、ドナー細胞と同一個体、同一品種あるいは異なる品種のレシピエント卵子の全てから、クローン牛が作出できることを示した。つまり、ドナー核と細胞質の関係を調べるために有用である、特定個体の卵子からクローン牛が生産できる方法を確立した。

3. 4種類の異なる条件の卵丘細胞を用いて核移植を行い、卵丘細胞を培養することによって核移植胚の体外発生能が改善されることを明らかにした。また、採取直後の卵丘細胞を用いてクローン牛の作出に成功し、ドナー細胞への血清飢餓培養処理あるいは培養自体が、クローン個体作出に必要な不可欠な処理ではないことが判明した。

4. 細胞融合と活性化は、核移植胚の作出に必要な不可欠な過程であるが、それらを行うタイミングが、体外発生能に影響を及ぼし、成熟培養21時間目に細胞融合を行い、その3時間後に活性化を行うことで核移植胚が効率的に胚盤胞期まで発生することを明らかにした。

5. 血清飢餓培養後の卵丘細胞に由来するクローン牛における生後の血液の生化学的性状の動態を明らかにした。

以上のように本論文は、牛体細胞核移植胚の発生能に影響を及ぼすいくつかの要因を明らかにし、クローン牛の正常性の検討のために有用な血液生化学的データを示したもので、生殖工学及び家畜繁殖学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値のあるものと認める。

なお、平成15年11月20日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。