

氏 名	か 香 が 川 の り こ 子
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1482 号
学位授与の日付	平 成 17 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 応 用 生 物 科 学 専 攻
学位論文題目	Efficient Production of Matured Oocytes and Live Pups from Growing Oocytes of Adult Female (成体由来卵母細胞からの成熟卵子と新生児の効率的生産)
論文調査委員	(主 査) 教 授 久 米 新 一 教 授 今 井 裕 教 授 廣 岡 博 之

論 文 内 容 の 要 旨

畜産業においては、乳・肉生産など、生産性の高い家畜集団の開発が重要である。家畜集団の改良のため、優秀な遺伝的資質をもつ個体の配偶子（精子や卵子）を利用することが考えられてきたが、雄では人工授精技術により優良個体の精子が高度に利用され、家畜の改良に貢献してきた。一方、哺乳類の雌卵巢には卵子のもとになる数千～数万の卵母細胞が存在しており、これらが卵子として人工繁殖に利用できれば、産業動物では優秀な遺伝形質を有する個体の増産や種の改良、絶滅の危機に瀕している野生動物の保全が可能となる。しかしながら、過去数十年に渡る当分野の研究報告では、卵母細胞から得られた個体は胎児卵巢あるいは新生児卵巢由来の卵母細胞からのみであり、利用価値の高い成体卵巢由来の發育途上卵母細胞の發育を維持し、成熟能力を獲得させる体外培養技術は未だに確立されていない。

そこで、本研究は成体卵巢内に存在する多数の發育途上卵母細胞を有効利用して、成体由来卵母細胞から成熟卵子の効率的生産技術と新生児作出技術の開発を目的とした。複合免疫不全（SCID）マウスは T および B リンパ球が未成熟で機能しないため、異種移植のホスト動物として有用である。本研究はこの SCID マウスの腎を「卵胞の体内發育培養器」として利用し、成体由来の發育途上卵母細胞を含む卵巢組織片を腎漿膜下へ移植した。さらに、この移植法と体外培養系を組み合わせる手法を用いて以下の3つの実験を検討した。

第2章では、發育途上卵母細胞を含む性成熟後の成体ブタ卵巢組織片を SCID マウスの腎漿膜下に移植し、短期（＜14日）あるいは長期（＜180日）間飼育後、移植片を摘出・回収した。定法によりパラフィン切片を作成後、HE 染色と免疫染色を施し、組織学的評価、分裂細胞の検出、移植片の卵胞發育と血管の分布を調査した。その結果、短期区では卵巢組織移植後の速やかな血管新生が移植片の生着および卵胞の發育を支持している所見を得た。また、移植片内卵母細胞の發育環境の最適化により、卵核胞（GV）期卵を効率的に回収した。

第3章では、卵巢組織片移植後、移植片から GV 期卵の回収と 0、24 および 44 時間の体外成熟培養を実施し、共焦点レーザー顕微鏡下でアクチンフィラメントの局在を観察した。短期区回収卵は機能的なアクチンフィラメントを豊富に持ち、良好な細胞骨格像を呈した。さらに、培養条件の最適化により体外成熟培養後、受精可能な成熟卵を効率良く作出した。

第4章では、細切した成体マウス卵巢組織片をガラス化法により凍結保存後、解凍して SCID マウスの腎漿膜下に移植した。10日後に GV 期卵を回収後、体外成熟培養、顕微授精、体外発生培養および胚移植を実施し、新生児の作出を検討した。その結果、ガラス化-解凍後の卵母細胞の生存率が非常に高くなり、凍結保存した發育途上卵母細胞から正常な新生児を作出できた。

本研究により、有用な哺乳動物の發育途上卵母細胞を材料とした新生児の作出が可能になり、哺乳動物の新しい繁殖方法として有効利用できることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

哺乳類の卵巢には数千～数万の卵母細胞が存在しており、これらが卵子として人工繁殖に利用できれば、優秀な遺伝形質を有する家畜の増産に利用できる。しかし、これまでに成体家畜の未熟な発育途上の卵母細胞から個体を作出した報告はなく、この技術が開発できれば屠場由来の卵胞などから有用な遺伝形質をもった卵母細胞を多量に得ることが可能になる。本論文は成体卵巢内に存在する多数の発育途上卵母細胞を有効利用して、成体由来卵母細胞から成熟卵子の効率的な生産と新生児の作出を検証したものであり、評価すべき主な点は以下の通りである。

1. 異種移植した胎児由来卵巢の卵胞の発育では、移植1日後から移植片と腎表層にそれぞれ細胞増殖が認められた。移植した卵巢組織の生着と卵胞の発育は血管の新生とともに進行し、移植6日後には組織片周縁部からマウス由来の血管網が認められ、14日後には卵胞基底膜周囲に豊富な血管網をつくり、胞状（3次）卵胞へ発育する所見を得た。また、長期区の血球浸潤やシスト様卵胞形成の頻発により、正常な3次卵胞をより多く得るには短期区が適していることを明らかにした。
2. 移植片から未成熟卵母細胞を回収後、核相と胚発生に重要な役割をもつアクチンフィラメントの分布を調査し、短期区より回収した卵核胞GV期卵から体外成熟培養によって成熟卵を得た。成熟卵の細胞内のアクチンフィラメントは細胞膜直下に豊富に分布し、染色体は正常な第2減数分裂中期の像を呈したことから、発育途上卵母細胞から受精可能な成熟卵の作出法を開発できた。
3. 卵巢組織の発育途上卵母細胞をガラス化法により凍結保存する技術の開発を検討し、凍結保存された卵巢組織片由来の卵母細胞から新生児の作出に成功した。

以上のように、本論文は哺乳動物の発育途上卵母細胞を材料とした新生児の作出法を開発し、哺乳動物の新しい繁殖方法として有効利用できることを明らかにしたものであり、畜産学、動物生体機構学、生殖生理学の分野に寄与するところが大い。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成17年2月17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。