

## 論文の内容の要旨

論文題目 ウシ体外受精胚の正常性に関する生理学的研究

氏名 今井 敬

ウシの胚移植は優れた種雄牛や育種雌牛の増産を通してウシの育種改良および乳肉の生産性改善に欠くことのできない技術である。体外受精は移植胚の培養技術として胚の安定的な供給システム構築の主体である。しかし、体外受精胚は胚盤胞への発生率、発生した胚盤胞の耐凍性および移植後の受胎率が自然に産み出される体内胚に比べて低いこと、さらに、移植した受胎牛では流産、過大子およびそれに伴う分娩事故が頻発する。本研究では第一章において、体外受精に用いる卵子および卵胞の評価法を検討し、第二章では、卵子の培養保存法、第三章では、体外受精胚の培養系の改善と胚の正常性の評価法について探索し、第四章では、耐凍性の改善について、第五章では、体外受精胚の作成効率、正常性および耐凍性に影響する要因について考察し、体外受精胚の簡便な移植方法について検討した。

### 第一章

体外受精に高品質の卵子を用いることは、受精率の向上や異常受精の減少をもたらし、胚の作成効率の改善および早期胚死滅の防除に寄与する。しかし、これまで卵子の正常性の指標としては卵丘細胞の付着、卵子細胞質の色調および卵子の大きさなどの形態学的観察が主であり、生理学的検索は卵胞液のステロイドホルモンの測定が行われているだけである。しかも、今日、体外受精に用いる卵子を採取する卵胞は直径 2-6mm であり、そのス

テロイドホルモンのプロファイルは技術的な問題から明確でない。体外受精に用いる卵子の正常性を評価する指標の検索を目的とし、卵胞および卵子の正常性とマトリックス分解酵素 (MMP) の発現について検討した。退行変性している卵胞の卵胞液には proMMP-2 が高濃度含まれており、また、活性型 MMP-2 と proMMP-9 が特異的に発現すること、さらに、卵胞液中の活性型ゼラチナーゼを Film in situ Zymography (FIZ) で調べた結果、卵胞の活性型ゼラチナーゼの発現と卵子の成熟培養後の成熟率が関連していることが判明した。これらのことは、proMMP-2、活性型 MMP-2 および proMMP-9 が卵胞の正常性を示す指標になることを意味しており、卵胞液およびその構成細胞の MMP 活性を調べることから卵子の培養後の発育能を推定できることを示している。すなわち、卵胞液中のこれらのゼラチナーゼ活性により、体外受精に適した卵子の選別が可能であること、また、この判定基準は卵子の異常な状態の指標でもあり、卵胞嚢腫の診断や退行する卵胞の性状検索への応用が可能であることが示された。

## 第二章

卵子を保存しておき任意の時期に培養、発育させることができれば、移植胚の効率的培養や胚の生理的機能解析に有効な手段となる。また、卵子の発生能は成熟培養を開始する前の品質が影響する。それ故、成熟培養前に卵子の品質を向上させることができれば体外培養で発育させる胚の質的および量的改善を計ることが可能となる。これまで、タンパク質合成阻害剤やリン酸化阻害剤を用いて卵核胞崩壊 (GVBD) を阻止し、その質を向上させる試みは成熟培養および体外受精後の発生率が低いことから 24 時間の培養保存は困難であった。本研究では GVBD 阻止をサイクリン依存型キナーゼの特異的阻害物質であるブチロラクトン-I を用い誘導し、卵子を培養保存する方法について検討した。48 時間までの保存では卵子の GVBD 抑制率と成熟培養後の成熟率に差はなく、ブチロラクトン-I による GVBD 抑制は卵子の成熟を阻害しなかった。しかし、48 時間以上保存した卵子では異常受精の割合が増加し、胚盤胞への発生率は低くかった。一方、24 時間の保存では培養保存しない卵子と受精率および発生率に差はなく、この手法による 24 時間までの培養保存は胚盤胞への発生率を低下させることなく維持することが可能であった。この培養保存法により卵子の品質の改善および 2mm 以下の卵胞から採取した卵子の発育を可能となった。

## 第三章

これまで、初期胚の発生率を向上させるための種々の培養方法が検討されて来たが、体外で受精胚を十分に発達させる培養手法や受精胚の正常性を判定する指標はなかった。本

研究では mCR1aa を基礎培地とする培養系における体外受精胚の培養条件と胚の耐凍性を検討するとともに、胚盤胞から着床期までの体外受精胚における遺伝子の発現変異について体細胞クローン胚をモデルとして検討することから、胚の正常性評価の指標を検索した。体外受精胚を mCR1aa で培養すると発生率は高く、発育速度も速かったが、発生した胚盤胞の耐凍性は乏しかった。胚の発育性と耐凍性は異なる要因により制御されることが推測され、解析の結果、グルコースが胚発生促進を阻む主要因であることが明らかとなった。

また、初期発生胚の遺伝子発現の変動機構を検索するため、メチル化維持酵素 (Dnmt1) を用いて体内胚、体外受精胚および体細胞クローン胚での変化を検索した。その結果、体内胚と体外受精胚では 14 日齢以降全ての胚に Dnmt1 が発現していたが体細胞クローン胚では発現していない胚が認められた。さらに、自家作製したウシ子宮、胎盤 cDNA マイクロアレイにより胚の発現遺伝子群を網羅的に検索した結果、体細胞クローン胚は栄養膜細胞が特異的に発現する遺伝子群の発現が減少し、その要因が栄養膜細胞の分化、発育に変化をもたらし、体細胞クローン胚の着床前および直後における高頻度の死滅に関わることが示唆された。また、Dnmt1 のノックアウトマウスでは胎子が致死することを考え合わせると胚発達段階での Dnmt1 の適正な発現は重要であり、Dnmt1 発現を着床期胚の正常性評価に適應できることが明らかとなった。

#### 第四章

胚の培養法の差により凍結融解後の発生率が大きく左右される。そのため、耐凍性を向上させる機構を不飽和脂肪酸を中心に検討した。胚の耐凍性の向上には培養液に不飽和基を二つもつリノール酸の添加が有効であり、リノール酸の中でもアルブミンに吸着させたリノール酸アルブミン (LAA) の添加が最も有効であった。また、LAA 添加培地での培養時間が長いほど胚の耐凍性が向上し、LAA の添加濃度は 0.25-0.5mg/ml の範囲が至適であった。LAA の作用は胚において細胞膜脂質の損傷や不適切な培養条件により発生したフリーラジカルに起因する胚の細胞膜脂質の過酸化を阻み、胚の耐凍性を改善することが明らかとなった。

#### 第五章

移植胚を効率よく生体に生着させるためには、簡易な手法の確立が必要である。ダイレクトトランスファー法は耐凍剤の希釈除去における人為的な操作ミスをも最小限に軽減でき、耐凍剤除去のための器具や施設も必要とせず、簡便でフィールドへの普及性の高い方法である。しかし、ダイレクトトランスファー法は凍結融解後の胚の正常度を評価することな

く移植を実施するため、耐凍性が低い胚では受胎率が低い。これら耐凍性の低い胚に適した凍結法を検討し、本研究では、凍結保存液への LAA の添加による改善法を検討した。凍結保存液への LAA 添加により体外受精胚の凍結保存後の生存率が高くなった。LAA は前章での研究でも明らかなように細胞膜脂質を変化させる。それ故、細胞膜の流動性が向上し、耐凍剤の流出入の効率が改善されたためと考えられた。また、培養液および凍結保存液への LAA の添加の相互作用は観察されず、いずれか片方への添加が効果的であることが明らかとなった。この培養、凍結法は切断二分離胚、性判別胚および核移植胚といった耐凍性の低い胚に効果的と考えられる。このダイレクトトランスファー法を用いて凍結保存した体外受精胚を作業現場で融解して移植することにより、高い受胎率を得たことから本法が体外受精胚のフィールドでの適用を高めることが期待される。

本研究では、ウシ体外受精胚の発生率、耐凍性および受胎効率の改善を計る技術を開発するため、卵胞内卵子および胚の品質維持機構を検索するとともに、効果的な培養系、保存に関わる種々の要因を解析した。卵胞内卵子の質の維持に MMP-2 および MMP-9 の活性化機構が関連していること、受精初期胚は *Dnmt1* による遺伝子機能の保持が重要であること、また、サイクリン依存型キナーゼの阻害物質が卵子の長時間の保存に有効であることを明らかにした。これらの要因の検出系から卵子および初期発生胚の品質評価が可能であることを見出した。以上、本研究により明らかになった諸要因を基にしたダイレクトトランスファー法を応用することで胚の受胎率を大幅に改善することが期待される。