

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名           今井    敬          

体外受精は胚移植とともに、ウシ胚の安定的な供給のための重要な技術で、その更なる改良は畜産の発達に必要である。本論文は 4 章からなり、主に体外受精胚の作成効率向上を目的に、体外受精のための卵子および卵胞の評価法、卵子の培養保存法、体外受精胚の培養系と胚の正常性の評価法、胚の耐凍性および凍結移植方法、さらに、近年確立された体細胞核移植による初期胚の診断について研究したものである。

従来、卵子の評価は、卵丘細胞の付着の様子、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と、卵胞液のステロイドホルモンの測定による生理学的解析が行われてきた。本論文では、新たに細胞外マトリックス分解酵素（マトリクス・メタロプロテアーゼ、MMP）の発現が卵の正常性の基準として利用できるか否かを検討した。退行変性している卵胞の卵胞液には MMP-2 前駆体が高濃度含まれていること、活性型 MMP-2 と MMP-9 前駆体が発現することが明らかにされ、これらの MMP 発現が卵胞の正常性を評価する新たな指標として有用であることが示された。

卵子の新たな保存法として、卵核胞崩壊（GVBD）阻止をサイクリン依存型キナーゼの特異的阻害物質を用い誘導する方法が、検討されている。同方法で、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、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いことを明らかにしている。したがってこの方法では、24 時間を限度とした保存として実践的な価値があり、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となった。次に、体外受精胚の培養条件と胚の耐凍性を検討した結果、胚の発育性と耐凍性向上は必ずしも一致せず、培地のグルコース濃度が、胚発生を阻む主要因であることが明らかとなった。

哺乳類の発生に DNA メチル化が重要であることは、各種 DNA メチル転移酵素のノックアウト動物では発生異常や、発育停止が見られることから、間違いない。すなわち、DNA メチル転移酵素は発生段階に応じて適切に発現して機能が制御されることが正常な胚・胎

子の発育に不可欠であると考えられる。通常の胚と異なり、体細胞核移植による、いわゆるクローン胚は、その多くが発生異常を呈し、分娩まで発育する個体は極めて少ないことが知られている。そこで、受精による正常胚と体細胞核移植クローン胚における維持型 DNA メチル転移酵素 (Dnmt1) の mRNA 発現を比較した。正常受精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、体細胞核移植クローン胚では発現していない胚が存在することが明らかになった。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、体細胞クローン胚で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。Dnmt1 発現も、着床期胚の正常性評価に適応できることが明らかとなった。今後、従来の体外受精技術に加えて、用途により体細胞核移植クローン胚の取り扱いも重要となる。Dnmt1 の発現は、クローン胚診断の有効な指標となることが示された。

最後に、胚の凍結融解に伴う異常胚の発生防止に関する研究がなされた。胚の凍結融解後の発生率は、凍結以前の胚培養法により異なる。培養法の検討が行われ、凍結前の培養時に、アルブミンに吸着させたリノール酸 (0.25 - 0.5 mg/ml) 添加培地での培養時間が長いほど、胚の耐凍性が向上することが明らかになった。この胚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。さて、胚移植に際して、従来は凍結胚をいったん融解し、さらに耐凍剤の胚や着床への影響を少なくする目的で希釈するなどの段階を得る方法が一般的であった。これらの段階は、胚の正常性を確保することが目的であったが、上記のアルブミンに吸着させたリノール酸を添加培地で培養した胚は、融解せず直接移植しても受胎率が高く保たれることが示された。この方法は簡便で野外を含む作業現場に適している。ここで確立された方法を用いて凍結保存した体外受精胚を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と推測される。

以上、本論文は、実験動物を用いた研究と異なり生殖機構の原理を追求するものではないが、本研究で明らかにされた諸要因を組み合わせた方法論は極めて実践的で、体外受精胚の受胎率向上と近未来のクローン胚の診断に関する指針が示されており、学術上、応用上寄与するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。