

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 中川 奨麻

ブタなどの家畜の雄性配偶子（精子）の超低温保存システムは50年以上も前に確立され、世界中に広く普及して凍結精子を用いた人工授精によって多くの産子が得られてきている。しかし雌性配偶子（卵母細胞）は低温処理によって容易に死滅してしまうため、未だに超低温保存法が確立していない。中でも、重要な家畜であるブタの卵母細胞は他の家畜と比べて低温感受性が極めて高いため、卵母細胞の超低温保存法開発は困難を極め、未だに成功していない。

申請者は、はじめに食肉処理場で得た成熟ブタの卵巣内の発育途上卵胞に含まれる未成熟卵母細胞の体外成熟培養系を確立した。すなわち、卵巣から丁寧に切り出した直径200～300 μm の二次卵胞をmembrane insert上に静置して卵胞刺激ホルモン（100 ng/ml）などを添加した培地中で14日間培養するmembrane insert 3次元培養法を確立した。この手法によって、卵胞を直径600 μm 以上の三次卵胞にまで発育させ、この卵胞に含まれる卵母細胞の減数分裂を受精可能な段階（卵核胞が崩壊した成熟卵母細胞）にまで進行させることができるようになった。つぎに、このようにして成熟させた卵母細胞を超急速超凍結保存（ガラス化保存）する手法の開発を進めた。すなわち、卵母細胞を凍結保存すると細胞骨格が崩壊して死滅するので、これを抑制するcytochalasin Bやtaxolをあらかじめ卵母細胞に取り込ませておいてからガラス化保存することを試みたが、明確な生存性向上効果は認められなかった。しかし、この研究過程でガラス化溶液の改良を進め、30% ethylene glycol と0.5 M sucroseを含むEG30溶液を用いることで卵母細胞の細胞質崩壊は防げないが卵核胞の凍結保存が可能になった。そこで、卵核胞をガラス化保存することで雌性遺伝子を保存し、これを新鮮な脱卵核胞した卵母細胞に移植して再生する新規な手法（卵核胞凍結保存・移植法）を開発した。すなわち、成熟ブタの卵巣から前胞状卵胞、初期胞状

卵胞あるいは排卵直前胞状卵胞を切り出し、各々から卵母細胞を取り出してマイクロマニピレーター装着倒立顕微鏡下に核移植技術を応用して卵核胞を抜き取った。これを卵母細胞を抜き取って空にした袋状の透明帯の中に挿入し、ガラス化保存に供した（卵核胞凍結保存）。あらかじめ新鮮な初期胞状卵胞あるいは排卵直前胞状卵胞から取り出した卵母細胞の卵核胞を抜き取っておき、この卵母細胞の細胞膜と透明帯との間隙に凍結融解後の卵核胞を挿入し、電気融合法によって融合させて再構築卵母細胞を作出した（卵核胞移植）。この再構築卵母細胞を体外で成熟培養した後、胚発生能を評価した。その結果、初期胞状卵胞あるいは排卵直前胞状卵胞の卵母細胞から抜き取った卵核胞をガラス化保存・融解後に排卵直前胞状卵胞の卵母細胞の卵核胞と入れ替えた再構築卵母細胞を胚移植可能な胚盤胞にまで発生ステージを進めることに世界で初めてを成功した。卵核胞の凍結保存には、このような複雑なプロセスが必要であるが、これまで不可能であったブタの雌性遺伝子資源を超低温保存できる一連のシステムを開発できた。また卵核胞の凍結保存に成功したことから、卵母細胞を凍結保存した際の凍結障害は細胞質に発生することも分かった。

以上のように画期的な新規技術の開発を含む申請者の研究によって、これまで不可能であったブタの雌性遺伝子資源を凍結保存して有効利用できるシステムが構築できた。申請者の研究業績をとりまとめた論文の内容および関連事項について試験を行った結果、審査委員一同が博士（農学）の学位を受けるに必要な学識を有する者と認め、合格と判定した。