

称号及び氏名	博士（獣医学）	坂上 信忠
学位授与の日付	平成31年2月20日	
論文名	移植可能胚の生産効率向上を目指した ウシ卵子・胚培養法の改良に関する研究	
論文審査委員	主査	玉田 尋通
	副査	渡来 仁
	副査	川手 憲俊
	副査	鳩谷 晋吾

論文要旨

緒言

雌ウシの優良形質保存に向けた胚生産は、過排卵処理を施した供胚牛に人工授精して7日目に胚を回収する方法が主体であった。一方、生体内の卵巢を超音波診断装置で観察しながら、卵子を採取して体外で受精させる経膈採卵(OPU)-体外胚生産(IVP)技術が開発され、短期間で多数の胚を生産することが可能となり、新たな胚生産方法として期待されている。

OPU-IVPに必要な技術として体外培養がある。しかし、体外培養では採取した卵子の20~30%程度しか移植可能胚が得られておらず、この培養技術を改善できれば、より多くの後継牛や肥育素牛の生産が可能である。移植可能胚生産は、卵子の成熟培養、体外受精、胚の発生培養を必要とする。そこで本研究では卵子と卵丘細胞の間のギャップ結合崩壊時間に着目した新しい成熟培養法を検討し、次に発生培養法の改良に取り組んだ。発生培養では、血清など生物学的な製剤を使用しない無血清合成卵管液(SOFaa-PVA)への成長因子等の添加が胚盤胞発生率に及ぼす効果を検討した。さらに、これらの培養技術を用いて OPU-IVP システムを活用し、正常な産子が得られるか否かを検討した。

第1章 ウシ卵子の体外成熟培養時における U0126 添加が胚盤胞発生率に及ぼす影響

卵子の減数分裂再開は、LH サージ後に mitogen-activated protein kinase (MAPK) を介して卵子と卵丘細胞との間のギャップ結合が崩壊し、卵子内の cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 濃度が低下しておこる。しかし、体外成熟では培養液中の成長因子等が MAPK を活性化し、ギャップ結合が早く崩壊して細胞質成熟が不十分のまま減数分裂が再開される。そのため、体外成熟卵子の胚盤胞発生率は、体内成熟卵子と比較して低いと考えられる。そこで本章では、ウシ卵子の成熟培養初期に MAPK を活性化する MAPK kinase (MAPKK) の阻害剤 U0126 を添加することがギャップ結合と胚発育に及ぼす影響を調べた。

食肉処理場で得た卵巣の卵胞から吸引した卵丘細胞卵子複合体 (COC) を、化学的組成の明らかな血清無添加成熟培養液に 5 μ M あるいは 10 μ M の U0126 を添加して 2 時間培養した。対照群には溶媒のみを添加した。その後、COC を成熟培養液に移して 21~22 時間成熟培養を継続した。続いて市販の血清無添加培養液を用いて媒精と発生培養を行い、胚盤胞発生率を調べた。また、成熟培養中の COC に対してギャップ結合構成因子であるコネキシン 43 の免疫蛍光染色を実施し、ギャップ結合の崩壊程度を推定した。その結果、胚盤胞発生率は対照群 (15%) と比較して 5 μ M 添加群 (28%) で有意に増加した ($P < 0.01$) が、10 μ M 添加群 (18%) では差がなかった。U0126 5 μ M 処置後 4 時間における卵子のギャップ結合崩壊率 (25%) は、対照群 (44%) と比較して有意に低かった ($P < 0.05$)。U0126 処置 18、24 時間後では両群の値は 75% 以上であり、群間に差はなかった。これらの結果から、ウシ卵子の成熟培養の初めの 2 時間に U0126 5 μ M を添加することにより、ギャップ結合の崩壊が遅延し、胚盤胞発生率が増加することが明らかとなった。

第2章 ウシ胚発生培養時におけるインスリン様成長因子-I (IGF-I)、上皮成長因子 (EGF)、グルコース、トランスフェリンおよびセレンの添加が胚盤胞発生率に及ぼす影響

発生培養に関する多くの研究で血清添加培養液が用いられているが、添加血清のロットによって胚盤胞発生率が異なることが知られており、この解決手段として、無血清培養液の使用が望まれる。そこで、食肉処理場由来ウシ卵巣から得た COC を用いて、常法で成熟培養と媒精を実施し、発生培養における成長因子、エネルギー基質 (グルコース) および胚発育を促進することが報告されているトランスフェリンやセレンの添加が胚発生に及ぼす影響を検討した。

第1節 IGF-I および EGF 添加の胚盤胞発生率に及ぼす影響

ウシ胚の発生培養において IGF-I や EGF の培養液への添加は、胚盤胞発生率を向上させることが報告されている。しかし、これら成長因子の至適濃度や相互作用については未だ明らかでない。そこで、SOFaa-PVA にこれら成長因子を各種濃度で、あるいは組み合わせて添加し、胚盤胞発生率に及ぼす影響を調べた。

実験 1 では、SOFaa-PVA に各種濃度の IGF-I (0, 2, 10, 50, 100 ng/ml) を、実験 2 では EGF (0, 1, 10, 100 ng/ml) を添加して発生培養を実施した。実験 3 では IGF-I 50 ng/ml と EGF 100 ng/ml のいずれか、または両方を添加して培養を行った。その結果、実験 1 では IGF-I 50 ng/ml 添加群において、最も高い胚盤胞発生率が得られた。実験 2 では、EGF 10 あるいは 100 ng/ml 添加により胚盤胞発生率が高くなる傾向がみられた。実験 3 では、無添加群 (12.0%)、EGF 添加群 (18.5%)、IGF-I 添加群 (19.4%)、両成長因子添加群 (27.9%) の順で胚盤胞発生率が高くなった。これらの

結果から SOFaa-PVA に IGF-I 50 ng/ml と EGF 100 ng/ml を添加することで高い胚盤胞発生率が得られることが明らかとなった。

第2節 グルコース、トランスフェリンおよびセレン添加の胚盤胞発生率に及ぼす影響

無血清培養液を用いた胚の発生培養におけるグルコースの胚発育に及ぼす影響は未だ不明な点が多い。また、無血清培養液にトランスフェリンやセレンを添加することで胚盤胞発生率が高くなることが報告されている。そこで、本節では SOFaa-PVA に IGF-I 50 ng/ml と EGF 100 ng/ml を添加した培養液 (SOF-IE) へのグルコースの添加量や添加時期が胚盤胞発生率に及ぼす影響について検討し、さらにトランスフェリンとセレン添加の胚盤胞発生率と胚活性の指標となる呼吸量に及ぼす効果を検討した。呼吸量は走査型電気化学顕微鏡を用いて酸素消費量を測定した。本章第1節と同様の方法で得られた受精卵を用いて、SOF-IE に各種濃度のグルコースを媒精直後から添加したところ、濃度が高くなるに従って胚盤胞発生率は低くなった。次に SOF-IE に媒精3日後から各種濃度のグルコースを添加したところ、胚盤胞発生率は群間で差はなかった。一方、SOF-IE に各種濃度のグルコースを媒精6日後から添加したところ、4 mM 添加群の胚盤胞発生率 (29.8%) は無添加群 (19.2%) と比べて有意に高かった。また、SOF-IE にグルコース 4 mM を媒精6日後から添加する培養法に加えて、トランスフェリン 5 µg/ml とセレン 5 ng/ml を媒精直後から添加することにより、胚盤胞発生率に差はなかったが、呼吸量が有意に増加した ($P<0.01$)。以上の結果から、SOF-IE にトランスフェリン 5 µg/ml とセレン 5 ng/ml を添加した培養液にグルコース 4 mM を媒精6日後から添加する発生培養法 (SOF-IETS+D6Glu) により、高い胚盤胞発生率と胚活性を得られることが明らかになった。

第3章 新規培養法で OPU 由来卵子から得られた胚の移植による子ウシ生産

本章では、黒毛和種2頭からOPUを計8回実施し、第1章と第2章の結果を基に、成熟培養初期にU0126 5 µMの添加あるいは無添加培養液で成熟培養し、体外受精後にSOF-IETS+D6Gluで発生培養を実施した。U0126処置群と対照群の胚盤胞発生率を調べ、U0126処置群の胚盤胞を採取直後あるいは凍結保存して受胎牛に移植し、子牛の生産を試みた。なお、OPU-IVPでは卵子採取から成熟培養までの間に時間を要するため、処置群には成熟培養初期だけでなく卵子回収液にもU0126 5 µMを添加した。その結果、U0126処置群の胚盤胞発生率 (39.1%) は対照群 (22.1%) と比べて有意に高かった ($P<0.05$)。また、U0126処置群から得た8個の採取直後の胚と2個の凍結胚を移植したところ、正常な産子がそれぞれ4頭と1頭得られた。これらの結果から、OPUで得られたCOCを本研究で改良した成熟培養・発生培養法を用いてOPU-IVPを実施することで高い胚盤胞発生率が得られ、それらの胚の移植により正常な子ウシが産出されることが明らかになった。

総括

1. 食肉処理場由来卵子の成熟培養の初めの2時間にU0126 5 µMを添加することにより、卵子と卵丘細胞の間のギャップ結合の崩壊が遅延し、媒精・発生培養を実施すると胚盤胞発生率が向上した。

2. 食肉処理場由来卵子を成熟培養・体外受精した後に IGF-I 50 ng/ml、EGF 100 ng/ml、トランスフェリン 5 µg/ml およびセレン 5 ng/ml を添加した無血清培養液を用い、6 日後からグルコース 4 mM を添加して発生培養を実施することにより、高い胚盤胞発生率と胚活性が得られた。
3. U0126 5 µM を添加した卵子回収液と本研究で改良した成熟培養・発生培養法を用いて OPU-IVP を実施することで高い胚盤胞発生率が得られ、これら胚盤胞の移植により正常な子ウシが産出された。

審査結果の要旨

雌ウシの優良形質を保存するために、過排卵処理を施した供胚牛を人工授精して、7 日目に胚を回収して受卵牛に移植する方法が従来から実施されている。一方、生体内の卵巣を超音波診断装置で観察しながら、卵子を採取して体外で受精させる経膈採卵(OPU)-体外胚生産 (IVP) 技術が開発され、短期間で多数の胚を生産することが可能となった。OPU-IVP には体外培養が不可欠であるが、体外培養では採取した卵子の 20~30%程度しか移植可能な胚盤胞が得られていない。体外培養による胚盤胞の生産は、卵子の成熟培養、体外受精、胚の発生培養を必要とするが、本研究では血清など生物学的な製剤を使用しない組成の明らかな培養液を用いて、卵子と卵丘細胞の間のギャップ結合崩壊時間に着目した新しい成熟培養法を検討し、次に発生培養において無血清合成卵管液 (SOFaa-PVA) への成長因子等の添加が胚発育に及ぼす影響を検討した。さらに、これらの培養技術を用いて OPU-IVP システムを活用し、正常な産子が得られるか否かを検討している。

第 1 章では、食肉処理場で得たウシ卵巣から採取した卵丘細胞卵子複合体 (COC) を用いて、成熟培養初期に mitogen-activated protein kinase (MAPK) を活性化する MAPK kinase (MAPKK) の阻害剤 U0126 を添加することがギャップ結合と胚発育に及ぼす影響を調べた。排卵を誘起する黄体形成ホルモンの血中へのサージ状分泌により、MAPK を介して卵子と卵丘細胞との間のギャップ結合が崩壊し、卵丘細胞から卵子内への cyclic adenosine monophosphate (cAMP) の供給が遮断されると卵子内 cAMP 濃度が低下して卵子の減数分裂が再開する。一方、体外成熟では培養液中の成長因子等が MAPK を活性化し、ギャップ結合が早く崩壊して卵丘細胞からの各種因子の供給が不足し、細胞質成熟が不十分のまま減数分裂が再開される。そのため、体外成熟卵子の胚盤胞発生率は、体内成熟卵子と比較して低いと考えられる。本章では、化学的組成の明らかな血清無添加成熟培養液を用いた成熟培養において、その最初の 2 時間に 5 µM の U0126 を添加することにより、卵子と卵丘細胞の間のギャップ結合の崩壊が遅延してその後の胚盤胞発生率が有意に増加することを明らかにした。

第 2 章では食肉処理場由来ウシ卵巣から得た COC を用いた発生培養時におけるインスリン様成

長因子-I (IGF-I)、上皮成長因子 (EGF)、グルコース、トランスフェリンおよびセレンの添加が胚盤胞発生率に及ぼす影響を調べた。第1節で、胚盤胞発生率向上に向けた最適な濃度や相互作用が不明であった IGF-I と EGF に焦点を当て、これら成長因子を各種濃度で SOFaa-PVA に添加して発生培養を実施し、IGF-I 50 ng/ml と EGF 100 ng/ml を組み合わせて添加 (SOF-IE) することで高い胚盤胞発生率が得られることを明らかにした。また、第2節で、SOF-IE を用いて、エネルギー基質のグルコースの添加濃度と時期、並びに胚発育を促進することが報告されているトランスフェリンやセレンの添加が胚発生に及ぼす影響を検討したところ、SOF-IE にトランスフェリン 5 µg/ml とセレン 5 ng/ml を添加した培養液にグルコース 4 mM を媒精6日後から添加する発生培養法 (SOF-IETS+D6Glu) により、高い胚盤胞発生率と胚活性を得られることが明らかになった。

第3章では、OPU由来卵子を用いて、第1章と第2章で開発された新規培養法で胚盤胞を作製し、得られた胚の移植による子ウシ生産を試みた。すなわち、黒毛和種2頭からOPUを計8回実施し、第1章と第2章の結果を基に、成熟培養初期に U0126 5 µM の添加あるいは無添加培養液で成熟培養し、体外受精後に SOF-IETS+D6Glu で発生培養を実施した。U0126 処置群と対照群の胚盤胞発生率を調べ、U0126 処置群の胚盤胞を採取直後あるいは凍結保存して受胎牛に移植した。なお、OPU-IVP では卵子採取から成熟培養までの間に時間を要するため、処置群には成熟培養初期だけでなく卵子回収液にも U0126 5 µM を添加した。その結果、U0126 処置群の胚盤胞発生率 (39.1%) は対照群 (22.1%) と比べて有意に高かった ($P<0.05$)。また、U0126 処置群から得た8個の採取直後の胚と2個の凍結胚を移植したところ、正常な産子がそれぞれ4頭と1頭得られた。これらの結果から、OPUで得られたCOCを本研究で改良した成熟培養・発生培養法を用いてOPU-IVPを実施することで高い胚盤胞発生率が得られ、それらの胚の移植により正常な子ウシが産出されることが明らかになった。

以上のように、本研究は U0126 5 µM を添加した卵子回収液と本研究で改良した成熟培養・発生培養法を用いて OPU-IVP を実施することで高い胚盤胞発生率が得られ、これら胚盤胞の移植により正常な子ウシが産出されることを示した。これらの研究成果は、ウシの優良形質保存に向けた OPU-IVP 技術の問題点を改善するものであり、実用的・社会的な貢献度が極めて高いと判断されるだけでなく、ヒトの生殖技術の改善にも大きく貢献するものと考えられる。したがって、本論文の審査ならびに学力確認の結果と併せて、博士 (獣医学) の学位を授与することを適当と認める。