

学 位 論 文 要 旨

氏名 磯部 知弘

題 目：絹タンパク質セリシンを用いたウシ胚の個別培養培地と無血清凍結保存液の開発

論文要旨：

近年、ウシの家畜改良分野においては、優良な遺伝形質を持った雌畜からの増殖には限度があるものの、超音波診断装置を用いた生体内の卵巣内卵胞からの卵子を吸引する経膣採卵 (Ovum Pick Up ; OPU) 技術と体外受精 (In Vitro Fertilization ; IVF) 技術を組み合わせた「OPU-IVF」によって雌畜を中心とした遺伝的改良が可能となった。しかし、雄精子とは異なり、回収される卵子は常に多数とは限らず、個別および少数グループによる培養技術が必要な受精卵 (胚) の発生率は低い。このため、希少価値のある雌畜卵子が少数でも効率的な胚発生培地や培養技術が切望されている。さらに、胚の輸送には凍結保存が必要であるが、以前から凍結保存液に添加されている血清類中には未知の物質混入が否定出来ず、安全性において無血清凍結液の開発は希求されていた。そこで本研究は、これらの問題に対処するために18種類のアミノ酸から組成される水溶性タンパク質で、シルク (絹) のフィブロイン (絹糸) を覆っているセリシンに着目した。

研究1では、セリシンが個別培養されたウシ胚の着床前における発生と品質に与える影響について検討した。無添加 (コントロール)、0.1、0.5 および 1% (w/v) セリシンを添加した CR1aa 培地で「と畜卵巣卵子-IVF」由来2細胞期胚を7日間個別培養したところ、0.5%セリシン添加区の胚から発生した総胚盤胞と拡張胚盤胞の発生率は、セリシン無添加もしくは1%セリシン添加区と比較して有意に高かった。また、セリシン無添加もしくは0.5%添加区において、酸化ストレス状態 (50 μ M と 100 μ M 過酸化水素) として7日間個別培養したところ、100 μ M 過酸化水素を暴露した胚の総胚盤胞発生率はセリシン添加により著しく改善された。しかしながら、50 μ M 過酸化水素を暴露した培養液での胚発生ではセリシンにおける保護効果が認められなかった。一方で、培養液中に100 μ M 過酸化水素を暴露された胚では、0.5%セリシン添加区における総胚盤胞のDNA損傷率は、コントロール区と比較して、有意に低値を示した。このことから、0.5%セリシン添加は酸化ストレスを低減することにより、個別培養における胚の発生と品質を改善すると推察された。

研究2では、OPUによるウシ体外受精胚の生産において、胚の個別培養方法の確立が特に重要である。OPU由来胚の体外発生能について、培養液へのセリシン添加の有無、並びに個別培養法とグループ培養法を比較し、さらに、その凍結融解胚を受胎牛に直接移植することにより、OPU由来胚の生存性を検討した。OPU由来2細胞期胚を0.5%セリシン添加もしくは無添加のCR1aa培地で、個別およびグループ培養により7日間培養した結果、セリシン無添加の個別培養の胚盤胞および凍結可能胚盤胞への発生率は、セリシン添加の有無に関係なくグループ培養と比較して有意に低下した。一方、個別培養において、凍結可能胚盤胞への発生率は、セリシン添加区が無添

(別紙様式第 3 号)

加区に比べ有意に高かった。その凍結融解胚の直接移植後の妊娠率、流産率、死産率および正常分娩率は、培養法やセリシン添加の有無に関係なく各区間で有意な差は認められなかった。この結果から、OPU 由来胚培養過程でのセリシン添加は、凍結融解胚の移植後の生存性は向上しないものの、個別培養した胚の品質を改善することが示された。

研究 3 は、セリシンの凍結液における血清代替効果について、ウシ胚の凍結融解後の生存性や胚発育を検討するとともに、受胚牛に直接胚移植して、その妊娠率、流産率、死産率および正常分娩率を調査した。ウシ体外受精胚を 0.1~1%濃度のセリシンを添加した凍結液で凍結保存し、融解後の胚の生存性を調べた。その結果、透明帯破損率、生存率および発育率は 0.4%牛血清アルブミンおよび 20%牛胎児血清（コントロール）を添加した凍結液で凍結した胚と比較して同等であった。また、コントロール凍結液、0.5%セリシン+20%血清（0.5S/20F）凍結液、0.5%セリシン凍結液（0.5S）の 3 種類で体内胚を凍結させ、それらを受胚牛に直接移植したところ、0.5S/20F 区において妊娠率および正常分娩率がコントロール区より有意に増加した（0.5S/20F 区 vs コントロール区：妊娠率、47.3%vs40.1%および正常分娩率、94.6% vs 87.3%）。さらに、0.5S 区は妊娠、正常分娩率（それぞれ 42.2%、92.4%）において他の 2 区と比較して有意な差はなかった。今回の結果から、ウシ胚の凍結保存法において、牛胎児血清や牛血清アルブミンからのバイオハザードを排除するために、血清代替物としてセリシンは有効であることが示唆された。

以上の結果からセリシンは、OPU 技術を用いたウシ体外受精胚における個別培養での生産性向上による牛群の育種改良と体内および体外胚の広域流通における新たな無血清凍結保存法に寄与できると考えられた。

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	磯部 知弘
審査委員	主 査：山口大学 教授 音井 威重
	副 査：山口大学 教授 山本 芳実
	副 査：山口大学 教授 田浦 保穂
	副 査：山口大学 教授 佐藤 宏
	副 査：鹿児島大学 准教授 高木 光博
題 目	絹タンパク質セリシンを用いたウシ胚の個別培養培地と無血清凍結保存液の開発
<p>審査結果の要旨：</p> <p>近年、個体識別が可能な経膈採卵（OPU）によるウシ胚作成技術が進展するに従い、OPU に応じた体外発生培養技術の確立が求められている。また、ウシ胚の凍結には血清を添加した凍結液が用いられているが、牛海綿状脳症（BSE）のような病原性プリオンを混入させる可能性があり、伝染病伝播リスクを増大させることが危惧される。このため、ウシ胚の生存性を損なわず、安全で効果的な血清代替物の使用が切望されている背景がある。申請者は、医薬品および化粧品添加物としても使用されているカイコ由来の絹タンパク質であるセリシンに注目し、セリシンの抗酸化作用によるウシ胚の個別培養培地の改良および血清代替物としてウシ胚の無血清凍結保存液の開発を行った。</p> <p>研究 1 では、個別培養されたウシ体外受精卵の発育と品質に及ぼすセリシンの効果について検討した。無添加（コントロール）、0.1、0.5 および 1% (w/v) セリシンを添加した CR1aa 培地で 7 日間個別に 2 細胞期胚を培養した。その結果、0.5% セリシン添加区の胚盤胞と拡張胚盤胞の発生率は、セリシン無添加もしくは 1% セリシン添加区と比較して有意に高かった。さらに、酸化ストレス状態下（過酸化水素添加）で 7 日間個別に培養したところ、100μM 過酸化水素に暴露した胚の胚盤胞発生率は 0.5% セリシン添加により改善され、胚の DNA 損傷率も無添加の対照区の胚盤胞と比較して有意に低値を示した。このことから、0.5% セリシン添加は胚への酸化ストレスを低減することにより、個別培養における胚発生と品質を改善すると推察している。</p> <p>研究 2 では、OPU によるウシ体外受精胚を用い、培養液へのセリシン添加効果、さらに、凍結融解胚を受胎牛に直接移植した後の生存性を検討した。OPU 由来 2 細胞期胚を 0.5% セリシン添加もしくは無添加の CR1aa 培地で、個別培養およびグループ培養法により 7 日間培養</p>	

した結果、グループ培養胚にはセリシンの添加効果は認められなかったが、個別培養胚において、セリシン添加区の凍結可能胚盤胞への発生率が無添加区に比べ有意に高かった。凍結融解胚の直接移植後の妊娠率、流産率、死産率および正常分娩率は、培養法やセリシン添加の有無に関係なく各区間で有意な差がなかった。この結果から、OPU 由来胚培養過程でのセリシン添加は、凍結融解胚の移植後の生存性は向上しないものの、個別培養した胚の品質を改善することが示された。

研究 3 は、セリシンの血清代替効果について、ウシ胚の凍結融解後の生存性や胚発育を検討するとともに、受胚牛に直接移植して、その妊娠率、流産率、死産率および正常分娩率を調査した。その結果、0.5%セリシンを添加した凍結液由来胚の生存率および発育率は 0.4%牛血清アルブミン+20%牛胎児血清(対照)を添加した凍結液由来の胚と同等であった。また、0.5%セリシンを添加した凍結液由来胚の移植後の妊娠率、正常分娩率は他の血清を添加した凍結液由来胚と比較して有意な差はなかった。この結果から、ウシ胚の凍結液としてセリシンが血清代替物として使用可能であることが示された。

本研究は、0.5%セリシンを胚培養液に添加することにより、抗酸化効果として胚の発育や品質を改善したと推定している。また、個別培養での OPU 由来胚の発生を支持し、作出胚は凍結保存後、産子に発育しておりその安全性も認めている。さらに、体内胚を用い、凍結液に添加する血清の代替物としてセリシンが使用可能であることを示した。

これら成果は、国際的にも十分に評価されており、安全性の高いセリシンの使用は、近年需要が高まっている OPU 技術を用いたウシ体外胚における個別培養での生産性向上による牛群の遺伝的な育種改良と体内・体外胚の流通に寄与できると考えられた。以上により、本論文は博士(獣医学)の学位を授与するにふさわしいと判断された。