

氏 名 (本籍)	と つ かわ 戸 津 川	きよし 清 (島根県)
学位の種類	農 学 博 士	
学位記番号	農 博 第 1 6 1 号	
学位授与年月日	昭和 5 0 年 3 月 2 5 日	
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当	
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 畜産学専攻	
学位論文題目	家兎胚盤胞のセックス・クロマチン による性支配に関する基礎的研究	

(主 査)

論文審査委員	教授 竹内三郎	教授 玉手英夫
		教授 津田恒之

論文内容要旨

1. 序論 (第1章)

生物界における性の支配は、長い間の人類の夢の一つであり、人間に應用することは、いろいろ問題があるが、動物、特に家畜における性の支配は、多大の利益をもたらすことができる。すなわち、家畜の増産および畜産物の生産には、雌性動物のはたす役割が大きく、雌性動物をより多く生産することが要請される。

性支配について、これまで種々の観点から研究が試みられてきた。それらの中の多くの研究はX精子及びY精子を人為的に分離することによる精子調の制御であったが、今までの結果は、各研究者により結果がまちまちで、未だ十分な性支配の方法は確立されていない。

1949年、Barr and Bertram がセックス・クロマチンを発見し、これが雌性動物の静止核にのみ存在することから、これを應用して性支配を行なうことが可能になった。

本論文は、セックス・クロマチンを判定の基準にして、着床前の胚盤胞の雌雄を鑑別し、それを他の受容体雌の子宮に移植し、産子の性支配をすることを目標にして、その基礎的研究を行なった。

2. 胚盤胞の処理方法の検討 (第2.3章)

胚盤胞の性鑑別に必要な操作の為の装置、栄養膜細胞の切り取り方法、同細胞の染色及びセックス・クロマチンによる雌雄鑑別等について検討した。胚盤胞に及ぼす物理的な悪影響を避けるために、著者が考案した吸引装置が良好な結果をもたらした。すなわち、100のツベルクリンの注射筒にバネを付け、注射筒の先に、保定ピペットを装着し、このピペットの先端を内径1mmの穴にし、その部分にミリポア・フィルターを接着したものであり、ミリポア・フィルターを接着した場合には、約95%においてうまく細胞を切除することができ、接着しない場合には、約70%の胚盤胞が破損し、細胞を切り取ることが困難であった。栄養膜細胞の切り取り方法としては、針で透明帯に穴を開け、その部位から栄養膜細胞をわずかに引き出し、眼科用ハサミで切り取るのが最良であり、この方法によれば、操作に必要な時間は5分と短縮された。処理に供する胚盤胞の日令は5.5日令(排卵後の日数)が最適であった。また、自然発情雌との交尾により得た卵子は、透明帯に弾性が有り操作は容易であったが、PMS前処理による過排卵で得たものは、胚盤胞の大きさがまちまちで、しかも透明帯に弾力がなく、穴を開ける際に、破裂するものが見られた。栄養膜細胞の染色は、5N硝酸で10分間(室温)加水分解し、フォルゲン反応により約1時間染色で良い結果を得た。この方法で性鑑別をした結果、74例中、セックス・クロマ

チンを有するものと、有しないものとの比は37:37であった。

3. 処理した胚盤胞の *in vitro* における発生の検討 (第4章)

一部の栄養膜細胞を、より活力のあるまま保存する目的で、仔牛血清、家兎血清、Ham's F12 + 仔牛血清 (10%)、Medium Eagle + 仔牛血清 (20%)、Medium 199 + 仔牛血清 (10%)、仔牛血清 + 0.85% NaCl (= 1:1)、仔牛血清 + 0.85% NaCl (= 1:3) を用いて、萎縮した胚盤胞の回復状態を検討した。*in vitro* の条件下で、24時間培養した結果 (Table 1)、形態的に回復した割合は、それぞれ、仔牛血清 - 66.6%、家兎血清 - 56.5%、Ham's F12 + 仔牛血清 - 65.5%、Medium 199 + 仔牛血清 - 0%、仔牛血清 + 0.85% NaCl (= 1:1) - 38.9%、仔牛血清 + 0.85% NaCl (= 1:3) - 25.0% であった。回復した胚盤胞をニグロシンの染色性により、活性を検討した結果、無処理の胚盤胞と有意差は認められなかった。次に、処理胚の回復経過について検討した。無処理時の容積をそれぞれ80%、50%、及び20%の各群に分けて、回復状態を調べた。結果はFig. 1に示す通りで、80%区では、培養直後から急速に回復し、約10時間すれば母元の容積に回復し、さらに容積の増大が認められ、穴をあけた局部から栄養膜細胞の小球が露出した。50%区では、約12時間で回復するものと、初め少し回復するが、その後萎縮してしまい二つの型に分かれた。20%区では、低い割合で回復するものも見られたが、多くは萎縮してしまった。切り取った栄養膜細胞の数が胚盤胞の回復に影響しているかを調べた結果、細胞数がそれぞれ、63個、400個、700個で膨張し、一方、400個、445個のもので萎縮しており、切り取る細胞数により、回復に影響はなく、むしろ、切り取り時の手技が影響した。

4. 処理胚盤胞の活力の検討 (第5章)

各種処理をした胚盤胞について、SDH (succinic dehydrogenase) を指標にして、胚盤胞の活性を酵素組織学的に検討した。また、モノメーターを用いて、同様に各種処理をした胚盤胞の酸素消費量を調べた。SDH活性を指標とした場合、無処理の胚盤胞は、80%が強い活性を示し、20%が中程度であった。また、内細胞塊は、栄養膜細胞より強い活性を示した。無処理の培養だけの区において、1時間の培養では、無処理区と同様な結果であるが、培養時間が長くなると活性が次第に低下する傾向が見られ、栄養膜細胞の活性にむらぎ認められた。針で穴をあけた区では、培養だけの区と比べて、活性の程度は低かった。栄養膜細胞を切り取り、萎縮した胚盤胞を回復させた区では、培養だけの区と比べて差は認められなかった。また、この区

においては特に、栄養膜細胞の活性に部分的な差が認められ、細胞自体が異常に拡大しているものが認められた。PMSにより過剰排卵処理した雌家兎より採取した胚盤胞を用いた場合に、活性は自然排卵のものとは比べて、活性の程度が低かった。また、随所に細胞間隙が認められた。

無処理胚盤胞の酸素消費は、培養1時間後から急速に増加を続けるが、一方、穿刺した胚盤胞は、2時間目までは徐々に増加するが、3時間目からは、大部分の胚盤胞の酸素消費量は「プラトー」に達する。栄養膜細胞切除胚は、2時間目までは急速に増加するが、それ以後は穿刺区と同様にプラトーに達する。(Fig 2)

これらの結果から、処理をした胚盤胞について見ると、SDH活性と酸素消費との間には相関関係が認められる。

5. 透明帯除去が胚盤胞の発生に及ぼす影響について (第6章)

本実験において、栄養膜細胞の一部を切除し、萎縮した胚盤胞を培養すると、針で穴をあけた部分から栄養膜細胞の小球が露出してくるが、培養を継続しても、透明帯からは決して離脱しないことが観察されており、この現象が後の発生に如何なる影響を与えているか興味を持たれた。したがって、透明帯を人為的に除去して、発生の可能性を検討した。

透明帯除去の方法としては、機械的除去方法とPronaseによる化学的除去法を実施した。次に、裸化した裸化胚盤胞をin vitroの条件下で培養し、再膨張の状態を調べた。その結果はFig 3, 4に示す通りである。裸化胚盤胞の中で、裸化直後に80~90%容積に萎縮したものは、4時間経過すれば、ほぼ元の容積に再膨張し以後、無処理のものと同様な傾向で膨張を続ける。一方、裸化直後、かなり萎縮した胚盤胞も培養後、再膨張を開始し、6時間で完全に元の容積に回復した。透明帯に針で穴をあけた穿刺胚盤胞は、裸化胚盤胞の回復速度より遅い結果であった。上述のように、穿刺した胚盤胞及び裸化胚盤胞を偽妊娠誘起した雌の子宮に移植した結果、透明帯に穴をあけた胚盤胞は、全個体に着床が認められ、79% (15/19) が着床、26% (5/19) が胎児にまで発達した。一方、pronase及び機械的透明帯除去胚では、それぞれ、4/4、2/4の個体に着床が認められ、着床率は、42%及び33%であった。これらのものは、いずれも胎児にまで発生しなかった。これらのことより、家兎の場合には、着床時まで透明帯が胚盤胞の成長及び活性に必要なことが明らかになった。

6. 処理胚盤胞の移植について (第7章)

in vitroにおける処理が胚の発生に及ぼす影響について検討した。すなわち、(1) 無

処理胚盤胞の培養，(2) 穿刺した胚盤胞，(3) 栄養膜細胞の一部を切除した胚盤胞の3種の処理胚盤胞を移植に供した。その結果は、Table II～IVに示す通りである。無処理の培養だけの胚盤胞では、同期化(5D:排卵後の供与体日数-5R:排卵後の受容体日数)で、精管結紮雄との交尾による偽妊娠(以下、結紮雄)区で82%が着床、73%が胎児に発生し、同期化、HCGによる偽妊娠誘起区で95%が着床、40%が胎児に発生した。この無処理の培養の場合には、同期化で、結紮雄区の場合が胚の発生に良好であった。

穿刺した胚盤胞の移植では、同期化、結紮雄、処理直後移植区で44%が着床、6%が胎児に発生、同様処理で、処理後6時間培養後の移植区では67%が着床、20%が胎児に発生した。

一方、HCG偽妊娠区で75%が着床したが、胎児まで発生せず、非同期化(5D-4R)し、結紮雄区で30%が着床したが、それ以上発生しなかった。栄養膜細胞切除胚では、同期化、HCG偽妊娠、24時間培養区で19%の着床が認められた。一方、非同期化、結紮雄、6時間培養区で49%が着床し、6%が正常な胎児にまで発生した。

上述の3種の結果から、受容体の子宮環境は、精管結紮雄による偽妊娠誘起が良好であった。

最後にセックス・クロマチンにより雌雄判別した胚盤胞の正否を、生産された胎児の性により検討した。その結果、胚盤胞の性鑑別及び移植による、胎児6例の性判別は、4例が正、2例が否の結果であった。これにより、100%の性支配はできなかったが、従来から不可能である性比の1:1の割合を向上させることが可能であることが示唆された。

Table 1. Effect of medium on recovery of embryos

Medium	No. of embryo	Contract	Almost full recovery	Full recovery	
				No.	%
Calf serum	21	6	1	14	66.6
Rabbit serum	23	5	5	13	56.5
Ham's F ₁₂ + Calf serum (10%)	29	5	5	19	65.5
Medium Eagle + Calf serum (20%)	18	4	3	11	61.1
Medium 199 + Calf serum (10%)	11	9	2	0	0
Calf serum + 0.85% NaCl (1 : 1)	13	3	5	5	38.9
Calf serum + 0.85% NaCl (1 : 3)	4	3	0	1	25.0

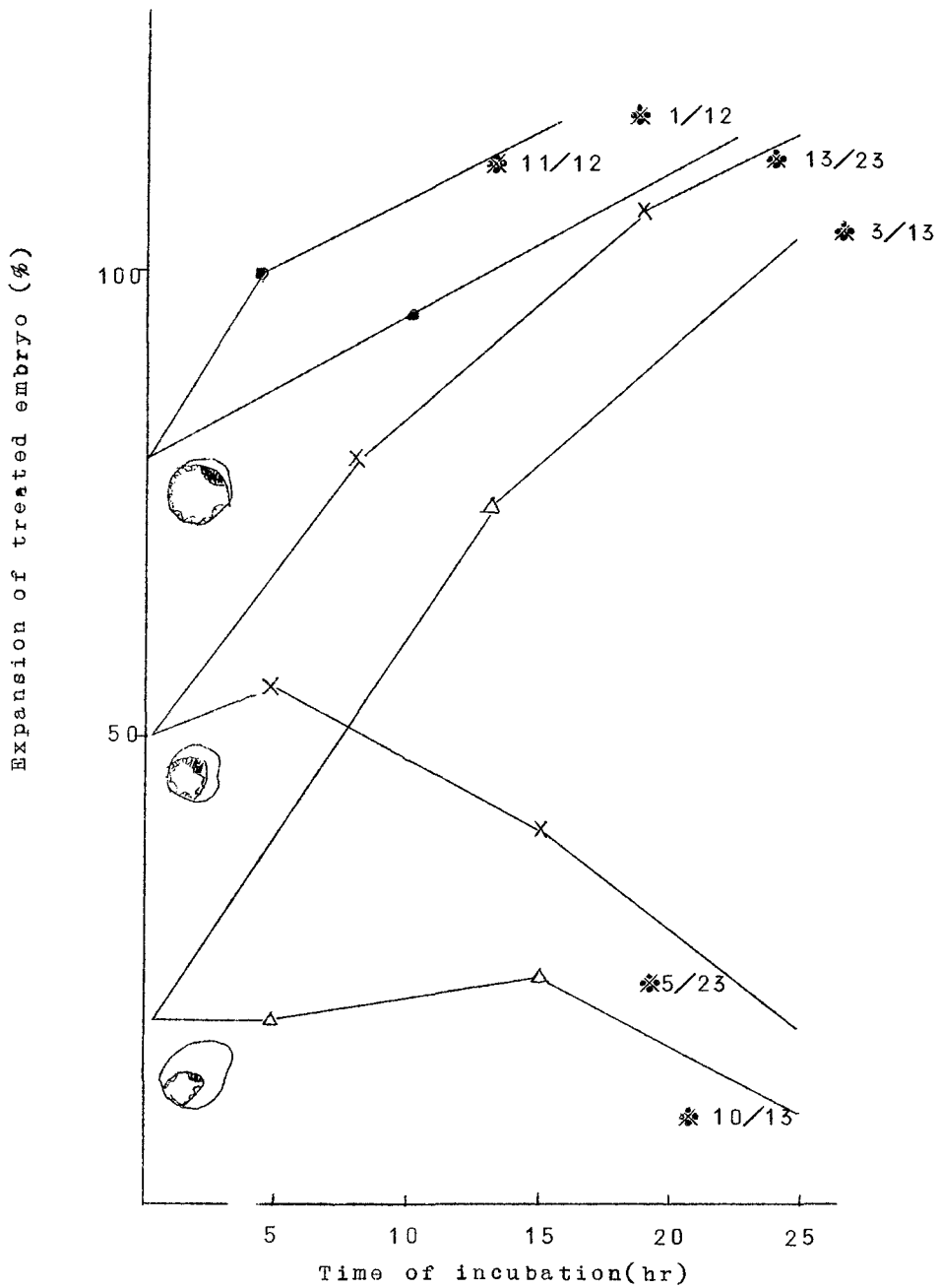


Fig 1. Recovery curve of three groups(80%,50%,20% volume of non-treated blastocyst) just after trophoblastic cell was excised

* $\frac{\text{No. of developed embryo}}{\text{Total No. of treated embryo}}$

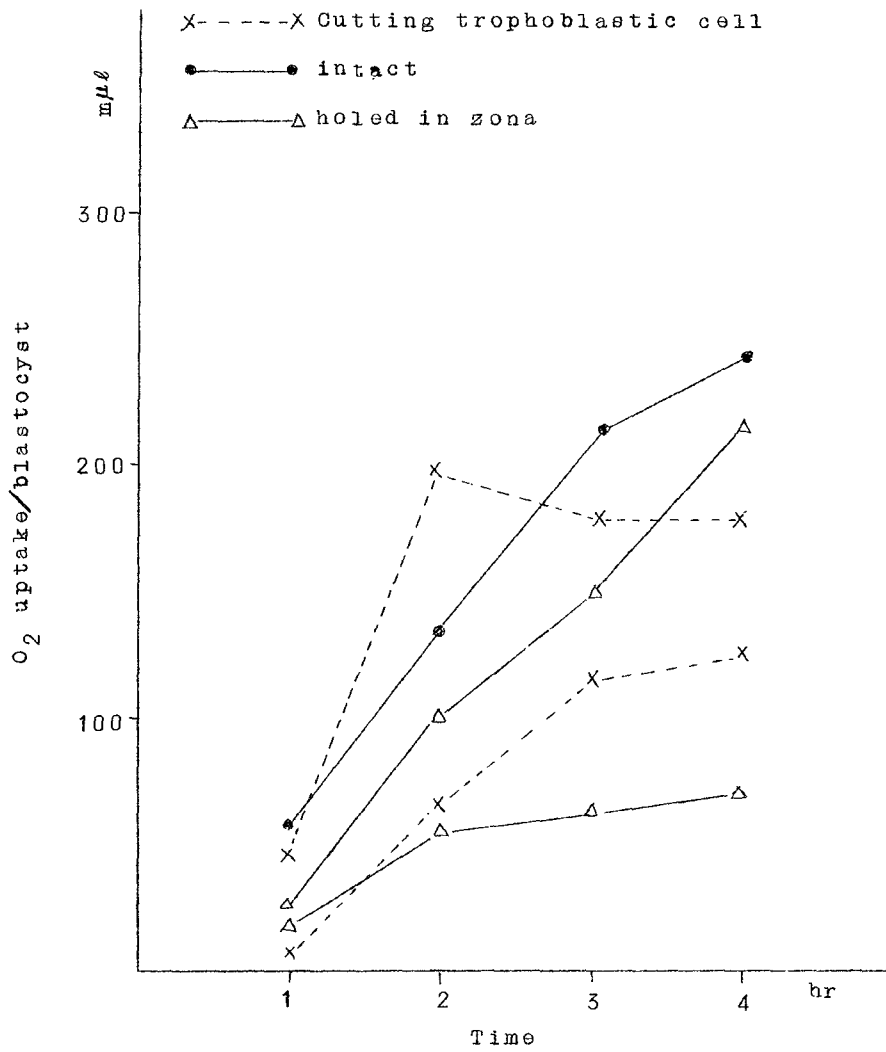


Fig 2. O₂ consumption of treated blastocysts

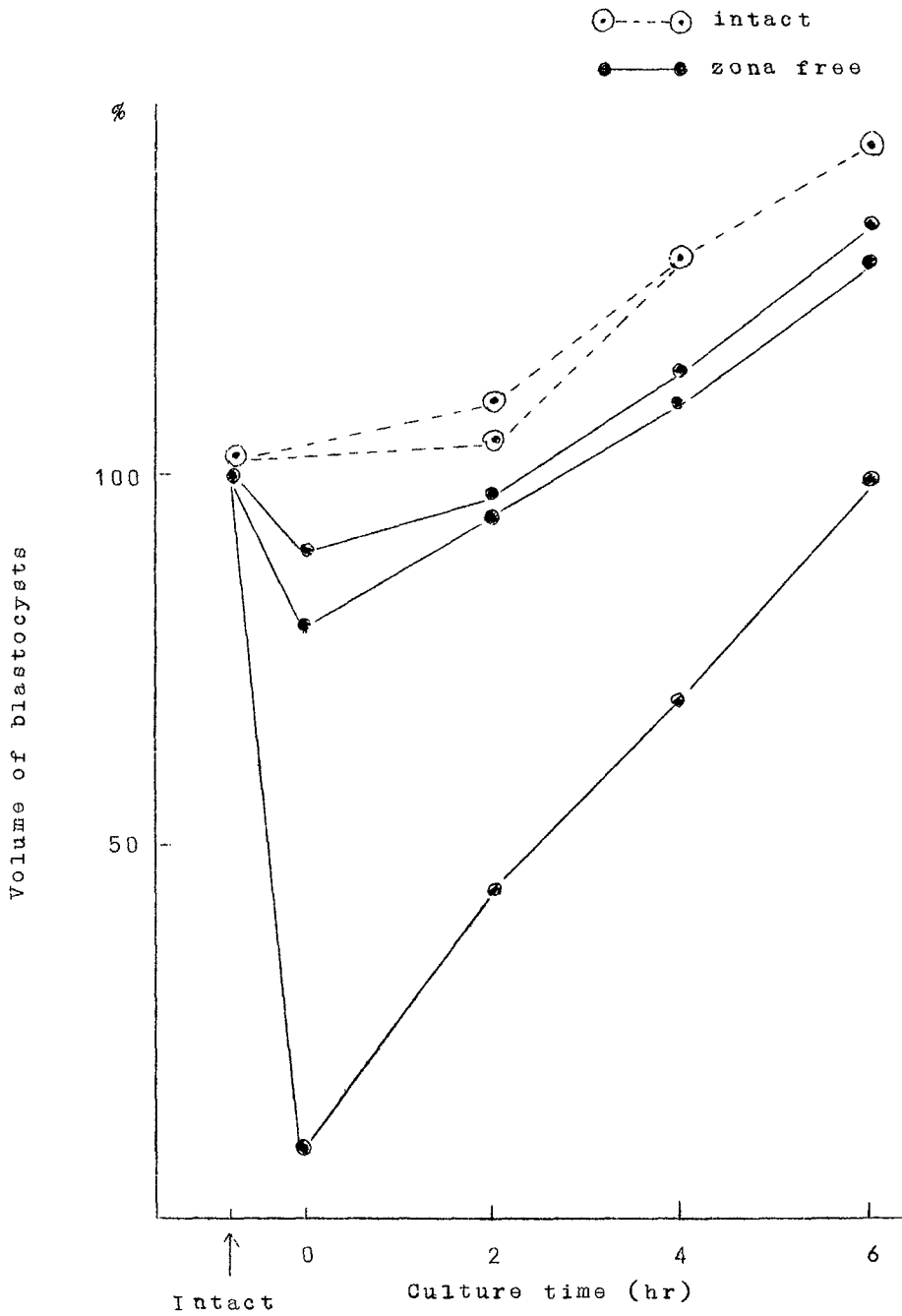


Fig.3. Expand of intact and zona free blastocysts during culture

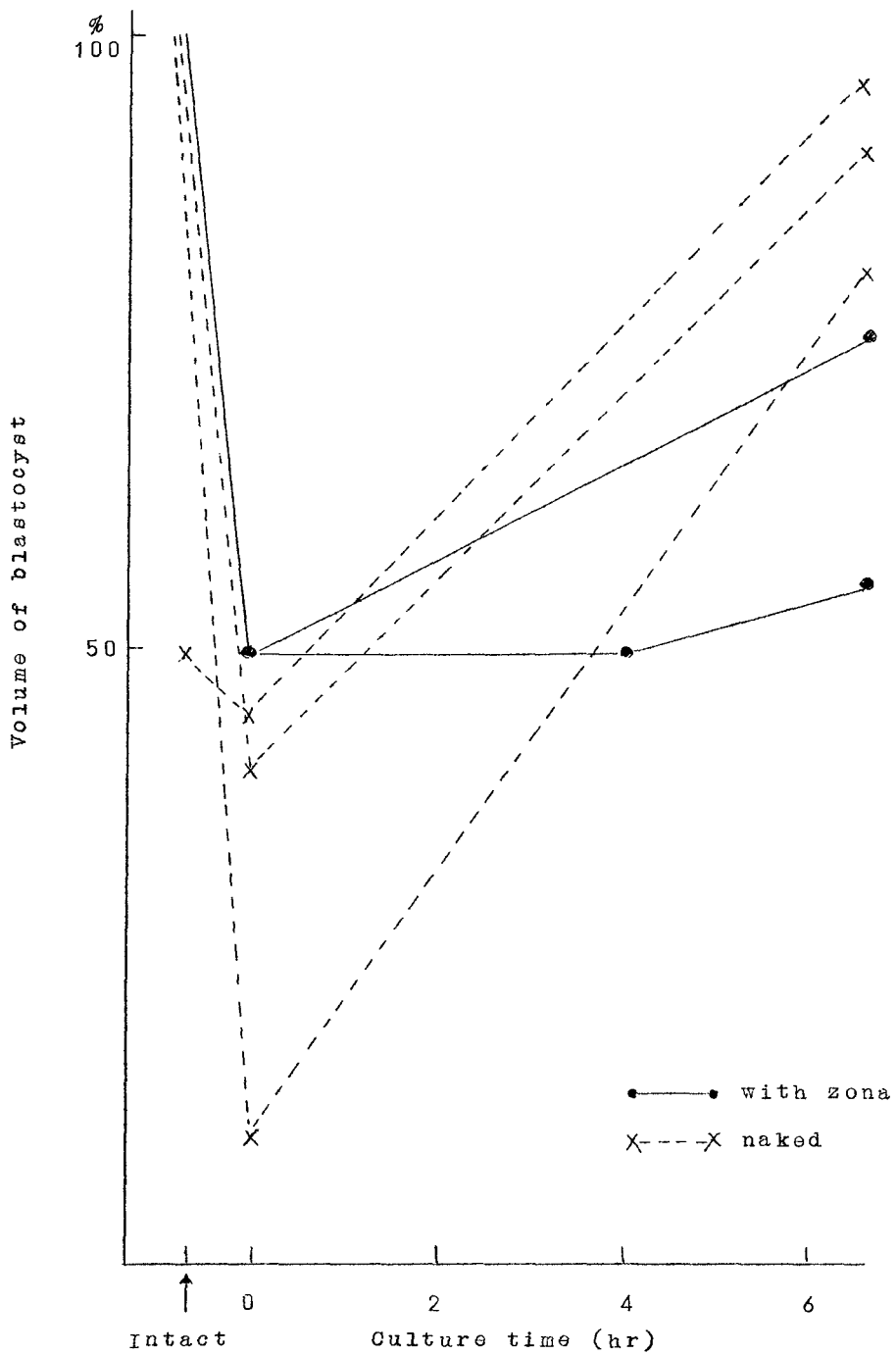


Fig 4. Re-expand of naked blastocysts and holed blastocysts (with zona) during culture

Table II. Survival of transferred blastocysts
after culture

Group	Stage of donor (D) and recipient (R)	Induction of pseudo- pregnancy	No. of transferred blastocysts	No. of implantation sites (%)	No. of living fetuses(%)
I	5D-5R	Mating with vasecto- mized male (♂)	11	9(82)	8(73)
II	5D-5R	HCG injection	20	19(95)	8(40)
III	5D-4R	(♂)	10	9(90)	3(30)
IV	5D-4R	HCG injection	23	14(61)	0
V	5D-3R	(♂)	6	0	0

Table III. Survival of holed blastocysts
with fine needle

Group	Stage of donor(D) and recipient(R)	Induction of pseudopregnancy	Time from manipulation of embryo to transfer(hr)	No. of transferred blastocysts	No. of implantation sites (%)	No. of living fetuses (%)
I	5D-5R	Mating with vasectomized male	6	15	10 (67)	3 (20)
II	5D-5R	(♂) '	0	16	7 (44)	1 (6)
III	5D-5R	HCG injection	6	12	9 (75)	0
IV	5D-4R	♂	6	10	3 (30)	0

Table IV. Survival of transferred blastocysts
after cutting treatment

Group	Stage of donor(D) and recipient(R)	Induction of pseudopregnancy	Time from treatment of embryo to transfer(hr)	No. of transferred blastocysts	No. of implantation sites (%)	No. of living fetuses (%)
I	5D-4R	HCG injection	6	4	0	0
II	5D-5R	"	6	23	0	0
III	5D-5R	"	24	26	5 (19)	0
IV	5D-4R	Mating with vasectomized male	6	96	47 (49)	7 (6)
V	5D-5R	"	6	26	2 (8)	0

審査結果の要旨

性の支配について、従来種々の観点から研究が試みられたが、未だ満足すべき結果は得られておらない。この論文は雌性動物の静止核に存在するとされているセックス・クロマチンを応用して、胚盤胞の性を鑑別し、その胚を他動物の生殖管に移植することにより産子の性支配を行うことを目的として、その基礎的研究を行ったものである。

著者はまず、胚盤胞の性鑑別に用いる栄養膜細胞の切り取る方法、同細胞の染色による性鑑別・処理胚盤胞の培養方法ならびにその回復等について検討した。その結果、針で透明帯に穴をあけ、その部分から吸出した栄養膜細胞を切り取る方法がよく、その時胚の吸引保定ピペットの先端にミリポア・フィルターが極めて有効であり、またフォイルゲン反応による染色法に工夫を試み、胚盤胞74例中セックス・クロマチンを有するものと有しないものとの比が37:37の結果を得た。また一部の栄養膜細胞を切り取り、萎縮した胚盤胞の体外培養による回復について検討し、切り取り時の胚の萎縮程度がその回復に重要な影響を及ぼし、切り取る細胞数がある範囲内ならば大きな要因とはならない結果を得た。

次に各種物理的損傷による胚盤胞の活力について、コハク酸脱水素酵素活性、酸素消費量等の面より検索し、これらの処理胚盤胞はいずれも無処理のものに比して低い結果を得た。なお胚盤胞の透明帯除去試験よりして、着床時までの胚盤胞の成長、活力に透明帯が必要であることが明らかにされた。

最後にこれら処理胚盤胞の活力を受精卵の移植試験により着床および胎児までの発生を指標として検討した。その結果受精卵の移植条件のうち偽妊娠の誘起の方法としては結紮雄との交配が、また受精卵の供与家兎と受容家兎との偽妊娠期の関係は排卵後の日数でそれぞれ5日、4日の場合が処理胚の着床ならびに胎児への発生の成績が良好であった。さらにセックス・クロマチンにより性鑑別した処理胚の正否を、移植し、生産された胎児6例の性判別よりして、4例が正、2例が否の結果を得、胚盤胞のセックス・クロマチンによる産子の性支配の可能性が示唆された。

以上のように本論文は胚盤胞の性鑑別による産子の性支配に関する基礎的要因を詳細に検討し、その間いくつかの新知見を含み、家畜繁殖学の進歩に寄与するところが大きい。よって審査員一同は著者に農学博士の学位を授与される資格を有するものと認定した。