

氏 名(本籍)	あ 阿	べ 部	やす 靖	ゆき 之
学位の種類	博 士 (農 学)			
学位記番号	農 博 第 7 9 5 号			
学位授与年月日	平 成 17 年 3 月 25 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研究科専攻	農学研究科資源生物科学専攻 (博士課程)			
学位論文題目	ウシ未成熟卵母細胞のガラス化保存による生育可能な胚 の作出			
論文審査委員	(主 査)	教 授	佐 藤 英 明	
	(副 査)	教 授	小 原 嘉 昭	
		助教授	佐々田 比呂志	
		助教授	麻 生 久	

論文内容要旨

緒言

産業動物において効率的に優良動物を生産する生殖技術では、生殖細胞(精子および卵子)を凍結保存する技術は重要である。本研究で対象にした卵母細胞は出生後の卵巣内に原始卵胞として多数存在しているが、雌個体が生涯で排卵する卵子の数が限られていることから、卵巣内に数多く存在している卵母細胞を有効利用することは重要な課題である。卵母細胞の凍結保存は、凍結保存した胚の場合には胚移植後得られる産子の性や遺伝形質が凍結保存前にあらかじめ決まっているのに対し、凍結・融解後に任意に遺伝的組み合わせを選択することができ、多目的な応用が可能である。

卵母細胞を凍結保存する場合、第2減数分裂中期(MII)の排卵卵子では、凍結障害として染色体の分散や受精後に第2極体が放出されず倍数性異常を起こす。これに対し、卵巣内に存在する卵核胞(GV)期の卵母細胞では通常、紡錘体・微小管が形成されておらず、染色体は核内に封じ込められており核膜により保護されている。これらのことから、MIIの卵子で見られる染色体および細胞分裂装置の凍結障害はGV期卵母細胞では生じない。しかしながら、凍結保存後GV期卵母細胞を利用するためには体外で成熟培養することが必要であり、この卵成熟に重要な卵丘細胞-卵母細胞間のギャップ結合が凍結により物理的障害を受けることが問題として挙げられる。

凍結保存法の一つとして最近、広く応用されているガラス化法がある。この方法は液体が氷晶を形成せずに固化する物理現象を利用したもので、細胞を液体窒素に直接投入し凍結する超急速冷却法である。本研究で目的としたウシ未成熟(GV期)卵母細胞は、と場由来卵巣より大量に得られることから、短時間で簡易的に処理できる凍結保存法の開発が望まれる。この点でガラス化法は従来の緩慢凍結方法で必要な冷却装置を必要とせず、また、サンプルを短時間で簡易的に処理できることから、この凍結保存法を応用することが有効であると考えられる。しかしながら、ガラス化法では用いる凍結保護物質の濃度を高くすることで氷晶形成を抑えるガラス化現象を誘起するため、凍結保護物質の毒性や高浸透圧による障害を考慮する必要がある。特に、細胞を凍結保存する場合とは異なり、卵母細胞は最終的に産子まで生育する細胞であり、単に凍結後生存すればよいという指標では評価できない。したがって、GV期卵母細胞の凍結保存の可否は凍結保存後、体外成熟・受精・胚培養することで生育可能な胚盤胞期胚を作出することで行わなければならない。

以上の背景下、本研究はGV期卵母細胞をガラス化保存し、保存後生育可能な胚を作出できる、ウシ未成熟卵母細胞の凍結保存法の確立を目的とした。マウス胚で開発された凍結保存法を参考に効率的なガラス化法を確立するために、凍結保護物質への暴露処理、支持体としてのナイロンメッシュ、クライオルーブおよびプルランフィルムの比較、細胞骨格安定剤の効果、さらに用いる凍結保護物質について、細胞へ浸透しガラス化を誘起する細胞浸透性物質および細胞外からガラス化を促進する高分子物質の種類について比較した。最終的に、ガラス化保存したウシ未成熟卵母細胞を融解し、体外成熟・受精・胚培養し作出した胚盤胞期

胚を仮親牛に胚移植し、生育能を検証した。さらに、凍結保存した卵母細胞の質的向上を目指し、凍結後の卵母細胞の卵核胞期核を新鮮卵母細胞に卵細胞質へ注入する、GV 置換法の可能性を検索した。

第1章 凍結保護物質への暴露処理の影響

ガラス化法では細胞毒性を示す凍結保護物質を高濃度で使用しなければならないことから、その影響を軽減するために凍結保護物質への暴露を迅速に行う必要がある。一方、暴露時間の短縮はエチレングリコールのような浸透性の凍結保護物質が十分に細胞内に浸透せず、その結果、細胞外の氷晶形成は抑えられても細胞内の氷晶形成が十分に抑えられない問題が生じる。また、ガラス化保存では保存液が高濃度であることから直接暴露した場合、細胞に急激な圧力がかかり物理的な損傷を与える可能性が高い。解決策の一つとして、マウス胚では段階的に凍結保護物質に暴露することによりガラス化保存に成功した。そこで本章では、凍結保護物質を1段階あるいは段階的に暴露処理しガラス化保存した後の生存性に及ぼす影響を調べた。

ウシ卵巣を仙台食肉処理場で採取後、約 10°C で処理場内に保存し BSE 検査終了後、研究室に持ち帰った。直ちに、卵巣内の未成熟卵母細胞を吸引採取し、成熟培地中で培養した。凍結の支持体としてナイロンメッシュを用い、段階的暴露法では、1段階目にエチレングリコール濃度 10% 溶液に7分間暴露し、2段階目にエチレングリコール濃度 20% 溶液に2分間暴露し、3段階目にエチレングリコール濃度 40% 溶液 (EFS40) に1分間暴露し液体窒素に投入しガラス化保存した。1段階暴露法では、EFS40 に1分間暴露しガラス化保存した。ガラス化保存後、37°C の 0.5 M スクロース添加 PB1 溶液、0.25 M スクロース添加 PB1 溶液、0.125 M スクロース添加 PB1 溶液に1分間ずつ浸した後、PB1 溶液へと移し卵母細胞をナイロンメッシュから取り外し、5分後成熟培地中で培養した。22~23 時間培養後、媒精および発生培養を行った。

1段階暴露法では、卵母細胞の形態に激しい損傷が見られ、融解後の成熟率は未凍結の成熟率と比べ有意に低かったのに対し、段階的暴露法では、成熟率は未凍結のものと同程度であった (Fig. 1) (Table 1)。体外受精率も段階的暴露法で凍結した卵母細胞では、1段階暴露法のものより高い傾向を示し、発生培養後胚盤胞期胚が得られた (Fig. 2) (Table 2)。これらの結果から、段階的暴露法により高い体外成熟率、受精率および発生率が得られ、ウシ未成熟卵母細胞のガラス化保存において有効であることが示された。

第2章 凍結保存した未成熟卵母細胞の卵細胞質の特徴

1. 卵細胞質の透過型電子顕微鏡観察

第1章において、凍結保護物質へ段階的に暴露することで凍結した未成熟卵母細胞から胚盤胞期胚が得られたが、成熟率が同程度だったのに対し受精率および胚盤胞期への発生率はいずれも未凍結のものよりも有意に低かったことから、凍結した未成熟卵母細胞の品質低

下が考えられた。そこで、前述の方法でガラス化・融解した未成熟卵母細胞のミトコンドリアを透過型電子顕微鏡により観察した。その結果、1段階暴露法で凍結した卵母細胞ではミトコンドリア外膜が凍結障害を受け、破壊されている像が観察されたのに対して、段階的暴露法で凍結した卵母細胞では正常な構造を保ったミトコンドリア像が観察された(Fig. 3)。

2. 活性型ミトコンドリアの分布および紡錘体の形成能

凍結保存した未成熟卵母細胞の卵細胞質の特性を調べる目的で、活性型ミトコンドリアの分布および紡錘体の形成能を観察した。ガラス化・融解後に成熟培養を行い、第一極体が確認された卵母細胞を用いた。活性型ミトコンドリアの分布は0.1%ローダミン-123で、紡錘体形成能は α -チューブリン抗体でそれぞれ蛍光染色後、レーザー顕微鏡で観察し解析した。

活性型ミトコンドリアの分布は、卵細胞質表面に均一に分布するパターン(均一型)、凝集して分布するパターン(凝集型)、さらに蛍光強度が弱いパターン(減少型)の3つの蛍光染色像に分類された(Fig. 4)。未凍結区に比べ凍結区では、均一型の割合が低く、活性型ミトコンドリア数が減少を示す割合が高かった(Table 3)。そこで、蛍光顕微鏡下で活性型ミトコンドリアを観察し均一型と凝集型をそれぞれ個別に体外受精と発生培養を行った結果、均一型を示した卵母細胞で胚発生率が高かった(Table 4)。紡錘体形成については、中期染色体が中央に位置し紡錘体が両極まで明瞭に観察される像を示した正常の割合が凍結区では未凍結区に比べ低く、異常な形態のものが多く観察された(Fig. 5)(Table 5)。これらの結果から、ガラス化後の未成熟卵母細胞は十分な核成熟能は有するものの卵細胞質成熟能が低く、それがその後の分割率および胚発生率の低い原因である可能性が示された。

第3章 凍結保存法の改良

1. 3種類の支持体で凍結保存した未成熟卵母細胞の成熟能の比較

ガラス化現象を起こすためには温度の急激な低下を必要とすることから、細胞を含む凍結保存液量を可能な限り最少量に抑えることが重要である。特に、未成熟卵母細胞をガラス化保存する場合、凍結後の卵成熟を維持するためには卵丘細胞-卵母細胞複合体(COCs)の状態ではガラス化保存する必要があり、卵母細胞のみと比べて容積が大きく凍結保存液の量が多くなり、ガラス化に必要な急激な温度変化割合が減少する可能性が高い。さらに、ガラス化のために用いられる凍結保護物質のモル濃度が高く細胞毒性を最小限にするためには、細胞を暴露する時間を短くする必要がある。そこで、ウシ未成熟卵母細胞のガラス化保存のための支持体を検索することを目的に、ナイロンメッシュ、クライオループおよびプルランフィルムを比較した。

COCsをそれぞれ40個/ナイロンメッシュ、5個/クライオループおよび5個/プルランフィルムづつ載せ、ガラス化保存後第1章の方法で融解、体外成熟を行った。その結果、ナイロンメッシュとクライオループ区で成熟率が高かった(Table 6)。処理するCOCs数を増やした場合、ナイロンメッシュでは余分な凍結保存液を除去できるのに対して、クライオループでは除去することはできなかった。これらのことから、ウシ未成熟卵母細胞のガラス化保存の支持体として

ナイロンメッシュが有効であることが示された。

2. 細胞骨格安定剤の効果

細胞骨格安定化物質として、微小管構造を安定化させるサイトカラシン B やタキソールが利用されている。これらの物質を凍結保存液へ添加することにより、ガラス化後の未成熟卵母細胞の成熟への影響を調べた。

細胞骨格安定剤による処理として、サイトカラシン B 7.5 $\mu\text{g/ml}$ またはタキソール 1 μM を添加した成熟培地中で 45 分間培養し、細胞骨格安定剤を添加した凍結保存液に暴露しガラス化保存した。保存後、前章と同様の方法で体外成熟培養・受精・胚培養した。その結果、タキソール処理区でサイトカラシン B 処理区に比べ、分割率や胚盤胞期への発生率では高い傾向を示したものの、いずれの区でも発生率は低く、凍結法の改良としては十分な効果が得られなかった (Table 7)。

3. 凍結保存液の改良

細胞へ浸透する凍結保護物質として、エチレングリコール (EG) を用いたが、浸透性の物質として他に、ジメチルスルオキシド (DMSO) が広く用いられている。DMSO は EG に比べ、粘性が低く細胞への浸透性が高い。一方、細胞外から脱水効果を示す高分子物質は、ガラス化現象を促進するために凍結保護物質として用いられている。様々な高分子物質があり、性質や分子量の違いによりガラス化温度や融解温度などに影響を生じる。そこで、第1章で用いた EFS40 を基礎保存液として EG と DMSO、さらにフィコール-70、デキストランおよびポリビニルピロリドンの高分子物質について比較した。

その結果、細胞へ浸透する凍結保護物質のうち、凍結後に作出した胚盤胞期胚は EG 区のみで得られ、EG + DMSO 区や DMSO 区では得られなかった。8細胞期への発生率では、DMSO 区が EG 区や EG + DMSO 区よりも低く、DMSO の毒性の影響が示された (Table 8)。これらの結果から、EG が DMSO よりも有効であることがわかった。3種類の高分子物質を比較した結果、分割率はすべての凍結区において未凍結区に比べ低く、凍結区間に有意差は見られなかった。胚盤胞期への発生率はデキストラン区で他の 2 つの区に比べ高い傾向を示した (Table 9)。

第4章 胚移植試験による生育能の検証

前章までの方法でガラス化保存した未成熟卵母細胞から形態的に良好な胚盤胞期胚が得られたことから、これらの胚の生育能を調べるために仮親へ胚移植し、産子獲得を行った。

前章までの方法で作出したガラス化保存した未成熟卵母細胞由来の新鮮胚、合計4個をそのまま、3頭の仮親へ胚移植した。さらに、作出した胚を未成熟卵母細胞と同様のガラス化法で凍結保存した胚を合計5個、3頭の仮親へ胚移植した。仮親として、ホルスタイン種または黒毛和種未経産牛を用い、発情開始日から7日後に胚移植した。その結果、新鮮胚を移植した仮親のうち、ホルスタイン種1頭が妊娠し、妊娠288日目に体重32kgのメス黒毛和牛、1頭を分娩した (Fig. 6) (Table 10)。この結果から、ウシ未成熟卵母細胞をガラス化保存後に作出

した胚が生育可能であることが示された。

第5章 凍結保存した卵母細胞のGV置換

前章までの結果、未成熟卵母細胞をガラス化保存後作出した胚盤胞期胚が産子まで生育することが示された。しかしながら、凍結保存後の体外成熟率は未凍結のものと同等であったが、その後の分割率や胚盤胞期への発生率は有意に低かった。その原因として、凍結・融解の過程で卵細胞質、特にミトコンドリアが障害を受け細胞質成熟能が低下していることが示唆された。さらに、第3章で行った実験で種々の物質を添加することである程度改良が得られたものの、既知の有効な物質を添加する方法では限界があることが示された。そこで本章では、卵母細胞の品質を改善する根本的な方法として、マイクロマニピュレーションにより凍結融解後の卵母細胞の卵核胞を健全な卵細胞質に注入することで品質の高い再構築卵を作製する、GV置換方法を確立することを目的とした。

健全な卵細胞質を提供するレシピエント卵細胞質を準備するために、第2章と同様の方法で得られたCOCsから機械的に卵丘細胞を除去した後マイクロマニピュレーションを行い、卵核胞を除去したレシピエント卵を作製した。一方、凍結した卵母細胞から同様の方法で卵核胞を含むドナー核を作製し、レシピエント卵の囲卵腔に注入した。続いて、再構築胚に100~110 V/mm、60 μ secの直流電流を1回付与し電気融合した。融合後、再構築卵を第2章と同様の方法で体外成熟した。その結果、第2減数分裂中期まで成熟した卵母細胞を作出できた(Table 11)。

以上、本研究で得られた成果を総括すると、

1. ウシ未成熟卵母細胞をガラス化保存するうえで凍結保存液としてEFS40を用い、段階的に暴露処理することで生育可能な胚が作出できる
2. ガラス化保存後体外で成熟培養することを考慮すると、卵丘細胞-卵母細胞複合体として多数のものを処理するための支持体としてナイロンメッシュが有効である
3. 凍結保護物質として、エチレングリコールおよびスクロール由来の高分子物質が有効である
4. マイクロマニピュレーションによりGV置換を行い、成熟能を有する再構築卵母細胞を作製できる

ことを明らかにした。

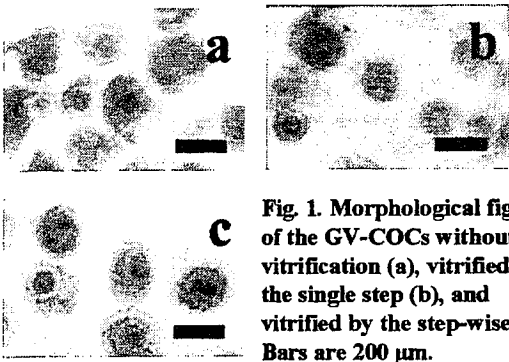


Fig. 1. Morphological figures of the GV-COCs without vitrification (a), vitrified by the single step (b), and vitrified by the step-wise (c). Bars are 200 μ m.

Table 1. Subsequent in vitro maturation of bovine GV oocytes vitrified by either single step or step-wise exposure

Treatment	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes reached at		
		GV	GVB	M II
Non-vitrified	167	8 (4.8) ^a	41 (24.6) ^c	118 (70.7) ^e
Single step	93	36 (38.7) ^b	36 (38.7) ^d	21 (22.6) ^f
Step-wise	145	7 (4.8) ^a	45 (31.0) ^{cd}	93 (64.1) ^e

GV: germinal vesicle, GVB: germinal vesicle break down, MII: metaphase II.

^{a-f} Values with different superscripts in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

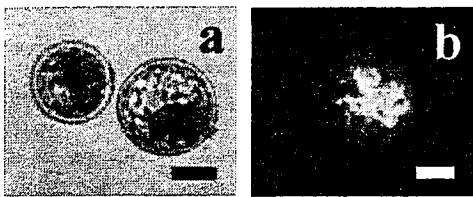


Fig. 2. Blastocysts derived from vitrified GV oocytes. Blastocysts were observed under the normal light (a), and under the UV light (b) after staining with Hoechst 33342.

Table 2. Subsequent in vitro development after IVMFC of bovine GV oocytes vitrified by either single step or step-wise exposure

Treatment	No. (%) of oocytes cultured	No. (%) of eggs reached at			
		≥ 2 -cell	≥ 4 -cell	≥ 8 -cell	Blastocyst
Non-vitrified	118	82 (69.5) ^a	50 (42.4) ^d	22 (18.6) ^f	11 (9.3) ^l
Single step	120	25 (20.8) ^b	8 (6.7) ^c	2 (1.7) ^h	0 (0) ^j
Step-wise	205	54 (26.3) ^c	42 (20.5) ^f	21 (10.2) ^g	3 (1.5) ^k

^{a-l} Values with different superscripts in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

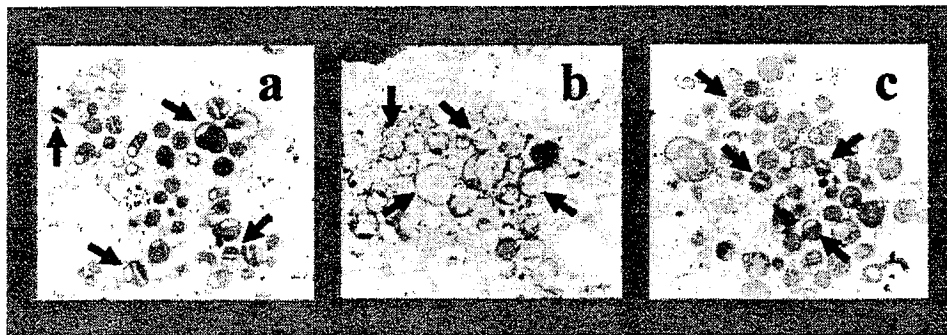


Fig. 3. Transmission electron micrographs of bovine GV oocytes non-vitrified (a) and vitrified by the single step (b) or step-wise (c). Note the difference of the figures of mitochondria (arrows). Original $\times 3,200$.

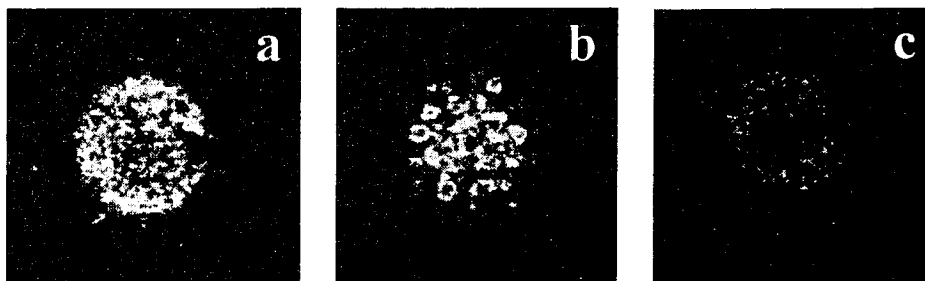


Fig. 4. Type of morphology of active mitochondria in mature oocytes. The oocytes were stained immunocytochemically with rhodamine-123 to visualize active mitochondria (green). Type 1: Mitochondria are uniformly distributed (a). Type 2: the presence of mitochondria is spotted (b). Type 3: A weak fluorescence is observed (c).

Table 3. Effect of vitrification on the morphology of active mitochondria in bovine oocytes after in vitro maturation*

Treatment	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes with		
		Type 1	Type 2	Type 3
Non-vitrified	32	19 (59.4) ^a	10 (31.3)	3 (9.4) ^a
Vitrified	35	12 (34.3) ^b	11 (31.4)	12 (34.3) ^b

* The type of morphology is referred to Fig. 4.

^{a, b} Values with different superscripts in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

Table 4. Subsequent in vitro development after IVMFC of bovine oocytes with different morphology of active mitochondria

Treatment	Morphology of mitochondria	No. (%) of oocytes cultured	No. (%) of eggs reached at			
			≥2-cell	≥4-cell	≥8-cell	Blastocyst
Non-vitrified	Type 1	39 (57.4) ^a	9 (23.1) ^d	9 (23.1) ^f	7 (17.9)	4 (10.3)
	Type 2	29 (42.6) ^a	1 (3.4) ^e	1 (3.4) ^g	1 (3.4)	0 (0)
Vitrified	Type 1	69 (80.2) ^b	15 (21.7) ^d	8 (11.6) ^{fg}	5 (7.2)	1 (1.4)
	Type 2	17 (19.8) ^c	3 (17.6) ^{de}	2 (11.8) ^{fg}	0 (0)	0 (0)

^{a-g} Values with different superscripts in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

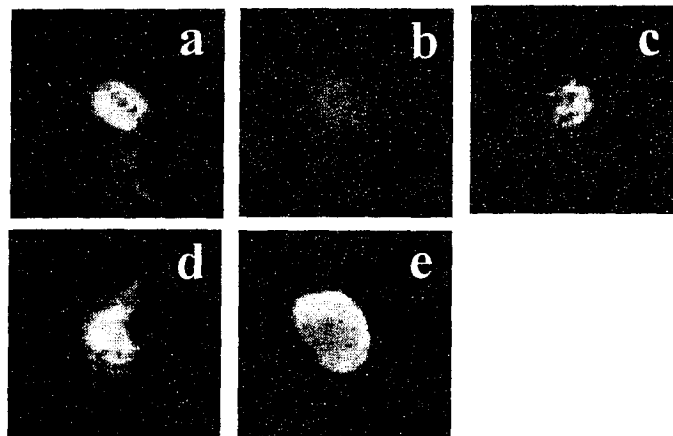


Fig. 5. Microtubule formation and chromosome organization in bovine oocytes. The oocytes were stained immunocytochemically with an anti- α -tubulin monoclonal antibody to visualize the spindle (green), and counterstained with propidium iodide to visualize the chromosomes (red). Normal spindles and chromosomes (a). Microtubule reduction on spindles (b). Abnormal chromosomal organization (c). Abnormal spindle structures and chromosomes (d, e).

Table 5. Effect of vitrification on the morphology of microtubular organization of oocytes*

Treatment	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes with		
		Normal	Reduced	Abnormal
Non-vitrified	32	21 (65.6)	9 (28.1)	2 (6.3)
Vitrified	28	14 (50.0)	4 (14.3)	7 (25.0)

* The type of microtubule formation and chromosome is referred to Fig. 5.

Table 6. Subsequent in vitro maturation of bovine oocytes vitrified using nylon mesh, cryoloop or pullulan film

Treatment	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes reached at		
		GV	GVBD	M II
Non-vitrified	30	2 (6.7)	5 (17.7)	22 (73.3) ^a
Nylon mesh	145	7 (4.8)	45 (31.0)	93 (64.1) ^{ab}
Cryoloop	50	3 (6.0)	7 (14.0)	38 (76.0) ^a
Pullulan film	49	4 (8.2)	9 (18.4)	28 (57.1) ^b

GV :germinal vesicle, GVBD :germinal vesicle break down, MII :metaphase II.

^{a,b} Values with different superscripts in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

Table 7. Subsequent in vitro development after IVMFC of bovine oocytes vitrified with or without cytoskeleton stabilizer

Treatment	Cytoskeleton stabilizer	No. (%) of oocytes cultured	No. (%) of eggs reached at			
			≥2-cell	≥4-cell	≥8-cell	Blastocyst
Non-vitrified	Non-treatment	122	61 (50.0) ^{ab}	47 (38.5) ^{de}	35 (28.7) ^f	18 (14.8) ^h
	Cytochalasin-B	53	24 (45.3) ^{ab}	19 (35.8) ^{de}	9 (17.0) ^{fg}	2 (3.8) ⁱ
	Taxol	25	15 (60.0) ^b	12 (48.0) ^d	6 (24.0) ^f	3 (12.0) ^b
Vitrified	Non-treatment	101	42 (41.6) ^{bc}	24 (23.8) ^c	13 (12.9) ^e	7 (6.9) ^j
	Cytochalasin-B	101	30 (29.7) ^c	19 (18.8) ^c	12 (11.9) ^e	1 (1.0) ^j
	Taxol	61	27 (44.3) ^{ab}	13 (21.3) ^c	12 (19.7) ^{fg}	3 (4.9) ⁱ

^{a-i} Values with different superscripts in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

Table 8. Subsequent in vitro development after IVMFC of bovine oocytes vitrified with ethylen glycol or dimethyl sulfoxide

Treatment	No. (%) of oocytes cultured	No. (%) of eggs reached at			
		≥2-cell	≥4-cell	≥8-cell	Blastocyst
Non-vitrified	70	34 (62.5) ^a	23 (50.0) ^c	13 (28.1) ^e	9 (11.7) ^e
EG	128	30 (23.4) ^b	25 (19.5) ^d	14 (10.9) ^f	2 (1.7) ^h
EG + DMSO	109	30 (27.5) ^b	23 (21.1) ^d	11 (10.1) ^f	0 (0) ^h
DMSO	72	16 (22.2) ^b	9 (12.5) ^d	3 (4.2) ^f	0 (0) ^h

EG: ethylen glycol, DMSO: dimethyl sulfoxide.

^{a-h} Values with different superscripts in same column are significantly different ($P < 0.05$).

Table 9. Subsequent in vitro development after IVMFC of bovine oocytes vitrified with ficoll, dextran or polyvinylpyrrolidone

Treatment	No. (%) of oocytes cultured	No. (%) of eggs reached at			
		≥ 2-cell	≥ 4-cell	≥ 8-cell	Blastocyst
Non-vitrified	34	17 (50.0) ^a	9 (26.5)	6 (17.6)	3 (8.8)
Ficoll	109	56 (51.4) ^a	36 (33.0)	23 (21.1)	9 (8.3)
Dextran	70	30 (42.9) ^{ab}	21 (30.0)	14 (20.0)	6 (8.6)
Polyvinyl-pyrrolidone	48	17 (35.4) ^b	13 (27.1)	7 (14.6)	2 (4.2)

^{a-c} Values with different superscripts in the same column are significantly different ($P < 0.05$).



Fig. 6. A calf of Japanese Black female weighting 32kg. She was born at 288 days after embryo transfer of a fresh blastocyst derived from bovine GV oocytes vitrified.

Table 10. Results of embryo transfer of fresh and vitrified blastocysts derived from bovine GV oocytes vitrified

Treatment of blastocysts	No. of recipients	No. of embryos transferred*	No. of calves born
Fresh	3	4	1
Vitrified	3	5	0

* Embryos were transferred with one or two embryos per recipient.

Table 11. Subsequent in vitro maturation of reconstructed oocytes by GV exchange

Karyo-oocytes	No. of oocytes manipulated	No. of oocytes fused (%)	No. of oocytes cultured (%) ^a	No. of oocytes matured (%) ^b
Fresh	95	68 (71.6)	39 (57.4)	22 (56.4)
Vitrified	40	26 (65.0)	23 (88.5)	11 (47.8)

^a Percentage of oocytes cultured of oocytes fused.

^b Percentage of oocytes matured of oocytes cultured.

論文審査結果要旨

産業動物において効率的に優良動物を生産する生殖技術では、生殖細胞（精子および卵子）を凍結保存する技術は重要である。特に、雌個体においては、生涯で排卵する卵子の数が限られていることから、卵巣内に数多く存在している未成熟卵母細胞を有効利用することは重要な課題である。

凍結保存法の一つとして、ガラス化法がある。これは、細胞を液体窒素に直接投入し凍結する方法で、短時間で簡易的に処理できる。しかしながら、ガラス化法では高濃度の凍結保護物質を用いるため、凍結保護物質の毒性や高浸透圧による障害を考慮する必要がある。特に、細胞を凍結保存する場合とは異なり、卵母細胞は最終的に産子まで生育する細胞であり、単に凍結後生存すればよいという指標では評価できない。したがって、GV期卵母細胞の凍結保存の可否は凍結保存後、体外成熟・受精・胚培養（IVMFC）することで生育可能な胚盤胞期胚を作出することで行わなければならない。

そこで本研究はウシ未成熟卵母細胞のガラス化保存法を確立することを目的とし、凍結保護物質への段階的暴露処理、支持体の比較、細胞骨格安定剤の効果、さらにガラス化保存液の凍結保護物質について、複数の細胞浸透性物質および高分子物質の種類を比較した。最終的に、ガラス化保存したウシ未成熟卵母細胞をIVMFCすることで胚盤胞期胚を作出し、仮親牛に胚移植し、生育能を検証することで確立したガラス化保存技術の正当性を評価した。概要は次の通りである。

(1) ウシ未成熟卵母細胞をガラス化保存するうえで凍結保存液としてEFS40を用い、段階的に暴露処理することで個体にまで生育可能な胚が作出できる。(2) ガラス化保存後体外で成熟培養することを考慮すると、卵丘細胞-卵母細胞複合体として多数のものを処理するための支持体としてナイロンメッシュが有効である。(3) 凍結保護物質として、エチレングリコールおよびスクロース由来の高分子物質が有効である。(4) マイクロマニピレーションによりGV置換を行い、成熟能を有する再構築卵母細胞を作製できる。

以上のことは応用動物科学において高く評価される。よって博士（農学）の学位を授与できるものと判定した。