

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲 先 第 366 号	氏 名	NGUYEN THI NHIEN
審査委員	主査 長宗秀明 副査 宇都義浩 副査 音井威重		
学位論文題目 Studies on preservation of porcine zygotes for embryo production by interspecies somatic cell nuclear transfer (異種体細胞クローン胚作出のための豚配偶子の保存に関する研究)			
審査結果の要旨 <p> 緩慢冷却法やガラス化保存法などの凍結保存技術によるブタ胚の長期保存は、任意の日時および場所で融解し、移植および胚発生等の研究材料として使用できる。しかし、ブタ胚は低温感受性が高く融解後の生存性が低下することから、一時的（24 時間）な保存により胚を有効活用することが提案されている。さらに、液体窒素を使用しない胚の保存はより簡易であり、特別な機器を使用しない利点もある。一方、胚の凍結保存方法としてガラス化保存法は、融解後の生存性が緩慢冷却法に比較して高いことから、遺伝子導入または体細胞クローン胚の初期胚での凍結方法として用いられてきた。近年、透明体を除去した Handmade cloning による体細胞クローン技術が発展してきており、透明体の無い胚の生存性の高い凍結方法も望まれるようになった。さらに、この体細胞クローン技術を用いて、希少野生動物の複製を作成する試みもあり、核となる体細胞とレシピエントとなる卵母細胞の種が異なる異種間での体細胞クローン胚による作成が試みられている。 </p> <p> そこで本研究は、効率的な異種間でのクローン胚作出のための豚配偶子の保存に関する検討を主に行った。最初に、ブタ受精卵を 25℃で 24 時間保存するための保存液として、100%ウシ胎児血清（FBS）、BSA 含有 TCM 199 および 100%ブタ卵胞液（pFF）を用い、保存液へのクロロゲン酸（CGA）添加効果を評価した。その結果、ブタ 1 細胞期胚の保存液として、100%FBS が BSA 含有 TCM 199 よりも優れていることを示し、さらに、100%FBS への 50 μM CGA 添加が 24 時間保存後の胚発育に効果的であることを明らかにした。次に、Handmade cloning に用いるために透明帯の除去がガラス化保存後の胚発育に与える影響を検討した。まず、透明帯除去胚の Single 培養に最適の培養液量を検討した結果、15 μL が最適であることが判明した。さらに、ガラス化前に透明体を除去しても、胚発生や胚盤胞の品質に影響を及ぼさないことを明らかにしたほか、異種間体細胞クローンとして体細胞にゾウを用い、除核したブタ卵母細胞に移植・融合した結果、69%が融合し、わずかであるが 0.6%が胚盤胞に発育し、ゾウ・ブタ異種間での融合により胚が発育することを明らかにした。 </p> <p> 以上本研究は、安定的に且つ効率的に異種間でのクローン胚作出のため、豚配偶子を保存するための条件を明らかにしたものであり、本論文は博士（工学）の学位授与に値するものと判定する。 </p>			