

氏名	三好和陸
授与した学位	博士
専攻分野の名称	農学
学位授与番号	博甲第1494号
学位授与の日付	平成8年3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科生物資源科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文題目	Studies on culture of rat 1-cell embryos in a chemically defined medium (限定培地におけるラット1-細胞期胚の培養に関する研究)
論文審査委員	教授 丹羽 皓二 教授 田辺 昭 教授 佐藤 勝紀 教授 内田 仙二 教授 山本 格

学位論文内容の要旨

ラット1細胞期胚の体外培養は困難であったが、最近、リン酸およびグルコースを含まない限定培地を用いることにより、低率ながら胚盤胞にまで発生し得ることが報告された。本研究では、ラット1-細胞期胚のより適切な培養条件を決定するために、幾つかの要因が胚発生におよぼす影響について検討した。その結果、2-細胞期における発生停止にリン酸が関与していることを明らかにした。また、浸透圧、グルコースおよびアミノ酸はいずれも胚盤胞への発生において重要な要因であることを見出し、1-細胞期胚の90%を胚盤胞にまで発生させ得る限定培地(mR1ECM)を確立した。mR1ECM中で培養することにより得られた桑実期胚および胚盤胞を移植後に胎仔が得られたことから、これらの胚が正常な発生能力を維持していることが証明された。mR1ECMを用いて、リン酸は8-細胞期に達する前の胚発生は阻害するが、8-細胞期胚の胚盤胞形成は促進することを明らかにした。mR1ECMは体外受精卵の培養にも応用でき、培養後に得られた桑実期胚および胚盤胞は生存産仔にまで発生し得ることを証明した。

論文審査結果の要旨

体外培養下では、多くの哺乳動物の初期胚が種特異的に一定の段階で発生を停止することが観察されてきた。最近、ハムスターにおいて、2-細胞期での発生停止にリン酸(P)およびグルコース(G)の関与していることが明らかにされ、これらの成分を含まない限定培地(HECM-1)が開発された。本研究は、同様に2-細胞期で発生停止を示すラット1-細胞期胚の培養系を確立する目的で行われたものであり、次のような新しい知見が得られた。

体内受精による1-細胞期胚をアミノ酸除去HECM-1(mHECM-1)で培養した結果、0.4 mM-P (NaH_2PO_4)の存在下では、2-細胞期の段階で発生が完全に停止した。P無添加の場合には、G(5.0 mM)の無添加よりも添加培地において高い(49%)胚盤胞形成率が得られた。Pは、0.1 μM 以上の濃度になると濃度依存的に発生阻害作用を強めた。また、Gの発生促進作用も濃度依存的であり、7.5-10.0 mMの範囲で胚盤胞形成が促進された。一方、アミノ酸を除去したmHECM-1ではHECM-1と比較して、浸透圧が約30 mOsm低下している。そこで、培地の浸透圧をNaCl濃度により調整した結果、従来用いられている培地の浸透圧よりもはるかに低い浸透圧(244 mOsm)において高い発生率(61%)が得られた。この場合、NaCl濃度の変化よりも浸透圧そのものが主要因になっていることが、浸透圧をソルビトールにより調整した培地(一定濃度のNaClを含む)を用いた実験からも確認された。ついで、これらの成績に基づいて改良した限定培地(RIECM)を用いて、12種類の必須アミノ酸群、7種類の非必須アミノ酸群、およびグルタミンを種々の組み合わせで添加した結果、幾つかの組み合わせにおいて胚盤胞形成率は飛躍的に高くなった(80-90%)。20種類のアミノ酸を添加した培地(mRIECM)において得られた桑実期胚あるいは初期胚盤胞を偽妊娠ラットに移植した結果、その一部は正常な末期胎仔にまで発育した。mRIECMを用いた別の実験から、8-細胞期以降の胚の発生には、Pはむしろ促進作用を有すること、この培地は体外受精胚にも適用され得ることも明らかにされた。

これらの知見は、初期胚における発生機構の解明およびラットにおける種々の発生工学的研究の進展に大いに寄与するものである。本学位審査会は、本論文の内容および参考論文を総合的に審査し、本論文が博士(農学)の学位に値するものと判定した。