

遠心処理により除核した体外成熟卵と第二減数分裂中期核を融合させて作出したブタ再構築卵の発生能

前泊 直樹¹, 菊地 和弘², 金子 浩之², 柏崎 直巳¹

¹麻布大院, ²農業生物資源研

核置換とは卵の受精後の胚発生を支持する能力(胚発生能)が不十分な卵母細胞に含まれる核を, 胚発生能を十分に有していると考えられる除核した細胞質へ移植する技術である。本研究では顕微操作を必要としない, 遠心・融合によるブタ核置換法の確立を目的に, この方法により作出した再構築卵の電気刺激による単為発生処理後の雌性前核形成能および胚盤胞への発生能を評価した。屠場由来の未経産ブタ卵巣より卵丘細胞-卵母細胞複合体を採取し, 体外成熟培養(Kikuchi *et al.*, 2002)を行った。体外成熟培養44時間後に第一極体を放出した卵を成熟卵とし実験に供した。プロナーゼ処理にて透明帯を除去し, 濃度の異なるパーコール溶液(7.5, 30, 45%)を用い, 遠心処理を行うことで成熟卵の細胞質を小片化させた。これらの細胞質小片をヘキスト染色後, 蛍光顕微鏡下で核板を含む細胞質小片と含まない細胞質小片に分けた。その後, 核板を含む細胞質小片と含まない細胞質小片を電気融合処理(1.5 kv/cm, 20 μ sec, 1回)により細胞融合させ, 再構築卵を作出した。さらに, 細胞融合1時間後にこの電気融合処理と同条件にて, 単為発生誘起処理を行い, サイ

トカラシンBに2時間感作させた。一部は引き続き10時間培養を行い, 再構築卵の雌性前核形成能を, 残りは6日間培養し胚盤胞への発生能を評価した。なお, 透明帯を除去した成熟卵を対照区とした。雌性前核形成率は, 核置換を行なわなかった対照区では $42.0 \pm 9.9\%$ で, 核置換区では $69.5 \pm 5.9\%$ であり, 対照区および核置換区の両区間に有意な差が認められた($P < 0.05$)。また, 胚盤胞への発生率は, 対照区では $26.4 \pm 6.8\%$ (13/47)で, 核置換区では $1.6 \pm 1.6\%$ (1/45)であり, 有意な差が認められた($P < 0.05$)。胚盤胞の細胞数は, 対照区では平均44.4個で, 核置換区では17.3個であった。以上の結果から, 遠心・融合による核置換により作出した再構築卵は, 雌性前核形成能および胚盤胞への発生能を有することが認められた。このことから, 顕微操作せずに遠心・融合による核置換を行い, ブタ再構築卵を作出することが可能であることが示された。しかし, この再構築胚の胚盤胞への発生率が低いことから, 電気融合処理, 活性化誘起や体外培養などの条件の更なる改善が必要である。