

学 位 論 文 要 旨

氏名 谷山 敦

題 目： 牛胚移植における受胎率向上のためのアシストハッチング処理に関する研究

論文要旨：

本研究は、牛受精卵移植における低品質胚の受胎率の向上による有効活用を目的とした。黒毛和種供胚牛の Poor 胚 (30%以上変性細胞があるもの) の採取状況は、1 頭当たりの総胚数 18.0 個、正常胚数は 10.8 個で、低品質胚が 2.0 個を占めた。胚の品質別の新鮮胚移植における受胎率は、Good 胚：78.3%、Fair 胚:43.8%、Poor 胚:23.1%と、品質が低下すると受胎率が低下する傾向が確認された。

さらに低品質胚の受胎率を改善するためアシストハッチング処理として、マイクロニードルを用いた透明帯を切開する処理は、細胞塊のダメージがなく短時間で容易に切開が可能であり、Poor 胚新鮮移植における受胎率は、44.4%と改善がみられ、さらに 2 胚移植を組み合わせることにより受胎率は 59.8%と高い受胎率が得られた。また倒立顕微鏡に替えて実態顕微鏡を用いた方法でも同様の成績が得られた。さらに流産率、双子率も含めて生産効率([産子数/受胎数]×受胎率)を算出すると 1 胚移植では処理区:38%、無処理区:23%、2 胚移植では処理区:63%、無処理区:35%となり、透明帯切開処理による生産効率の改善がみられた。

次にタンパク質分解酵素であるプロナーゼを用いた透明帯菲薄化処理は、体外受精由来桑実胚の培養試験により、新鮮胚及び凍結胚の胚盤胞期への発生率に悪影響を与えず、胚のハッチング割合を有意に向上させた。さらに体内受精胚新鮮移植において Poor 胚において無処理区 27.5%に対しプロナーゼ区が 47.3%と有意に受胎率が向上した。

以上よりアシストハッチング処理は、低品質胚の有効活用技術の一助となると思われる。また、プロナーゼによるアシストハッチング処理は、畜産現場の採胚施設において特別な器材や技術を必要としない簡易な方法であり、受胎率向上に有効な方法である。

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	谷 山 敦
審 査 委 員	主 査：山口大学 教授 田 浦 保 穂
	副 査：鹿児島大学 教授 窪 田 力
	副 査：山口大学 教授 音 井 威 重
	副 査：鹿児島大学 准教授 高木 光 博
	副 査：山口大学 准教授 谷 健 二
題 目	牛胚移植における受胎率向上のためのアシストハッチング 処理に関する研究
<p>審査結果の要旨：</p> <p>胚移植(ET)技術は、現在では牛の繁殖技術方法として確立され、優秀な子牛の生産や牛群の改良、種雄牛造成、乳用牛を用いた黒毛和種子牛生産など、畜産農家において有効に活用されている。ET技術には、採胚技術と移植技術があり、前者には過剰排卵処理技術や胚の鑑別および凍結保存技術、後者には受胚牛の選別や胚の注入技術がある。ET技術による効率的な子牛生産のためには受胎率の高位安定が重要であり、受胎率を左右する要因としては、胚の品質、保存状況、受胚牛の状態、移植技術の差が考えられる。本論文では、その中の 1 つの要因である胚の品質に着目し、牛ETの受胎率向上を目的に、アシストハッチング(補助孵化)処理の活用、特に低品質胚における効果を検証した。アシストハッチング処理としては、畜産現場での活用を想定し、出来るだけ低コストで簡易な方法として、実体顕微鏡を用いたマニピュレーターによる透明帯切開処理およびプロナーゼを用いた透明帯の菲薄化処理の効果を検証した。</p> <p>第1章での牛ETにおける本研究の背景と目的について述べたのち、第2章では民間の採胚施設における採胚成績、特に低品質胚の採取状況について分析した。その結果、黒毛和種供胚牛の Poor 胚(30%以上変性細胞があるもの)の採取状況は、1 頭当たりの総胚数 18.0 個、正常胚数は 10.8 個で、低品質胚が 2.0 個を占めた。胚の品質別の新鮮胚移植における受胎率は、Good 胚:78.3%、Fair 胚:43.8%、Poor 胚:23.1%と、品質が低下すると受胎率が低下する傾向が確認された。</p> <p>第3章では胚移植における胚品質と受胎率の関係、さらにマニピュレーターを用いたアシストハッチング処理(透明帯切開)の効果を新鮮胚移植において検証した。その結果、低品質胚の受胎率を改善するためアシストハッチング処理として、マイクロニードルを用いた透明帯を切開する処理は、細胞塊のダメージがなく短時間で容易に切開が可能であり、Poor 胚新鮮移植における受胎率は、44.4%と改善がみられ、さらに 2 胚移植を組み合わせることにより受胎率は 59.8%と</p>	

(別紙様式第 10 号)

高い受胎率が得られた。また倒立顕微鏡に替えて実体顕微鏡を用いた方法でも同様の成績が得られた。さらに流産率、双子率も含めて生産効率([産子数/受胎数]×受胎率)を算出すると 1 胚移植では処理区：38%，無処理区：23%，2 胚移植では処理区：63%，無処理区：35%となり、透明帯切開処理による生産効率の改善がみられた。

第4章では簡易な方法としてプロナーゼを用いた処理(透明帯菲薄化)の効果を透明帯切開処理の効果も合わせて、新鮮胚移植に加え凍結胚移植においても検証した。その結果、タンパク質分解酵素であるプロナーゼを用いた透明帯菲薄化処理は、体外受精由来桑実胚の培養試験により、新鮮胚および凍結胚の胚盤胞期への発生率に悪影響を与えず、胚のハッチング割合を有意に向上させた。さらに体内受精胚新鮮移植において Poor 胚の無処理区 27.5%に対しプロナーゼ区が 47.3%と有意に受胎率が向上した。

以上の結果より、透明帯切開や透明帯菲薄化などのアシストハッチング処理法は、牛の低品質胚の有効活用技術の一助となることが示唆された。特に後者のプロナーゼによるアシストハッチング処理は、畜産現場の採胚施設において特別な器材や技術を必要としない簡易法であり、獣医学に大いに貢献するものと期待された。従って、本論文は、博士(獣医学)の学位論文として十分な価値を有するものと判定した。