

学 位 論 文 要 旨

氏名 森田 康 広

題 目：ウシおよびブタにおける未成熟卵母細胞からの効率的な雌胚作出に関する研究

論文要旨：

ウシやブタなどの雌飼養が重要な家畜において、雌胚および雌産子の効率的な獲得は農家経営の安定や優良な遺伝形質の保存のために重要である。

本研究において、(研究1) 授精時期による性制御への精子、卵母細胞の関与を明らかにするために、黒毛和種牛の同一飼養の一群において発情観察から授精までの時間により区分した2群で試験を行った。さらに、(研究2) 受精の詳細な解明には卵母細胞を含む卵胞の発育過程のさらなる理解と、効率的な成熟卵母細胞の作出の観点から卵母細胞の成熟培養技術の向上が必要であることから、ウシ卵母細胞の三次元培養法に焦点を当て検討を行った。次に、(研究3) 雌飼養の価値が高いウシ、ブタにおいて雌胚作出方法の一つであり、妊娠維持に利用される単為発生胚の効率的な作出技術の確立のためにブタ卵母細胞を用いて試験を行った。

研究1では、黒毛和種牛において発情から人工授精までの時間が産子の性比に影響を与えるかどうかを検討した。約2年半以上の期間で1829回分の人工授精を調査し、そのうち753頭の産子が得られていた。調査区分として2群:Early群(発情観察後3時間で授精した群)とLate群(発情観察後27時間後に授精を行った群)に分けた。すべてのウシは発情観察後3時間後に直腸検査を行い、排卵可能な主席卵胞を確認し人工授精を行った(Early群)。また主席卵胞が小さいウシについては発情観察から27時間後に再度直腸検査を行い授精した(Late群)。両群において出生率に差はなかったが、Early群においてLate群に比較し雄産子が有意に多いという結果が得られた($p < 0.05$ 56.9%vs41.1%)。以上より遅い時期の授精では雄産子が少ないことがわかった。

研究2では、フラグミンとプロタミンを混合することで簡単に作成できる直径約0.5-1.0 μ Mのフラグミン・プロタミン微粒子(F/P MPs)を用いて実験を行った。F/P MPsをコラーゲンゲルに添加し、卵胞様構造物の形成とウシ卵母細胞の発育に対するホルモン輸送体としての働きを検討した。コラーゲンゲルへのF/P MPsの添加は卵胞様構造物の形成と大きさにおいて、卵胞刺激ホルモンFSHの作用を促進するという結果が得られた。以上よりF/P MPsはウシの初期胞状卵胞から得られたウシ卵母細胞の発育を促進するホルモン輸送体として機能する可能性が示唆された。

研究3では、雌飼養の価値が高いウシ、ブタにおいて雌胚作出方法の一つであり、妊娠維持に利用される単為発生胚の効率的な作出技術の確立のためにブタ卵母細胞を用いて試験を行った。単為発生を誘起する金属イオンキレート剤であるCa-EDTAを用い、48時間の成熟培養中さまざまな期間暴露させ、Ca-EDTAによる単為発生誘導の最適期間を検討した。培養開始から36時間後にCa-EDTAに暴露した群(post-12)、24時間後に暴露した群(post-24)、12時間後に暴露した群(post-36)、0時間後に暴露した群(post-48)にわけ検討すると、胚盤胞形成率はpost-24群(3.3%)、

(別紙様式第 3 号)

post-36 群(4.0%)、post-48 群(2.8%)が Ca-EDTA の暴露がなかったコントロール群(0%)に比較し有意に高かった。また、培養開始から暴露を 0 時間行った群(control)、12 時間行った群(pre-12)、24 時間行った群(pre-24)、36 時間行った群(pre-36)、48 時間行った群(pre-48)において検討すると、pre-36 群(0.4%)と pre-48 群(0.8%)でのみ胚盤胞形成が見られた。前核形成は成熟培養中に 12 時間以上 Ca-EDTA で暴露した群でのみ観察できた。なお、コントロール群では前核形成は見られなかった。結論として、ブタ未成熟卵母細胞を用いた単為発生において胚盤胞形成につながる前核形成を誘導するには少なくとも 24 時間から 36 時間の Ca-EDTA 暴露が必要であることが示された。

以上、研究 1 にて母体側の性制御機構の可能性が強く示唆され、研究 2 では生体内で死滅過程にある多くの生殖資源としての卵母細胞の更なる有効利用と卵胞内での卵母細胞の成熟機構、受精能、および発生能の解明手法の培養系を確立し、研究 3 ではブタでの単為発生胚の効率的作出が可能になり、今後優良な遺伝形質の的確な継承に有用な産子の作出、単為発生胚を使った着床機構、胚発生特性の解明や最適な胚培養条件の検討等への利用が考えられた。これら研究成果は、雌飼養が重要な家畜において雌胚および雌産子の効率的な獲得の一助となり、優良な遺伝形質の増殖・保存に寄与するものと思われた。

(和文 2,000 字又は英文 800 語程度)

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	森田 康広
審 査 委 員	主 査： 山口大学 教授 高木 光博
	副 査： 山口大学 教授 山本 芳実
	副 査： 山口大学 教授 田浦 保穂
	副 査： 山口大学 准教授 谷口 雅康
	副 査： 鳥取大学 准教授 柄 武志
題 目	ウシおよびブタにおける未成熟卵母細胞からの効率的な雌胚作出に関する研究
<p>審査結果の要旨：</p> <p>ウシやブタなどの雌飼養が重要な家畜において、雌胚および雌産子の効率的な獲得は農家経営の安定や優良な遺伝形質の保存のために重要である。本研究において、(研究 1) 授精時期による性制御への精子、卵母細胞の関与を明らかにするために、黒毛和種牛の同一飼養の一群において発情観察から授精までの時間により区分した 2 群で試験を行った。さらに、(研究 2) 受精の詳細な解明には卵母細胞を含む卵胞の発育過程のさらなる理解と、効率的な成熟卵母細胞の作出の観点から卵母細胞の成熟培養技術の向上が必要であることから、ウシ卵母細胞の三次元培養法に焦点を当て検討を行った。次に、(研究 3) 雌飼養の価値が高いウシ、ブタにおいて雌胚作出方法の一つであり、妊娠維持に利用される単為発生胚の効率的な作出技術の確立のために、ブタ卵母細胞を用いて試験を行った。</p> <p>研究 1 では、黒毛和種牛において発情から人工授精までの時間が産子の性比に影響を与えるかどうかを検討した。約 2 年半の試験期間で 1829 回分の人工授精を調査し、そのうち 753 頭の産子が得られていた。調査区分として 2 群：Early 群（発情観察後 3 時間で授精した群）と Late 群（発情観察後 27 時間後に授精を行った群）に分けた。すべてのウシは発情観察後 3 時間後に直腸検査を行い、排卵可能な主席卵胞を確認し人工授精を行った (Early 群)。また主席卵胞が小さいウシについては発情観察から 27 時間後に再度直腸検査を行い授精した (Late 群)。両群において出生率に差はなかったが、Early 群において Late 群に比較し雄産子が有意に多いという結果が得られた ($p < 0.05$, 56.9% vs 41.1%)。以上より、遅い時期の授精では雄産子が少ないことが示された。</p> <p>研究 2 では、フラグミンとプロタミンを混合することで簡単に作成できる直径約 0.5-1.0 μM のフラグミン・プロタミン微粒子 (F/P MPs) を用いて実験を行った。F/P MPs をコラーゲン</p>	

ゲルに添加し、卵胞様構造物の形成とウシ卵母細胞の発育に対するホルモン輸送体としての働きを検討した。コラーゲンゲルへの F/P MPs の添加は卵胞様構造物の形成と大きさにおいて、卵胞刺激ホルモン FSH の作用を促進するという結果が得られた。以上より F/P MPs はウシの初期卵状卵胞から得られたウシ卵母細胞の発育を促進するホルモン輸送体として機能する可能性が示唆された。

研究 3 では、雌飼養の価値が高いウシ、ブタにおいて雌胚作出方法の一つであり、妊娠維持に利用される単為発生胚の効率的な作出技術の確立のためにブタ卵母細胞を用いて試験を行った。単為発生を誘起する金属イオンキレート剤である Ca-EDTA を用い、48 時間の成熟培養中さまざまな期間暴露させ、Ca-EDTA による単為発生誘導の最適期間を検討した。培養開始から 36 時間後に Ca-EDTA に暴露した群 (post-12)、24 時間後に暴露した群 (post-24)、12 時間後に暴露した群 (post-36)、0 時間後に暴露した群 (post-48) にわけ検討すると、胚盤胞形成率は post-24 群 (3.3%)、post-36 群 (4.0%)、post-48 群 (2.8%) が Ca-EDTA の暴露がなかったコントロール群 (0%) に比較し有意に高かった。また、培養開始から暴露を 0 時間行った群 (control)、12 時間行った群 (pre-12)、24 時間行った群 (pre-24)、36 時間行った群 (pre-36)、48 時間行った群 (pre-48) において検討すると、pre-36 群 (0.4%) と pre-48 群 (0.8%) でのみ胚盤胞形成が見られた。前核形成は成熟培養中に 12 時間以上 Ca-EDTA で暴露した群でのみ観察できた。なお、コントロール群では前核形成は見られなかった。結論として、ブタ未成熟卵母細胞を用いた単為発生において胚盤胞形成につながる前核形成を誘導するには少なくとも 24 時間から 36 時間の Ca-EDTA 暴露が必要であることが示された。

以上、研究 1 にて母体側の性制御機構の可能性が強く示唆され、研究 2 では生体内で死滅過程にある多くの生殖資源としての卵母細胞の更なる有効利用と卵胞内での卵母細胞の成熟機構、受精能、および発生能の解明手法の培養系を確立し、研究 3 ではブタでの単為発生胚の効率的な作出が可能になり、今後優良な遺伝形質の的確な継承に有用な産子の作出、単為発生胚を使った着床機構、胚発生特性の解明や最適な胚培養条件の検討等への利用が考えられた。これら研究成果は、雌飼養が重要な家畜において雌胚および雌産子の効率的な獲得の一助となり、優良な遺伝形質の増殖・保存に寄与するものと思われた。以上により、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。