

学 位 論 文 要 旨

氏名 内倉 健造

題 目：イエネコの卵胞発育動態および卵胞内卵子の体外培養に関する研究

論文要旨：本研究は野生ネコ科動物の体外胚作出技術の開発を目的として様々な日齢のイエネコ (*Felis catus*; 以下、ネコとする) の卵巣内卵子の数や体外培養発生能について調査した。はじめに性成熟前のネコにおける卵胞発育を調査するとともに、卵胞内卵子が胚の体外産生 (IVP) に適するかどうかを評価した。93頭のネコを用いて体重と卵巣重量の関係を調べたところ、卵巣重量は推定日齢100日まで急速に増加することがわかった。推定20日齢、20~40日齢および100~120日齢の11頭の性成熟前のネコ卵巣を組織学的に評価した結果、卵巣重量の増加とともに胞状卵胞の数が増加していることが明らかとなった。また、二次および胞状卵胞の卵胞直径および正常卵子の割合も日齢(体重)が増加するに従い増加することが分かった。推定100~120日齢の性成熟前のネコ卵子を用いてIVPを行った結果、性成熟前のネコから採取された卵子は、核成熟率、正常受精率および胚盤胞への発生率は性成熟後のネコに比較して低いことが明らかとなった ($p < 0.05$)。しかし、卵割胚が胚盤胞へ発生する割合および発生後の胚盤胞の細胞数は性成熟後のネコと同等であった。以上の結果から、100日齢以上のネコの卵巣には胚盤胞への体外発生能を有する卵子が存在し、移植可能胚を体外で作出可能であることが示された。

次に、ネコ卵子について複数層の卵丘細胞に緊密に覆われ、均一な顆粒状の黒色な細胞質をもったものを形態学的に正常な卵子とし、形態学的な正常性および体外培養後の核成熟能に与える卵巣周期および卵胞直径の影響を検討した。卵巣周期を未成熟期、非活動期、卵胞期および黄体期に分類し、それぞれの周期の卵巣内卵胞を直径により3つのグループに分類した(直径400~800、800~1,200および1,200~2,000 μm)。各卵巣周期において、卵胞発育が進むに従って卵胞数は減少し、卵子の形態学的正常性は向上し ($p < 0.05$)、卵子直径は卵胞直径の発育と共に増加する傾向にあった。卵子を1個ずつ成熟培養したところ、核成熟率は卵胞直径が増加するに従って上昇した ($p < 0.05$)。直径800~1,200 μm の卵胞において、未成熟期の正常卵子率および核成熟率は性成熟後のネコの卵巣に比較して高かった ($p < 0.05$)。未成熟期においても、5頭中2頭に1個ずつ直径1,200~2,000 μm の卵胞が観察された。以上の結果から、性成熟後のネコでは、卵巣周期に関係なく、大きな卵胞に核成熟能の高い卵子が存在することがわかった。性成熟前のネコにおいては、直径800 μm 以上に発育した卵胞に由来する卵子は、性成熟後のネコの同サイズの卵胞由来卵子に比較して核成熟能の高いことが分かった。

最後に、ネコ卵子の核成熟能の非侵襲的な評価のために、卵丘細胞の膜正常性と体外培養後の核成熟率の関係を調べた。ネコの卵丘卵子複合体(COCs)を小型(直径400~800 μm)もしくは大型(直径800 μm 以上)卵胞から採取した。採取直後に卵丘細胞を形態(卵丘細胞層の付着程度)で評価し、死滅細胞のみに侵入するヨウ化プロピジウム(PI)で染色した。PIに染色されなかった

(別紙様式第 3 号)

卵丘細胞の細胞膜機能は正常であると判定した。評価後、COCs を 30 時間培養し、核成熟率を調べた。大型卵胞の核成熟率 (89.8%) は小型卵胞 (60.8%) に比較して有意に高かった ($p < 0.05$)。一方、大型卵胞において卵丘細胞の膜正常性の高い卵子の核成熟率 (93.8%) は低い卵子 (76.9%) よりも有意に高かった ($p < 0.05$)。以上の結果から、PI 染色による卵丘細胞の膜正常性の評価は卵子の核成熟能の予測に有用であることが分かった。

本研究から幼若ネコ科動物の卵巣からの胚作出が可能である事が示唆されるとともに、超生体染色による卵丘細胞の染色は発生能の高いネコ卵子の選別に有用であり、ネコ科動物胚の作出効率向上に寄与できると考えられた。

(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	内倉 健造
審査委員	主査：農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門 ユニット長 菊地 和弘
	副査：山口大学 教授 高木 光博
	副査：山口大学 教授 西垣 一男
	副査：鳥取大学 教授 菱沼 貢
	副査：山口大学 准教授 谷口 雅康
題目	イエネコの卵胞発育動態および卵胞内卵子の体外培養に関する研究
審査結果の要旨： 大部分の野生ネコ科動物は絶滅の恐れがあるとされ、それらの保護・増殖のためには、生息地の回復と同時に飼育下にある個体の繁殖効率を向上させる必要がある。しかし、自然繁殖が困難であることが多いため、家畜の繁殖やヒトの不妊治療に用いられている人工授精、体外受精および受精卵移植などの生殖補助技術が期待されている。 申請者はこれらの問題解決に体外胚生産技術の確立が有効であると考え、イエネコをモデルとした一連の技術の確立を視野にその基盤となる知見の取得、具体的には体外胚作出技術の開発を目的として様々な日齢のイエネコ（以下、ネコとする）の卵巣内卵子の数や体外培養発生能について調査した。 第1章では、性成熟前のネコにおける卵胞発育を調査するとともに、卵胞内卵子が胚の体外産生（IVP）に適するかどうかを評価した。93頭のネコを用いて体重と卵巣重量の関係を調べたところ、卵巣重量は推定日齢100日まで急速に増加することがわかった。推定20日齢、20～40日齢および100～120日齢の11頭の性成熟前のネコ卵巣を組織学的に評価した結果、卵巣重量の増加とともに胞状卵胞の数が増加していることが明らかとなった。また、二次および胞状卵胞の卵胞直径および正常卵子の割合も日齢（体重）が増加するに従って増加することが分かった。推定100～120日齢の性成熟前のネコ卵子を用いてIVPを行った結果、性成熟前のネコから採取された卵子は、核成熟率、正常受精率および胚盤胞への発生率は性成熟後のネコに比較して低いことが明らかとなった（ $p < 0.05$ ）。しかし、卵割胚が胚盤胞へ発育する割合および発育後の胚盤胞の細胞数は性成熟後のネコと同等であった。以上の結果から、100日齢以上のネコの卵巣には胚盤胞への体外発生能を有する卵子が存在	

し、移植可能胚を体外で作出可能であることが示された。

第 2 章では、ネコ卵子について複数層の卵丘細胞に緊密に覆われ、均一な顆粒状の黒色な細胞質をもったものを形態学的に正常な卵子とし、形態学的な正常性および体外培養後の核成熟能に与える卵巣周期および卵胞直径の影響を検討した。卵巣周期を未成熟期、非活動期、卵胞期および黄体期に分類し、それぞれの周期の卵巣内卵胞を直径により 3 つのグループに分類した (直径 400~800、800~1,200 および 1,200~2,000 μm)。各卵巣周期において、卵胞発育が進むに従って卵胞数は減少し、卵子の形態学的正常性は向上し ($p < 0.05$)、卵子直径は卵胞直径の発育と共に増加する傾向にあった。直径 800~1,200 μm の卵胞において、未成熟期の正常卵子率および核成熟率は性成熟後のネコの卵巣に比較して高かった ($p < 0.05$)。未成熟期においても、5 頭中 2 頭に 1 個ずつ直径 1,200~2,000 μm の卵胞が観察された。卵子を 1 個ずつ成熟培養したところ、核成熟率は卵胞直径が増加するに従って上昇した ($p < 0.05$)。以上の結果から、性成熟後のネコでは、卵巣周期に関係なく、大きな卵胞に核成熟能の高い卵子が存在することがわかった。性成熟前のネコにおいては、直径 800 μm 以上に発育した卵胞に由来する卵子は、性成熟後のネコの同サイズの卵胞由来卵子に比較して核成熟能の高いことが分かった。

第 3 章では、ネコ卵子の核成熟能の非侵襲的な評価のために、卵丘細胞の膜正常性と体外培養後の核成熟率の関係を調べた。ネコの卵丘卵子複合体 (COCs) を小型 (直径 400~800 μm) もしくは大型 (直径 800 μm 以上) 卵胞から採取した。採取直後に卵丘細胞を形態 (卵丘細胞層の付着程度) で評価し、死滅細胞のみに侵入するヨウ化プロピジウム (PI) で染色した。PI に染色されなかった卵丘細胞の細胞膜機能は正常であると判定した。評価後、COCs を 30 時間培養し、核成熟率を調べた。大型卵胞の核成熟率 (89.8%) は小型卵胞 (60.8%) に比較して有意に高かった ($p < 0.05$)。一方、大型卵胞において卵丘細胞の膜正常性の高い卵子の核成熟率 (93.8%) は低い卵子 (76.9%) よりも有意に高かった ($p < 0.05$)。以上の結果から、PI 染色による卵丘細胞の膜正常性の評価は卵子の核成熟能の予測に有用であることが分かった。

本研究により、本研究から幼若ネコ科動物の卵巣からの胚作出が可能である事が示唆されるとともに、超生体染色による卵丘細胞の染色は発生能の高いネコ卵子の選別に有用であり、将来的にはネコ科動物胚の作出効率向上に寄与できる基盤的知見となることが示唆された。

以上により、本論文は博士 (獣医学) の学位を授与するにふさわしいと判断された。