

学 位 論 文 題 名

ウシの体外受精における精子処理法と体外受精由来の
初期胚の体外培養法に関する研究

学位論文内容の要旨

ウシの体外受精による安定的な胚盤胞の生産技術を確立することを目的として、ウシの卵胞卵子の体外成熟、体外受精ならびに体外受精由来胚の体外培養系に関する基礎的研究を行い、下記の知見を得た。

1) 凍結融解精子の処理法と種雄牛の個体差が体外受精に及ぼす影響

ウシ卵胞卵子の体外培養時間と核の成熟率との関係ならびに体外受精時の精子処理におけるカフェインまたはカフェインとイオノホア併用による体外受精率、卵割率ならびにウザキ卵管内移植後の桑実胚への発育率について比較検討を行った。

卵子の成熟率（第二成熟分裂中期像に達する場合）は22時間目でピークに達した。体外受精率はカフェイン区で53%、カフェインとイオノホア併用区で89%、また、全受精卵中の正常な受精卵の占める割合はカフェイン区で22%およびカフェインとイオノホア併用区で54%とどちらも両区間で有意差が認められた（ $P < 0.01$ ）。受精後2日目の2細胞期以降への卵割率はカフェイン区で24%およびカフェインとイオノホア併用区で43%を示し、両者間に有意差が認められた（ $P < 0.01$ ）。しかし、卵割区のウサギ卵管内での桑実胚以降への発育率はカフェイン区およびカフェインとイオノホア併用区の間で有意差は認められなかった。カフェインに対し、カフェインとイオノホア併用による精子処理が体外受精率ならびに初期卵割率の向上に有効であることが示唆された。

ウシ体外受精における種雄牛の個体差の影響を体外受精率、体外での卵割率およびウシ卵管内移植後の桑実胚への発育率から比較検討した。

体外受精率は種雄牛5頭で84~94%の範囲で有意差は認められず、1頭の種雄牛（3-H）の凍結精液の受精率は53%と他牛に比べて有意に低値を示した（ $P < 0.01$ ）。卵割率は3-Hの個体のみ18%と低かったが、他種雄牛のそれは39~49%の範囲内にあった。全受精卵中の雄性前

核の形成率は38～75%の範囲で6頭の種雄牛間でばらつきを認めた。また、卵割胚中の4細胞期胚の占める割合も39～71%で幅が認められた。卵割胚のウザキ卵管内での桑実胚への発育率は各種雄牛間で有意差は認められなかった。

種雄牛の個体差が体外受精に影響し、とくに、雄性前核の形成率ならびに卵割胚中の4細胞期胚の占める割合に顕著に影響することが明らかとなった。

2) 体外受精由来胚の体外培養系に関する検討

ウシ体外受精由来の8細胞期胚を各種細胞(ウシの卵丘細胞, 卵管上皮細胞, 栄養膜の小胞, 羊膜細胞)と共培養するか,あるいはウサギ卵管内で培養し,さらに,ウシの体細胞を含まない培養を対照区として,胚盤胞への発育率を比較検討した。

胚盤胞への発育率ならびに良好な形態を示す胚盤胞の割合は,それぞれ対照区で2%および0%,卵丘細胞との共培養で20%および4%,卵管上皮細胞との共培養区で39%および18%,栄養膜の小胞との共培養区で51%および28%,羊膜細胞との共培養区では49%および24%であった。また,ウサギ卵管内培養区のそれらは29%および16%であった。さらに,卵管上皮,栄養膜の小胞ならびに羊膜細胞との共培養によって得られた胚盤胞の凍結融解後の移植によって6頭の受卵牛が分娩し,2組の双子を含む8頭の産子を得た。

卵管上皮細胞,栄養膜の小胞および新知見の羊膜細胞との共培養によって体外受精由来の8細胞期胚の胚盤胞への発育率は向上し,形態的にも良好な胚がより多く得られることが示唆され,それらを受卵牛に移植した場合,正常な子牛として生まれることが確認された。

本研究はウシの体外受精によって安定的な胚盤胞の生産技術を確立することに役立ち,ウシ受精卵移植の実用化に貢献することが明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 金 川 弘 司
副 査 教 授 波 岡 茂 郎
副 査 教 授 杉 村 誠
副 査 助 教 授 高 橋 芳 幸

ウシの体外受精による安定的な胚盤胞の生産技術を確立することを目的として、ウシの卵胞卵子の体外成熟、体外受精ならびに体外受精由来胚の体外培養系に関する基礎的研究を行い、下記の知見を得た。

1) 凍結融解精子の精子処理法と種雄牛の個体差が体外受精におよぼす影響

ウシ卵胞卵子の体外培養時間と核の成熟率との関係ならびに体外受精時の精子処理におけるカフェインまたはカフェインとイオノホア併用による体外受精率、卵割率ならびにウザキ卵管内移植後の桑実胚への発育率について比較検討を行った。その結果、卵子の成熟率（第二成熟分裂中期像に達する場合）は22時間目でピークに達した。体外受精率はカフェイン区で53%、カフェインとイオノホア併用区で89%、また、全受精卵中の正常な受精卵の占める割合はカフェイン区で22%およびカフェインとイオノホア併用区で54%とどちらも両区間で有意差が認められた（ $P < 0.01$ ）。受精後2日目と2細胞期以降への卵割率はカフェイン区で24%およびカフェインとイオノホアの併用区で43%を示し、両者間に有意差が認められた（ $P < 0.01$ ）。カフェインに対しカフェインとイオノホアの併用による精子処理が体外受精率ならびに初期卵割率の向上に有効であることが示唆された。

ウシ体外受精における種雄牛の個体差の影響を体外受精率、体外での卵割率およびウザキ卵管内移植後の桑実胚への発育率から比較検討した。その結果、体外受精率は種雄牛5頭で84~94%の範囲で有意差は認められず、1頭の種雄牛（3-H）の凍結精液の受精率は53%と他牛に比べて有意に低値を示した（ $P < 0.01$ ）。卵割率は3-Hの個体のみ18%と低かったが、他種雄牛のそれは39~49%の範囲内にあった。全受精卵中の雄性前核の形成率は38~75%の範囲で6頭の種雄牛間でばらつきを認めた。種雄牛の個体差が体外受精に影響し、とくに、雄性前核の形成率ならびに卵割胚中の4細胞期胚の占める割合に顕著に影響することが明らかとなった。

2) 体外受精由来胚の体外培養系に関する検討

ウシ体外受精由来の8細胞期胚を各種細胞（ウシの卵丘細胞、卵管上皮細胞、栄養膜の小胞、

羊膜細胞)と共培養するか、あるいはウサギ卵管内で培養し、さらに、ウシの体細胞を含まない培養を対照区として、胚盤胞への発育率を比較検討した。その結果、胚盤胞への発育率ならびに良好な形態を示す胚盤胞の割合は、それぞれ対照区で2%および0%、卵丘細胞との共培養区で20%および4%、卵管上皮細胞との共培養区で39%および18%、栄養膜の小胞との共培養区で51%および28%、羊膜細胞との共培養区では49%および24%であった。また、ウザキ卵管内培養区のそれらは29%および16%であった。さらに、卵管上皮、栄養膜の小胞ならびに羊膜細胞との共培養によって得られた胚盤胞の凍結融解後の移植によって6頭の受卵牛が分娩し、2組の双子を含む8頭の産子を得た。

以上のことから、本研究はウシの体外受精によって安定的な胚盤胞の生産技術を確立することに役立ち、ウシ受精卵移植の実用化に貢献することが明らかとなった。よって審査員一同は、申請者青柳敬人氏が、博士(獣医学)の学位を受けるに十分な資格を有すると認めた。