学位論文題名

Studies on the maturation, fertilization
and development of pig oocytes in vitro

（豚未受精卵の体外における成熟、受精および発育に関する研究）

学位論文内容の要旨

本研究では、屠場豚卵巢の非閉鎖卵胞（直径3-5mm）より回収した卵子を用いて、第1減数分裂の初期事象、第2減数分裂および受精に伴った細胞質の変化といった、体外での豚卵子成熟に関与する要因の影響を検討した。さらに、体内あるいは体外で受精した卵子より得られた、胚発生停止時期前の豚胚の培養について、発生途中の鶏胚羊水の効果を調べた。

豚卵子の核成熟が進行する間、第1減数分裂が終了するまでの染色質形態について、その連続変化の時間的調節を種々の培養時間に卵子を固定する事によって決定した。単一の巨大な核で、密な核小体のまわりの明瞭なリング状の凝縮した染色質（卵核胞）を持った卵子は、培養開始後17.6時間まで観察された。密な核小体と核膜の消失、それと染色質の徐々の濃縮（GVBD）は培養17.6から26.4時間で頻りに観察された。個々の2価染色体形成を完了した卵子は培養開始後26.4から30.9時間に最も多く観察された。染色体が特徴的伸長を示し、2つの染色体セットが分離し始めた（A-1）卵子と、両極に向けて2つの染色体セットの分離が完了した（T-1）卵子はそれぞれ30.9から33.4時間、33.4から34.4時間に観察された。第1極体の存在により第1減数分裂が完了したことが明らかな卵子は、34.4から48時間に観察された。

体外で成熟、受精した豚卵子の初期分割に向けた、第2減数分裂の連続的变化とそれに伴った細胞質の変化の時間調節を決定した。卵細胞膜上への精子の接着が第2減数分裂の再開を引き起こし（A-2/T-2）、それは媒精後4-5時間に観察された。媒精後6から9時間に、侵入精子の頭部が膨化し始め、尾部は脱落し、第2減数分裂が完了する（第2極体の放出）。精子頭部と雌性染色体のさらなる膨化が9から12時間に起こり、向かい合った、あるいは隣接した前核がそれぞれ12から18時間後と18から24時間後に観察された。前核融合と最初の体細胞分裂前期および最初の分割は、24から30時間に認められた。

修正TCM199で、24, 30, 36, 42および48時間培養した豚卵子を体外受精した。核成熟した（M-2）卵子の割合は培養時間が長くなるに従って有意に増加し（ $P < 0.05$ ）、その平均値は42から48時間で最高を示し、24時間では最低であった。種々の時間培養した後媒精した卵子への精子侵入率はほぼ一定であったが、雄性前核形成率は有意に異なり（ $P < 0.01$ ）、36と42時間のそれぞれ73.1%と86.6%が最も高かった。未成熟卵子（GVからT-1期）への精子侵入率は第1減数分裂完了卵子への侵入率と同じであったが、膨化していないか、あるいは部分的に膨化している精子のみが観察された。M-1からT-1期に精子侵入がなされた未成熟卵子では、形態的に異常な紡錘糸の形成もまた観察された。黄体（CL）または白体（CA）が存在する、あるいは両方とも存

在しない卵巣から採取した豚卵子を培養後、体外受精したとき、M-2期に到達した卵子の割合と、媒精後の精子侵入率は、CLまたはCAのあるなしに関わらずほぼ同じであった。しかし、CLとCAのいずれも存在しない卵巣から採取された卵子の雄性前核形成率は、CAが存在する卵巣から採取した卵子よりも高かった ($P < 0.05$)。卵丘細胞の存在する、あるいは存在しない状態で卵子を培養した時、核成熟率、精子侵入率、雄性前核形成率に有意な差が認められた。卵丘細胞のない卵子の核成熟率は、単層以上の卵丘細胞を有した卵子よりも有意に低かった ($P < 0.01$)。さらに、3層以上の卵丘細胞を有した卵子の雄性前核形成率が最も高い値、78.9%であった。血清を添加した培養液で培養した卵子の核成熟率は、血清無添加の培養液で培養した卵子よりも有意に高かった ($P < 0.05$)。しかし、タンパク質として牛血清を添加した時、核成熟率と雄性前核形成率は、その添加濃度が5%、10%、20%と変わるに従って変化した。一方、豚血清をタンパク質として用いたとき、核成熟率と雄性前核形成率は、その濃度が5%、10%、20%と変化しても同じであった。

豚卵胞卵子と、体内あるいは体外受精によって得られた発生停止期以前の豚胚の培養に鶏胚羊水 (CEAm fluid) を用いた。その結果、鶏胚羊水は卵子の減数分裂の再開とそれに続く第1減数分裂を引き起こす事ができ、鶏胚が温度37°C、相対湿度40から70%の空気下に置かれたときにそれらの割合が最も高かった。空気中の二酸化炭素濃度を5%に上昇させることは、羊水中で培養した卵子の発達に悪影響を及ぼし、それは、5%濃度の二酸化炭素が発生途中の鶏胚にたいして悪影響を及ぼしたことに起因すると考えられた。さらに、体内で受精し、鶏胚羊水中で培養された初期胚の胚盤胞への発生率は、修正BMOc-2を用いて豚卵管上皮細胞と共培養した初期胚の発生率よりも有意に高く、得られた胚盤胞の平均細胞数は60.2であった。体外成熟と体外受精によって得られた初期胚を、鶏胚羊水中あるいは修正Whitten's Medium (mWM) で培養したとき、胚盤胞への発生率に培養方法による有為な差は認められなかった。しかし、鶏胚羊水中で培養して得られた胚盤胞の平均細胞数は、mWMでの培養で得られた胚盤胞のそれよりも有意に高い値であった (39.0 ± 1.7 に対して 52.0 ± 3.0)。これらの事から、豚胚の体外培養の方法としての、特にCO₂インキュベーターが利用できない状況下での、鶏胚羊水の有効性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主査 教授 金川 弘 司
副査 教授 杉村 誠
副査 教授 板倉 智敏
副査 助教授 上田 純治

学位論文題名

Studies on the maturation, fertilization and development of pig oocytes in vitro

(豚未受精卵の体外における成熟、受精および発育に関する研究)

申請者は、豚卵子の体外成熟過程とそれに関与する要因を調べ、体外成熟および受精卵の培養における発生鶏胚羊水内培養法の有効性について研究を行いその内容は、以下のように要約された。

1. 卵子の体外成熟過程での卵核胞崩壊と第1減数分裂から第2減数分裂中期までの染色質形態および体外受精過程での減数分裂再開から雌雄両前核の形成と接合について、経時的な変化を明らかにした。

2. 体外成熟の培養時間は、42から48時間が適当であり、その後の体外受精における精子侵入率は成熟培養時間に関わりなく一定であるが、雄性前核形成は培養時間によって影響を受けることを明らかにした。

3. 体外成熟における卵丘細胞の影響について調べ、卵丘細胞のない卵子の核成熟が低いこと、また、3層以上の卵丘細胞を有する卵子において雄性前核形成が高いことを明らかにした。

4. 発生鶏胚羊水内培養による卵子の体外成熟が可能であり、温度、湿度および気相が影響を及ぼすことを明らかにした。

5. 発生鶏胚羊水内培養を用いることで、従来の培養法と同様に、体内受精胚および体外成熟・体外受精胚から胚盤胞を作出できることを明らかにした。

以上のように、申請者は、豚卵子の体外での成熟過程とそれに関与する種々の要因を明らかにするとともに、体外成熟および受精卵の培養における発生鶏胚羊水内培養法の有効性を示唆した。これらの知見は、豚卵子の体外成熟および豚初期胚の体外培養技術の進歩に大きく寄与すると考えられる。よって、審査員一同は、オカンボ マルロン ブラザ氏が博士(獣医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。