

学 位 論 文 題 名

ウシ卵子の体外発育能に及ぼすインスリンと
インスリン様増殖因子－I の影響

学位論文内容の要旨

ウシ初期胚の体外生産技術は、獣医畜産分野におけるウシの改良増殖、さらに、核移植や遺伝子導入などの先端技術の開発に必要である。また、体外成熟、体外受精および体外培養技術は、初期胚の発育に関する基礎的研究に利用されている。これまで、培養液の組成、種々の添加物、培養条件などに関する研究により、ウシ初期胚の体外培養法の改善が試みられているが、その発育成績は低い。この理由として、体外培養における初期胚の発育を促進する因子の欠如や体外成熟では卵子成熟が不十分なことなどが考えられる。そこで、本研究では、卵管液中に含まれ初期胚の発育に影響を及ぼしていると予想され、さらに、卵胞発育における卵巣内調節因子でもあるインスリン様増殖因子－I（insulin-like growth factor－I：IGF－I）および類似の作用を持つインスリンが、ウシ卵子の体外発育能に及ぼす影響について検討を行った。

第1章では、ウシ体外受精卵の発育に及ぼすインスリンおよびIGF－Iの影響を調べるために、タンパク質を含まず化学組成の明らかな修正合成卵管液を用いて検討を行った。その結果、インスリンの単独添加は桑実胚への発育に影響を及ぼさなかった。しかし、インスリンはアミノ酸の存在下で桑実胚への発育を改善したことから、ウシ初期胚に対してアミノ酸との協同的発育促進効果を持つことが示された。インスリンとIGF－Iの両者を添加した場合の体外受精卵の発育は、インスリンあるいはIGF－Iを単独で添加した場合と比べて差異はなく、インスリンおよびIGF－Iの作用に相加あるいは相乗効果は認められなかった。インスリンは0.5～10 μ g/ml、IGF－Iは2～200ng/mlでウシ体外受精卵の発育を促進することが明らかになった。インスリンあるいはIGF－Iは、それぞれの最小有効濃度で作用する場合も、アミノ酸の存在を必要とすることが確認された。インスリンおよびIGF－Iのウシ体外受精卵に対する発育促進効果は、抗IGF－Iレセプター

抗体により完全に抑制されたことから、インスリンおよびIGF-Iの作用はIGF-Iレセプターを介して発現していることが示唆された。

第2章では、ウシ卵子の成熟培養液へのインスリンおよびIGF-Iの添加が、卵子の核の成熟、体外受精率および体外受精後の発育に及ぼす影響について調べた。血清およびホルモンを含んだ成熟培養液へ添加したインスリンは、卵子の核の成熟、体外受精率および体外受精後の胚盤胞への発育に影響を及ぼさなかった。いっぽう、血清およびホルモンを含まない成熟培養液を用いた場合、インスリンあるいはIGF-Iの培養液への添加により、卵子の核の成熟率は影響を受けなかったが、体外受精率は改善された。さらに、インスリンあるいはIGF-Iを添加した成熟培養液で培養した卵丘細胞と共に媒精した卵子の正常受精率および総精子侵入率は増加した。成熟培養液へのIGF-Iの添加により、体外受精後の分割率、媒精後7日目の胚盤胞への発育率および胚盤胞の細胞数は高い値を示した。これらのことから、血清およびホルモンを含まない成熟培養液へ添加したインスリンおよびIGF-Iは卵丘細胞に作用し、精子の受精能獲得を誘起する物質の産生を亢進することでウシ卵子の体外受精率を増加させることが示唆された。さらに、成熟培養液へ添加したIGF-Iは、体外受精後の初期胚の発育能を改善することが示された。

以上の研究より、ウシ体外受精卵の体外培養において、培養液へ添加したインスリンおよびIGF-Iは、アミノ酸の存在下でウシ初期胚の発育を促進することが示された。インスリンおよびIGF-Iのウシ初期胚に対する発育促進効果は、IGF-Iレセプターを介して発現していることが明らかにされた。また、ウシ卵子の体外成熟培養液へ添加したインスリンおよびIGF-Iは卵丘細胞に作用して、その後の体外受精率を増加させることが示された。さらに、体外成熟培養液へのインスリンあるいはIGF-Iの添加は、体外受精後のウシ初期胚の発育能を改善することが示唆された。本研究の結果、体外成熟および体外培養に用いる培養液への細胞増殖因子の添加は、ウシ卵子の体外発育能に影響を及ぼすと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 金 川 弘 司

副 査 教 授 板 倉 智 敏

副 査 教 授 斉 藤 昌 之

副 査 教 授 高 橋 芳 幸

学 位 論 文 題 名

ウシ卵子の体外発育能に及ぼすインスリンと インスリン様増殖因子-Iの影響

ウシ初期胚の体外生産技術は、畜産分野における核移植や遺伝子導入などの先端技術の開発に必要であり、現在、ウシ胚の体外生産に関する様々な研究が行われている。本研究では、卵管液中に含まれ初期胚の発育に影響を及ぼしていると予想され、さらに、卵胞発育における卵巣内調節因子であるインスリン様増殖因子-I (insulin-like growth factor-I : IGF-I) および類似の作用を持つインスリンについて、ウシ卵子の体外発育能に及ぼす影響を調べた。

第1章では、修正合成卵管液を用いて、ウシ体外受精卵の発育に及ぼすインスリンおよびIGF-Iの影響を調べた。インスリンおよびIGF-Iは、アミノ酸の存在下で桑実胚への発育を改善した。ウシ初期胚に対する有効濃度は、インスリンは0.5~10 μ g/ml、IGF-Iは2~200ng/mlであることが明らかになった。インスリンおよびIGF-Iの発育促進効果は、IGF-Iレセプターを介して発現していることが示された。

第2章では、成熟培養液へのインスリンおよびIGF-Iの添加が、ウシ卵子の体外成熟、体外受精およびその後の発育に及ぼす影響について調べた。インスリンあるいはIGF-Iの添加により、卵子の核の成熟率は影響を受けなかったが、体外受精率は改善された。体外成熟培養液へ添加したインスリンおよびIGF-Iは、卵丘細胞に作用し、精子の受精能獲得を誘起する物質の産生を亢進することでウシ卵子の体外受精率を増加させることが示唆された。

以上のとおり、本研究によりウシ卵子の体外成熟あるいはウシ体外受精卵の発育に及ぼすインスリンおよびIGF-Iの影響が明らかにされ、培養液へのインスリンおよびIGF-Iの添加は、ウシ卵子の体外発育能を改善することが示された。これらの知見は、ウシ初期胚の体外発育能に関する基礎的研究の解明と体外生産技術の発展に寄与するものと考えられた。よって、審査員一同は、松井基純氏が博士(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。