

学 位 論 文 題 名

ウシの超音波ガイド・経膣法による卵胞卵子の採取と
体外培養方法の検討

学位論文内容の要旨

近年、超音波ガイド・経膣法によるウシ生体からの卵胞卵子採取および体外受精（IVF）により、胚を作出することが可能になった。そこで、本技術の胚生産効率を向上させることにより、胚生産の困難なウシに対して臨床応用し得る技術にすることを目的として、1）ウシにおけるインヒビン能動免疫が卵胞の発育ならびに超音波ガイド・経膣法による卵胞卵子採取に及ぼす影響、2）体外成熟（IVM）培地に添加した顆粒層細胞が超音波ガイド・経膣法により採取したウシ卵子の胚盤胞への発育に及ぼす影響、3）胚生産の困難なウシに対する超音波ガイド・経膣法による卵胞卵子採取および体外受精由来胚作出の臨床応用についての検討を行った。

1）卵胞の顆粒層細胞から産生されるインヒビンは下垂体の卵胞刺激ホルモンの分泌を抑制する。そこで、インヒビンを能動免疫によって中和した場合の卵巢における卵胞の発育および超音波ガイド・経膣法による卵胞卵子の採取成績へ及ぼす影響について検討した。6頭の黒毛和種経産牛に対して、ブタインヒビン（ α 鎖N1-26）の合成ペプチドに家兎血清アルブミン（RSA）を接合したものを抗原として合計4回投与し能動免疫を行った。また、対照区として6頭の黒毛和種経産牛にRSAだけを同時期に投与した。卵巢における卵胞数（小卵胞；2～3 mm，中卵胞；4～9 mm，大卵胞； \geq 10 mm）および採取卵子数の推移は、初期投与後10～17週の間、毎週1回（合計8回）の超音波診断装置を用いた卵巢観察および経膣法による卵胞卵子採取により行った。その結果、免疫区6頭の全てのウシにおいて2回目の抗原投与（6週目）後、抗体価の上昇が認められ、かつ実験終了時まで高い抗体価が持続した。インヒビン免疫区における小卵胞、中卵胞および大卵胞の数は対照区に比べ、それぞれ有意に多い値（ $P < 0.05$ ）であった。また、超音波ガイド・経膣法により採取したIVFに適用可能な（変性していない）卵子数（平均 \pm SEM）においても免疫区（ 8.4 ± 1.4 ）は対照区（ 3.3 ± 0.4 ）に比べ、有意に多い値（ $P < 0.05$ ）であった。

2) 卵子に付着している卵丘細胞は、IVM-IVF後の胚発育に重要な役割を果たしている。一方、超音波ガイド・経膈法により採取した卵胞卵子には卵丘細胞の付着が少ないかまたは全く付着していないものが少なくない。そこで、ウシ卵子のIVM培地への顆粒層細胞添加がIVF後の胚発育率へ及ぼす影響について検討した。

と場のウシ卵巢由来および超音波ガイド・経膈法により採取した卵胞卵子を卵丘細胞の付着形態により1～5の品質(品質1: ≥ 5 層, 品質2: 3～4層, 品質3: 1～2層, 品質4: 裸化卵子および品質5: 卵丘細胞または卵細胞質が変性した卵子)に分類した。と場由来の品質1～4の卵子をそれぞれ各品質毎に、顆粒層細胞(1×10^6 個/mm)添加区および無添加区に分けて計8区とし、経膈法由来の卵子は各品質が等しくなるように2区に分けてそれぞれ、顆粒層細胞添加区および無添加区としてIVM-IVFを行った。その結果、と場由来の卵胞卵子の品質1および4の卵子の胚盤胞への発育率において、顆粒層細胞添加の影響は認められなかったが、品質2および3の卵子の胚盤胞への発育率は顆粒層細胞添加区が無添加区に比べ、有意に高い値($P < 0.05$)であった。また、経膈法由来の卵胞卵子の胚盤胞への発育率は顆粒層細胞添加区(24%)が無添加区(12%)に比べ、有意に高い値($P < 0.05$)であった。3) 過剰排卵処置による胚生産の困難なウシを供試牛とし、超音波ガイド・経膈法による卵胞卵子採取を行った場合の供卵牛別の採卵成績、IVF後の胚発育率ならびに胚移植後の受胎率について検討した。胚生産の困難な黒毛和種経産牛5頭に対してインヒビン能動免疫および11～12回の超音波ガイド・経膈法による卵胞卵子採取を実施し、供卵牛別に顆粒層細胞を添加したIVM、凍結精液によるIVFおよび168時間の発生培養を行った。その結果、採取した卵子数およびIVF後の胚発育率においては供卵牛間で有意な差が認められたが、IVFを行った536個(供卵牛1頭あたり54～230個, 平均107個/頭)の卵子から89個(16.6%, 供卵牛1頭あたり7～29個, 平均18個/頭)の桑実胚または胚盤胞が得られた。これらの胚のうち33個を1個ずつ受卵牛に移植した結果、18頭(54.5%, 供卵牛1頭あたり2～5頭)が受胎した。受胎した18頭のうち15頭は平均在胎日数287日で正常に分娩したが、3頭は受胎を確認した後1～6ヶ月の間に流産した。15頭の産子(雄7頭および雌8頭)の生時体重は 27.5 ± 1.2 kg(平均 \pm SEM)であり、全て健康であった。

本研究によって、超音波ガイド・経膈法による胚の生産効率が向上することが明らかとなり、胚および産子生産の困難なウシに対して臨床応用し得る技術であることが実証された。

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 橋 本 晃
副 査 助 教 授 高 橋 芳 幸

学 位 論 文 題 名

ウシの超音波ガイド・経膈法による卵胞卵子の採取と 体外培養方法に関する研究

本研究では、超音波ガイド・経膈法によるウシからの卵胞卵子採取および体外受精（IVF）技術を、胚生産の困難なウシに対して臨床応用することを目的として、1）インヒビン能動免疫が卵胞の発育ならびに超音波ガイド・経膈法による卵胞卵子採取に及ぼす影響、2）体外成熟（IVM）培地に添加した顆粒層細胞が採取したウシ卵子の胚盤胞への発育に及ぼす影響、3）胚生産の困難なウシに対する超音波ガイド・経膈法およびIVFによる胚作出の臨床応用について検討を行った。

1）黒毛和種経産牛に対して、ブタインヒビン（ α 鎖N1-26）の合成ペプチドを抗原として能動免疫を行った。初期投与後10～17週の間、（毎週1回、合計8回）超音波診断装置を用いた卵巣観察および経膈法による卵胞卵子採取を行った。その結果、免疫区における卵胞数および採取した卵子数は対照区に比べ、それぞれ有意に増加することが明らかとなった。

2）超音波ガイド・経膈法により採取した卵胞卵子を、顆粒層細胞添加区および無添加区に分けてIVMおよびIVFを行った。その結果、顆粒層細胞添加により胚盤胞への発育率の改善されることが明らかとなった。

3）胚生産の困難な黒毛和種経産牛にインヒビン能動免疫および11～12回の超音波ガイド・経膈法による卵胞卵子採取を実施し、個体別に顆粒層細胞を添加したIVM、IVFおよび168時間の発生培養を行った。その結果、IVFを行った536個の卵子から89個（16.6%）の桑実胚または胚盤胞が得られ、そのうち33個を1個ずつ受卵牛に移植した結果、18頭（54.5%）が受胎した。受胎した18頭のうち15頭は平均在胎日数287日で正常に分娩した。15頭の産子（雄7頭および雌8頭）の生

時体重は 27.5 ± 1.2 kg (平均 \pm SEM)であり、全て健康であった。

これらの成果は、ウシにおける超音波ガイド・経膈法による胚および産子の生産効率を向上させ、畜産の発展に貢献するところが大きい。よって、審査員一同は、小西正人氏が博士(獣医学)の学位を受ける資格を有するものと認めた。