

学位論文題名

Study on the production of awamp buffalo
from oocytes matured, fertilized and cultured in vitro.

(体外成熟・受精・培養した沼沢型水牛卵子からの
子牛の生産に関する研究)

学位論文内容の要旨

フィリッピンにおいて、水牛（沼沢型水牛, swamp buffalo）は、亜熱帯の気候風土に良く適応し、農耕・運搬などの役畜として、また乳と肉生産が農家の補助的収入源として重要な大型家畜であるが、小型化し頭数が減少傾向にある。大型で乳量の優れた河川型水牛（river buffalo, murrrah 種）の国外からの導入を含め、生産性改良の努力が進められているが、ウシに比較して性成熟が遅く、交配のための発情兆候が微弱で受胎率が低いなど繁殖面での問題を抱えている。その解決策として、過剰排卵処理あるいは胚の体外作出と胚移植の実用化が強く要望されている。本研究は、と畜場で得られる卵巣からの卵胞卵子を利用し、成熟培養(IVM)と体外受精(IVF)によって作出した胚を移植(ET)することにより、子牛を生産する技術を確立することを目的にしたものである。論文内容は以下のように要約される。

1. 卵胞の成熟に影響する要因

胚を体外で作成する第一段階は、卵巣から摘出した卵子の受精適期までの培養で卵子成熟と呼ばれ、第一減数分裂による極体の囲卵腔への放出ないしは核の形態変化によって確認される。卵巣には様々な発育段階の卵胞が存在し、卵子成熟に必要な成分が卵子とそれに付着した卵丘細胞とのギャップジャンクションを介して補給されることから、卵丘細胞に損傷がなく細胞質が均一な卵子ほど成熟率が高く、特に3層以上の緊密な卵丘細胞層で包まれた卵子を利用することが望ましいことを明らかにした。また、体外成熟にグルタミンと LH（黄体形成ホルモン）が必須であること明らかにした。

2. 精子の受精能獲得ならびに体外受精の培養液と精子濃度

精子は通常雌の生殖道(子宮および卵管)内で受精能力を獲得するが、体外受精に用いる時にはそのための処理が必要であり、家畜の種類に応じた培養液 (BO や TALP) と添加物 (ヘパリンやカフェイン) が用いられる。水牛精子の体外受精に、カフェイン濃度 (2.5~10.0 /ml) の効果に差はなかったが、BO あるいは mTALP 培養液よりは Tris 緩衝培養液が適していることを明らかにした。また、体外受精に用いる精子濃度を高めるにつれて受精率が高まるが、同時に多精子受精の比率も高まり正常な単精子受精の比率は

2.5x10⁶/ml で最も高くなることから、精子濃度は 2.5~5.0x10⁶/ml が好ましいことを見出した。

3. 受精後の胚発生に影響する要因

卵胞は遠隔地の複数のと畜場から採取する必要がある、と殺後卵胞吸引までの時間的遅れ(2~6時間)がその後の発生、受精率に及ぼす影響を調査した。経過時間が長くなるにつれて、卵子の成熟が自発的に進行する傾向があったが、受精率と胚の発生率に有意な差は認められなかった。一方、交通事情および電力状態が万全でなく培養液の完全な管理が難しい地方では、培養液の品質が卵子成熟と胚の発生能に微妙に影響することが明らかになった。すなわち、液状で市販の TCM 培養液は直接使用でき便利であるが、品質保証期限を越えた使用や不適切な保存管理を余儀なくされ、その間に一部成分などが変質し、むしろ、粉末状で購入した TCM199 の随時調製がより有効であった。

4. 培養液への抗酸化剤添加の有効性

卵子ないしは胚のエネルギー代謝過程で発生する活性酸素が細胞に有害な損傷を与えるが、抗酸化剤であるシステアミンの培養液への添加が酸化障害回避に有効であることがブタやウシで認められている。システアミンの培養液への添加によって、水牛でも卵子内のグルタチオン(還元型アミノ酸の一種)含量が高まり、胚盤胞形成率が高まることが認められ、水牛の胚の培養にもシステアミンの添加が有効であることを明らかにした。

5. 卵子の体外成熟、体外受精過程の経時的推移

卵子の成熟培養に伴う減数分裂の様相を調べ、卵胞は培養開始後8時間後に第1減数分裂を開始し、12~19時間でM₁期に、22~24時間でM₂期の成熟に達することを明らかにした。成熟したM₂期の卵子を精子と共培養して体外受精させた。精子の卵子への最初の侵入は1時間後に認められ、第2極体放出と侵入精子頭部の膨化が5~8時間後に認められた。前核形成は8~11時間に起こり、20時間後に雌雄の核が融合し、受精が完了した。異常な受精の多くは多精子受精および雄性前核形成不全によるものであった。

6. 体外生産された胚からの子牛の生産

改善された条件と培養液を用いて、と畜場から採取した卵胞卵子を成熟培養後に体外受精し、胚盤胞まで培養した胚を各3個ずつ10頭の受卵牛に移植した。この内5頭に移植した胚は体外受精後鶏胚内培養したものであった。その結果、体外で作成し体外培養と鶏胚内培養した胚から、1頭ずつの正常な子牛の生産に成功した。

以上のように本研究は、体外で作成された胚から水牛の産子生産に、インドの研究グループに次いで成功させるとともに、水牛の卵胞ならびに胚の発生に関する多くの知見を得、東南アジアにおける水牛の繁殖技術の発展に大きく寄与することが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 清 水 弘
副 査 教 授 大久保 正 彦
副 査 教 授 田 中 桂 一
副 査 助 教 授 上 田 純 治

学 位 論 文 題 名

Study on the production of awamp buffalo from oocytes matured, fertilized and cultured in vitro.

(体外成熟・受精・培養した沼沢型水牛卵子からの
子牛の生産に関する研究)

本論文は、図 5、表 17 を含む 90 頁からなる英文論文であり、他に参考論文 4 編が添えられている。

フィリッピンにおいて、水牛（沼沢型水牛, swamp buffalo）は、亜熱帯の気候風土に良く適応し、農耕・運搬などの役畜として、また乳と肉生産が農家の補助的収入源として重要な大型家畜であるが、小型化と頭数減少が進んでいる。大型で乳量の優れた河川型水牛（river buffalo, murrrah 種）の国外からの導入を含め、生産性改良の努力が進められているが、ウシに比較して性成熟が晩く交配のための発情兆候が微弱で受胎率が低いなど増殖面での問題を抱えている。その対策として、過剰排卵処理あるいは胚の体外作出と胚移植の実用化が強く要望されている。本研究は、と畜場で得られる卵巣からの卵胞卵子を利用し、成熟培養と体外受精によって作出した胚を移植(ET)することにより、子牛を生産する技術を確立することを目的にしたものである。論文内容は以下のように要約される。

1. 卵胞の成熟に影響する要因

胚を体外で作成する第一段階は、卵巣から摘出した卵子の受精適期までの培養（これを卵子の体外成熟と呼ぶ）で、第一減数分裂による極体の囲卵腔への放出ないしは核の形態によって確認される。卵巣には様々な発育段階の卵胞が存在し、卵子成熟に必要な成分が卵子と付着する卵丘細胞とのギャップジャンクションを介して補給されることから、卵丘細胞に損傷がなく細胞質が均一な卵子ほど成熟率が高く、特に 3 層以上の緊密な卵丘細胞層で包まれた卵子を利用することが望ましいことを明らかにした。また、体外成熟にグルタミンと LH（黄体形成ホルモン）が必須であることも明らかにした。

2. 精子の受精能獲得ならびに体外受精の培養液と精子濃度

精子は通常雌の生殖道(子宮, 卵管)内で受精能力を獲得するが、体外受精に用いるとき

にはそのための処理が必要であり、家畜の種類に適合した培養液(BO, TALP)と添加物(ヘパリン, カフェイン)が用いられる。水牛精子の体外受精に、カフェイン濃度 (2.5~10.0/ml) の効果に差はなかったが、BO あるいは mTALP 培養液よりは Tris 緩衝培養液が適していることを明らかにした。また、体外受精に用いる精子濃度を高めるにつれて受精率が高まるが、同時に多精子受精の比率も高まり正常な単精子受精の比率は $2.5 \times 10^6/\text{ml}$ で最も高くなることから、精子濃度は $2.5 \sim 5.0 \times 10^6/\text{ml}$ が好ましいことを見出した。

3. 受精後の胚発生に影響する要因

卵胞は遠隔地の複数のと畜場から採取する必要があり、と殺後卵胞吸引までの時間的遅れ(2~6時間)がその後の発生、受精率に及ぼす影響を調査した。経過時間が長くなるにつれて卵子の成熟が自発的に進む傾向はあったが、受精率と胚の発生率に有意な差は認められなかった。一方、交通事情や電力状態が万全でなく培養液の完全な管理が難しい地方では、培養液の品質が卵子成熟と胚の発生能に微妙に影響することが明らかになった。すなわち、液状で市販の TCM 培養液は直接使用でき便利であるが、長期間にわたる使用と不適切な保管を余儀なくされ一部成分などが変質し、むしろ、粉末状で購入した TCM199 の随時調製がより有効であった。

4. 培養液への抗酸化剤の添加の有効性

卵子ないしは胚のエネルギー代謝で発生する活性酸素が細胞に有害な損傷を与えるが、抗酸化剤であるシステアミンの培養液への添加が酸化障害回避に有効であることがブタやウシで認められている。システアミンの培養液への添加によって、水牛でも卵子内のグルタチオン(還元型アミノ酸の一種)含量が高まり、胚盤胞形成率が高まることが認められた。

5. 卵子の体外成熟、体外受精過程の経時的推移

卵子の成熟培養に伴う減数分裂の様相を調べ、卵胞は培養開始後8時間後に第1減数分裂を開始し、12~19時間でM₁期に、22~24時間でM₂期の成熟に達することを明らかにした。成熟したM₂期の卵子を精子と共培養して体外受精させた。精子の卵子への最初の侵入は1時間後に認められ、第2極体放出と侵入精子頭部の膨化が5~8時間後に認められた。前核形成は8~11時間に起こり、20時間後に雌雄の核が融合し、受精が完了した。異常な受精の多くは多精子受精および雄性前核形成不全によるものであった。

6. 体外生産された胚からの子牛の生産

改善された条件と培養液を用いて、と体から採取した卵胞卵子を成熟培養・体外受精し、胚盤胞まで培養した胚を各3個ずつ10頭の受卵牛に移植した。この内5頭に移植した胚は体外受精後鶏胚内培養したものであった。その結果、体外培養と鶏胚内培養した胚から1頭ずつの正常な子牛が生まれた。

以上のように本研究は、体外で作出された胚から水牛の産子を生産できることを、インドの研究グループに次いで実証するとともに、水牛の卵胞ならびに胚の発生に関する多くの知見を得、水牛の繁殖技術の発展に寄与すること大である。

よって審査員一同は、Lerma C. Ocampo が博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。