

博士（農 学） 鈴 木 啓 太

学 位 論 文 題 名

ブタ体外受精における精子の受精能に関する研究

学位論文内容の要旨

育種改良技術の進歩とともに、自然交配から、人工授精、さらには体外受精、胚移植といった繁殖技術を組み合わせ、効率的な遺伝的改良を進めることができることになり、家畜の生産性は飛躍的に向上している。胚移植と組み合わせたブタの体外受精は、生体の移動、および、生体同士の接触を伴わないため、疾病の伝播を防ぐことを可能とし、また、その結果得られる特定病原菌を保有しないSPF(Specific Pathogen Free)豚作成への応用に期待がかかっている。さらに、近年になってクローン技術、遺伝子導入技術などの新技術を用いた家畜生産が検討され始めている。これらの新技術を行うためには大量の受精卵（あるいは卵子）を必要とし、体外受精は受精卵を大量に作出する基礎技術として今後重要な位置を占めることが予想される。しかし、ブタでは未だに体外受精の成功例が少なく、体外受精は実用技術として確立していない。このため、本研究では、体外受精の問題を解決し、また、受精機構の解明に必要な基礎知見を得るために、1) 体外受精に用いる精子の処理法を検討し、2) 受精に必要とされる成分を明らかにするため、培地成分が精子の卵子への侵入におよぼす影響を明らかにするとともに、3) 体外受精による単精子受精卵の効率的作出を試み、安定した受精結果を得ることができるブタの体外受精法を確立することを目的とした。論文の内容は以下に要約される。

1. 精子の処理が受精能におよぼす影響

現在行われている体外受精方法では、前培養を行った精子を用いている。また、用いる精子サンプルによって受精結果がことなることが知られている。異なる雄から採取した精液由来の精子を用いて、現在用いられている体外受精を行い、雄間で受精結果に差のあることを確認した。また、精子の前培養時間を1.5時間から8時間にまで延長することで、特定の雄由来の精子の受精能は高まることを明らかにした。さらに、通常の方法で低い受精能を示す精子サンプルから、パーコール法で高い受精能を持つ精子を選別できることを明らかにした。

2. 受精培地のカリウムイオンとナトリウムイオンが精子の受精能におよぼす効果およびその機構

体内での受精が起こる卵管液には、血清成分に近い組成を持つ受精培地に比較して高濃度のカリウムイオンが含まれている。受精培地のカリウムイオン濃度を60mMまで高めたところ、濃度依存的に精子の受精能は高められており、その効果は細胞内遊離カルシウムイオン濃度が高められた結果であることを示した。また、3.1mM濃度のカリウムイオン、およびカリウムイ

オンチャネルの機能が受精に不可欠であることを明らかにした。同時に、ブタ精子では受精時に、膜電位依存性のカルシウムチャネルが活性化されていることを推測した。高濃度のカリウムイオンを含む培地では、浸透圧調整のため、ナトリウムイオン濃度を低下させている。したがって、高濃度カリウムイオン培地で精子の受精能が高められたのは、ナトリウムイオン濃度を低下させたためである可能性があった。そこで、浸透圧およびカリウムイオン濃度を一定にして、ナトリウムイオン濃度を変化させた培地で受精試験を行ない、ナトリウムイオン濃度を低下させても精子の受精能は上昇せず、カリウムイオン濃度を高めたことが精子の受精能を上昇させていることが明らかになった。

### 3. 受精培地の構成成分が精子の受精能におよぼす影響

体外受精に用いる受精培地には、前項で調べたカリウムとナトリウムイオン以外の主要成分として、重炭酸イオンおよびタンパク質が含まれている。重炭酸塩を培地に添加すると、重炭酸イオンとなる。重炭酸イオン- $\text{CO}_2$ は、緩衝系として知られており、培地のpHを調節する作用を持つ。気相中の $\text{CO}_2$ 濃度、および溶液の温度、重炭酸イオン濃度、pHは、常に平衡に達する方向に変化する。これらを一定に調節した条件で、受精培地への重炭酸塩の添加は、精子が受精するためには必要であることを示し、同時に培地に緩衝剤として添加されることのあるHepesには、重炭酸塩に見られる受精に対する効果はなく、同時に阻害作用もないことを明らかにした。さらに、カフェインは、添加する重炭酸塩の存在下で精子の受精能を高めることを示した。また、タンパク質を添加しない受精培地を用いた場合であっても受精は起り、受精時の精子濃度を高めることで高率な受精率を得ることができ、タンパク質無添加培地を用いたブタ体外受精は可能であることを示した。これら得られた結果を基礎に、新たにブタの体外受精に用いる受精培地、Pig-FMを開発した。この培地は、添加する塩化カリウム濃度が高く(12 mM)、塩化ナトリウム濃度が低い(90 mM)こと、さらに他の研究でその有効性が確認されている塩化カルシウム濃度を高く(8 mM)したものである。Pig-FMは、今までにブタの体外受精で受精培地として用いられてきた他の受精培地に比較して、高率な受精率を示し、この培地の有効性を確認した。

### 4. 単精子受精率の向上の方策

ブタ体外受精のもっとも大きな克服すべき問題の一つに多精子受精がある。体内の受精部位である卵管には、高濃度のヒアルロン酸の存在が知られているため、ヒアルロン酸を受精培地に添加し、体内環境を再現することで単精子受精が効率的に起こるかを検討した。ヒアルロン酸は、卵丘-卵子複合体から高濃度に分泌されている一方で、培養卵管上皮細胞からの分泌はわずかであった。さらに、ヒアルロン酸の添加は特に精子に効果をおよぼし、受精能獲得を起こさせることで単精子受精率を高めていることを明らかにした。

以上のように、本論文は、培地の各成分が精子の受精能におよぼす効果について多くの知見を得たことで、ブタにおける受精機構の詳細な解明の基礎となるとともに、新たな精子処理法および受精培地を提示しており、この方法によるブタ体外受精卵の効率的な作出が期待される。

# 学位論文審査の要旨

主査 教授 清水 弘  
副査 教授 田中桂一  
副査 教授 中嶋 博  
副査 助教授 上田純治

## 学位論文題名

### ブタ体外受精における精子の受精能に関する研究

本論文は、図 13、表 40 を含む 175 頁からなる和文論文であり、他に参考論文 5 編が添えられている。

自然交配から、人工授精と精液の凍結保存、過剰排卵と胚移植 (MOET) への繁殖技術の発展と実用化に伴い、家畜の育種改良技術が進歩し、家畜の生産性は大いに高まっている。胚移植と組み合わせたブタの体外受精は疾病の伝播を防ぎ、特定病原菌を保有しない SPF(specific pathogen free) 豚作成への応用が期待され、さらに、クローン技術、遺伝子導入技術などの新技術を用いた家畜生産が検討されている。これらの技術の開発と実用化のためには大量の受精卵ないし卵子を必要とし、体外受精はそのための重要な基礎技術である。しかし、ブタでは体外受精の成功例がわずかであり、体外受精は実用技術として確立していない。本研究では、主として精子の側から体外受精の問題を解決し、受精機構の解明に向けた基礎的知見を得るために、(1)体外受精に用いる精子の処理方法を検討し、(2)受精培地の構成成分が精子の卵子侵入に及ぼす影響を明らかにするとともに、(3)体外受精による単精子受精卵の効率的作出を試み、安定した受精結果を得ることができるブタの体外受精法を確立することを目的とした。論文の内容は以下のように要約される。

#### 1. 精子の処理が受精能におよぼす影響

現在一般に試みられている体外受精法では、受精能獲得のための前培養を行った精子が用いられているが、用いる精子サンプルによって受精結果が異なることが知られている。異なる雄から採取した精子を用いて、体外受精し雄間で受精結果に差のあることを確認した。精子の前培養時間を 1.5 から 8 時間まで延長させることにより、受精率の低い雄からの精子でも受精能が高まること、また、パーコール法で活力の高い精子を選別することにより、受精率を高めることを明らかにした。

## 2. カリウムイオンとナトリウムイオンが精子の受精能におよぼす効果とその機構

生体内で受精が起こる卵管内腔液には、一般に用いられている受精培地に比較して高い濃度のカリウムイオンが含まれていることから、その濃度を 60mM まで高めることにより、精子の受精能が高まり、その効果は細胞内遊離カルシウム濃度が高められたことによるここと、また、最低 3.1mM 濃度のカリウムイオン、およびカリウムイオンチャネルの機能が受精に不可欠であることを明らかにした。同時に、ブタ精子では受精時に、細胞膜の脱分極による細胞内遊離カルシウムイオン濃度の上昇が起こることを考察した。

## 3. 受精培地の構成成分が精子の受精能に及ぼす影響

体外受精に用いる受精培地には、前述の両イオン以外に主要成分として、重炭酸イオンおよびタンパク質が含まれている。重炭酸イオンは培地の pH を調節する作用を持つが、気相中の  $\text{CO}_2$  濃度および溶液の重炭酸イオン濃度および pH は、常に平衡に達する方向に変化し、さらに温度による影響も受ける。これらを一定に調節した条件で、受精培地への重炭酸塩の添加は精子が受精するために必要であり、カフェインは重炭酸塩の存在下で精子の受精能を高めることを明らかにした。また、タンパク質を添加しない受精培地でも受精は起り、受精時の精子濃度を高めることで高い受精率を得ることができた。

これらの知見を基に、ブタの体外受精に用いる新たな受精培地(Pig-FM)を開発した。この培地は添加する塩化カリウム濃度が高く (12mM)、塩化ナトリウム濃度が低い(90mM)こと、さらに、他の研究でその有効性が確認されている塩化カルシウム濃度を高く(8mM)したものである。この培地は、これまでブタの受精培地として用いられてきた培地に比較して、高い受精率を示しこの培地の有効性を確認した。

## 4. 単精子受精率の向上の方策

ブタ体外受精で克服すべき最も大きな課題の一つに多精子受精がある。体内の受精部位である卵管には、高濃度のヒアルロン酸が存在することから、ヒアルロン酸を受精培地に添加し、その有効性を検討した。ヒアルロン酸は、卵丘一卵子複合体から高濃度に分泌されるが、培養卵管上皮細胞からの分泌はわずかであった。ヒアルロン酸の添加は特に精子に良い効果を及ぼし受精能獲得を起こさせることで、多精子受精を抑制し単精子受精率を高めていることを明らかにした。

以上のように、本論文は、培地の構成成分が精子の受精能におよぼす効果について、多くの知見を得、ブタの受精機構の詳細な解明の基礎となるとともに、新たな精子処理法および受精培地を提示しており、この方法によるブタ体外受精卵の効率的な作出が期待される。よって審査員一同は、鈴木 啓太 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。