

学 位 論 文 題 名

Studies on the cytoplasmic morphology,
maturational and developmental ability
of bovine oocytes derived from small antral follicles

（牛胞状卵胞由来卵子の卵細胞質の形態と成熟能および
発生能に関する研究）

学位論文内容の要旨

体外受精や核移植技術を用いた牛胚の体外生産には、食肉用に処理された牛の卵巣に存在する未成熟胞状卵胞内の卵子が活用されている。これらの卵子は体外培養によって成熟させているが、体外受精あるいは核移植後の発生能は低く、実体顕微鏡下で観察される形態学的な特徴によって発生能も異なる。しかし、実体顕微鏡下で観察される卵細胞質の形態と卵子の成熟・発生能、卵細胞質の微細構造および機能の関連を詳細に解析した報告はない。そこで本研究では、牛卵巣に存在する直径 2～8 mm の未成熟胞状卵胞より卵子を採取し、数層以上の卵丘細胞に覆われた未成熟卵子を卵細胞質の直径（115 μm 以上、115 μm 未満）、色調（褐色、淡色、黒色）および卵細胞質内の黒色領域（黒色顆粒、黒色辺縁）の有無によって分類し、以下の実験を行った。

まず、一般的に体外成熟用に選抜・供試されている直径が 115 μm 以上の褐色で黒色領域の認められない卵子と、これよりも卵巣からの回収数は多いが通常は使用されない褐色で卵細胞質に黒色顆粒を有する卵子の核成熟、受精および胚盤胞への発生を比較するとともに、成熟培養前後の卵細胞質の超微形態学的な検討を行った。その結果、両者の核成熟能と卵割後の発生能に差異はなかった。しかし、黒色領域の認められない卵子では成熟培養後も表層顆粒は集塊を形成したままであり、多精子侵入率が高く、卵割率が低かった。一方、黒色顆粒を有する卵子では表層顆粒が卵細胞膜付近に分散しており、卵細胞質成熟の進んでいることが示唆された。

そこで、胞状卵胞から回収される卵子について形態と発生能の関係をより詳細に検討するため、卵細胞質の直径が $115\ \mu\text{m}$ 以上の卵子については 6 種類（卵細胞質が褐色で黒色領域なし、黒色顆粒あり、黒色辺縁あり；卵細胞質が淡色で黒色領域なし、黒色顆粒あり；卵細胞質が黒色）に分け、卵細胞質の直径が $115\ \mu\text{m}$ 未満の卵子と合わせて 7 種類に分類して、成熟培養前の卵子形態と核成熟能、発生能、アデノシン三リン酸（ATP）含有量および卵細胞質の微細構造との関係を精査した。その結果、褐色の卵細胞質を有する卵子のうち黒色領域が認められる卵子は ATP 含有量が多く核成熟能も発生能も高いが、黒色領域の認められない卵子は ATP 含有量が少なく核成熟能は高いものの発生能は低いことが明らかになった。一方、淡色の卵細胞質を有する卵子は ATP 含有量は少なく核成熟能も発生能も低い、卵細胞質内に黒色顆粒が認められる場合は ATP 含有量が多く、一部は高い発生能を有していることがわかった。また、卵細胞質の色調が黒色の卵子は ATP 含有量が多いものの核成熟能および発生能は低く、産生した ATP を利用する機能が破綻していることが示唆された。さらに、超微形態学的な検査の結果、実体顕微鏡下で卵細胞質の色調が褐色を呈する卵子は細胞小器官が卵細胞質全体に均質に分布して異常所見が観察されなかったが、淡色を呈する卵子は卵細胞質に細胞小器官密度の低い領域が存在し、変性過程にあることが示唆された。また、色調が黒色の卵細胞質全域や褐色と淡色の卵細胞質内の黒色領域には多数の脂肪滴が認められた。脂肪滴周囲にはミトコンドリアが集簇しており、脂肪滴貯留が多いほど卵子の ATP 含有量も多いことが明らかになった。直径が $115\ \mu\text{m}$ 未満の小型の卵子では、成熟培養後も表層顆粒の分散が全く見られないなど、未発達の構造が認められ、核成熟能も発生能も著しく低かった。

以上の結果から、卵細胞質が褐色で黒色領域を有する卵子は卵細胞質の構造も機能もほぼ正常に発育した卵子であり、体外成熟培養によって高い発生能を獲得できる卵子であることがわかった。また、淡色の卵子は卵細胞質の構造と機能に異常がみられ始めた変性過程の卵子であり、色調が黒色の卵子はすでに機能異常を呈する変性卵子と考えられた。さらに、小型の卵子は発育過程の卵子であることが確認され、実体顕微鏡下の色調および卵細胞質内の黒色領域の有無によって発生能の高い卵子の選抜が可能となった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 橋 芳 幸
副 査 教 授 梅 村 孝 司
副 査 教 授 昆 泰 寛
副 査 助教授 片 桐 成 二

学 位 論 文 題 名

Studies on the cytoplasmic morphology, maturational and developmental ability of bovine oocytes derived from small antral follicles

(牛胞状卵胞由来卵子の卵細胞質の形態と成熟能および
発生能に関する研究)

学位論文提出者は、食肉用に処理された牛の卵巣に存在する胞状小卵胞(直径 2~8 mm) から採取した数層以上の卵丘細胞に覆われた未成熟卵子(卵細胞質直径 115 μ m 以上)を卵細胞質の色調(褐色、淡色、黒色)と黒色領域(黒色顆粒、黒色辺縁)の有無によって分類し、それぞれの核成熟能、発生能、微細構造およびアデノシン三リン酸(ATP)含有量との関係を精査した。

その結果、1) 褐色の卵子のうち黒色領域を有する卵子はATP含有量が多く核成熟能も発生能も高いが、黒色領域の認められない卵子はATP含有量が少なく、核成熟能は高いものの発生能は低いこと、2) 淡色の卵子はATP含有量が少なく、核成熟能も発生能も低い、黒色顆粒が認められるものはATP含有量が多く、その一部は高い発生能を有していること、3) 黒色の卵子はATP含有量が多いものの核成熟能も発生能も低いことを明らかにした。

また、卵細胞質の超微形態学的検索により、1) 成熟培養前の褐色の卵子は細胞小器官が均質に分布して異常所見は見られないが、黒色領域の認められないものは成熟培養後でも表層顆粒の集塊が認められ、多精子侵入防御能の低いこと、2) 淡色の卵子は細胞小器官密度の低い領域が存在し、変性過程にあること、3) 黒色の卵子の全域、褐色および淡色の卵子の黒色領域には多数の脂肪滴が存在し、脂肪滴の周囲にはミトコンドリアが集簇していることを示した。

さらに、直径が115 μ m 未満の卵子は、成熟培養後でも表層顆粒の分散が見られないなど未発達な構造が認められ、核成熟能も発生能も著しく低いことを明らかにした。

本研究により胞状小卵胞由来牛卵子の卵細胞質の形態と成熟および発生能の関係の一端が明らかとなった。よって、審査員一同は上記学位論文提出者永野 昌志 氏が博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有するものと認めた。