

学位論文題名

IN VITRO PRODUCTION OF PORCINE EMBRYOS USING CHEMICALLY DEFINED MEDIA

（化学的組成の明らかな培地を用いた豚胚の体外生産に関する研究）

学位論文内容の要旨

近年、豚の体外受精技術は改善されてきているものの、体外受精由来胚の生産効率は極めて低く、更なる生産効率の向上と安定した生産技術の開発が望まれている。そこで、本研究では、豚の体外成熟卵子の体外受精率およびその後の胚発生率の向上と安定化を図るため、血清やウシ血清アルブミン（BSA）などの生物学的製剤を添加しない化学的組成の明らかな培地を用いた体外受精および発生培養について検討を行った。

第1章では、化学的組成の明らかな培地を用いた体外成熟卵子の体外受精法を確立するために、体外受精用基礎培地（豚配偶子用培地、porcine gamete medium、PGM）を開発し、その基礎培地（PGM）へのテオフィリン、アデノシンおよびシステインの添加が体外成熟卵子の受精および発生に及ぼす影響について検討した。その結果、PGM へ適量のテオフィリン（2.5 mM）、アデノシン（1 μ M）およびシステイン（0.2 μ M）を添加することにより、受精率および胚盤胞への発生率が改善された。さらに、テオフィリン、アデノシンおよびシステインを添加した PGM（PGMtac）中で受精させた卵子を化学的組成の明らかな発生培地（豚接合子用培地、porcine zygote medium、PZM）を用いて培養して得られた胚盤胞の産子への発生能についても調べた。4頭のレシピエントへ1頭あたり20～25個の胚盤胞を手術的に移植した結果、すべてのレシピエントが妊娠して合計21頭の産子が得られた。

第2章では、第1章で開発した体外受精用の化学的組成の明らかな培地（テオフィリン、アデノシンおよびシステインを添加した PGMtac）の汎用性を検討するために、異なる方法で凍結保存した射出および精巢上体精子、ならびに液状保存した射出精子（計17頭の雄由来）を用いて体外受精を行い、受精率およびその後の胚発生率（PZMを用いて発生培養）を調べた。その結果、凍結保存精子については凍結方法により胚盤胞への発生

率（26～56%）が異なるものの、供試したすべての雄の射出および精巢上体精子から胚盤胞が作出できた（胚盤胞への発生率：14～75%）。また、液状保存精子（1～14 日間保存）については、保存期間が長くなると受精率が低下したが、1～10 日間保存した精子を使用することによって体外受精胚の 20～48%が胚盤胞へ発生することが分かった。

第 3 章では、化学的組成の明らかな発生培養用培地（PZM）を用いた体外受精由来胚の発生培養、とくに PZM へのグルタミン、ハイポタウリン、タウリンおよびアミノ酸溶液の至適添加濃度について検討するとともに、培地交換および BSA 添加の効果についても調べた。その結果、グルタミン、ハイポタウリン、タウリンおよびアミノ酸溶液の添加濃度を調整することにより体外受精胚の胚盤胞への発生能が改善されることが分かった。基礎培地（PZM）中の高分子物質（ポリビニルアルコール）の代わりに BSA を添加しても胚盤胞への発生率には影響がみられなかった。また、培地交換（媒精 72 時間後）により胚盤胞への発生率は改善されず、むしろ胚盤胞の細胞数が減少することが分かった。さらに、グルタミン濃度を 2 mM に修正した PZM を用いた発生培養により得られた体外受精由来の胚盤胞を申請者が開発した非手術的な移植技術を用いてレシピエントに移植して産子への発生能を有することが確認された。

第 4 章では、PZM に添加したグルタミンおよびハイポタウリンの胚発生改善効果について検討を加えた。すなわち、卵割期（媒精後 48～72 時間）におけるグルタミンとハイポタウリンの胚発生に及ぼす影響、ならびに卵割胚内の酸化還元状態や DNA 損傷に及ぼす影響について検討した。その結果、卵割期におけるグルタミンおよびハイポタウリンの存在により胚細胞内 H_2O_2 量や DNA 損傷の減少がみられた。しかし、媒精 72 時間後の卵割胚の細胞数と細胞内グルタチオン含量にはグルタミンおよびハイポタウリンの影響が認められなかった。このことからグルタミンおよびハイポタウリンが卵割胚の酸化ストレスを軽減し、その後の胚発生を促進することが示唆された。

以上のように、本研究により血清や BSA などの生物学的製剤を添加しない化学的組成の明らかな培地を用いた豚の体外生産技術、すなわち、化学的組成の明らかな培地を用いた豚卵子の体外受精および発生培養により胚盤胞を作出する技術を開発することができた。また、この技術により体外生産された胚盤胞を手術的あるいは非手術的にレシピエントに移植して産子への発生能を実証した。

学位論文審査の要旨

主査	教授	高橋芳幸
副査	教授	葉原芳昭
副査	准教授	片桐成二
副査	准教授	佐々木宣哉

学位論文題名

IN VITRO PRODUCTION OF PORCINE EMBRYOS USING CHEMICALLY DEFINED MEDIA

(化学的組成の明らかな培地を用いた豚胚の体外生産に関する研究)

学位論文提出者は、豚胚の体外生産技術の向上と安定化を図るため、血清、牛血清アルブミン（BSA）などの生物学的製剤を添加しない化学的組成の明らかな培地を用いた体外受精および発生培養について検討を行った。

まず、化学的組成の明らかな培地を用いた体外受精技術を確立するために体外受精用の培地（受精培地）について検討を加え、適量のテオフィリン、アデノシンおよびシステインを受精培地に添加することにより受精率および胚盤胞への発生率が改善されることを明らかにした。また、その培地で受精させた卵子を培養して得られた胚（胚盤胞）を手術的にレシピエントへ移植して、移植胚の約25%が産子に発生することを実証するとともに、多数の雄豚から採取して凍結あるいは液状保存した精液を用いて体外受精を行い、開発した受精培地の汎用性を確認した。

ついで、化学的組成の明らかな培地を用いた体外受精由来胚の発生培養技術について検討を加え、発生用の培地（発生培地）へ添加するグルタミン、ハイポタウリン、タウリンおよびアミノ酸溶液の至適濃度を明らかにした。また、この培地への BSA 添加や培養途中での培地交換の必要がないこと、培地へ添加したグルタミンとハイポタウリンが胚の酸化ストレスを軽減して胚発生が促進されることも示した。さらに、非手術的な豚胚の移植法を開発し、化学的組成の明らかな受精培地および発生培地を用いて作出した胚（胚盤胞）をレシピエントへ移植して産子の生産に成功した。

本研究により、化学的組成の明らかな培地を用いた豚卵子の体外受精および体外受精由来胚の発生培養の技術（豚胚の体外生産技術）が開発された。よって、審査員一同は上記学位論文提出者 鈴木千恵 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。