

(学位第8号様式)

No. 1

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏名	江頭 潤将
審査委員	主査 佐賀大学 教授 和田康彦
	副査 佐賀大学 准教授 山中賢一
	副査 琉球大学 教授 建本秀樹
	副査 鹿児島大学 教授 三好和睦
	副査 琉球大学 准教授 金野俊洋
審査協力者	印
題目	経膣採卵を用いたウシ体外胚生産系の高度化に関する研究 Study on improvement of <i>in vitro</i> embryo production system using ovum pick-up
<p> 生きた家畜から繰り返し卵母細胞を採取することが可能な経膣採卵(OPU)法と体外受精(IVF)技術を組み合わせた体外胚生産系はウシの育種改良におけるメリットが多く、国内でも技術の活用の広がりを見せており、今後の需要拡大も期待される。また、近年の気候変動に起因すると考えられる夏季の高温環境はウシの人工授精における受胎率低下といった繁殖成績にも悪影響を及ぼしており畜産農家の経済的損失を引き起こしている。胚は発育ステージによって高温に対する感受性が異なることが知られており、受精後7日目の胚盤胞期胚はそれ以前の発生初期の胚よりも高温環境に強いことが報告されている。したがって、高温耐性を持つステージまで体外の一定環境下で胚を培養し、それらを移植する体外胚生産と胚移植の併用が夏季の低受胎率対策に有効であると考えられている。これらのことから、体外生産胚の利用はウシの遺伝的改良を効率的にするだけではなく、夏季における受胎率低下の回避策としても期待される。しかしながら、体外生産胚は体内生産胚と比較して品質が低いこと、さらに移植後の受胎率や凍結保存後の生存率も低いことが生産現場レベルにおいて大きな問題となっている。そこで、本研究では黒毛和種牛において高品質な体外生産胚をOPUを用いて効率的に生産することを目的とした。 </p> <p> まず、OPUによる胚生産を日常的に行うためには、生体内での生殖細胞の季節間での品質変化 </p>	

を明らかにすることが重要であることから、暑熱期と冷涼期にOPUを行い生体内卵母細胞の特徴解析を行った。暑熱期において直腸温および呼吸数の上昇といった暑熱ストレスの影響が観察されたが、OPU時の卵胞数や採取された卵丘 - 卵母細胞複合体(COCs)の形態学的グレードについては両区間で違いは認められなかった。一方で、暑熱期では卵丘細胞のアポトーシス細胞数が増加し、ミトコンドリアの異常分布がみられる卵母細胞の割合が増加した。以上のことから、夏季の黒毛和種牛においては暑熱ストレスの影響により生体内COCsの品質が低下していることが明らかとなり、夏季のOPUによる胚生産ではこれらに対する新たな対策の必要性を示した。

体外生産胚の発生能に影響を与える最も重要な要因として卵母細胞の品質が挙げられる。一般的なOPUを用いた胚生産では未成熟卵母細胞が採取され、体外成熟後にIVFに用いられるが、本研究では、体内で成熟した卵母細胞を体外胚生産に用いた時の有効性について調査した。体内成熟卵母細胞を採取するためのホルモン処理による卵母細胞の採取数への影響は認められなかった。一方、細胞質成熟の指標である表層顆粒の分布を調べたところ、体内成熟卵母細胞の方が体外成熟卵母細胞よりも正常な分布を示すものの割合が有意に高かった。また、分割率および胚盤胞発生率に有意な差は認められなかったが、正常卵割率および凍結可能胚数、正常卵割由来の移植可能胚の割合は体内成熟卵母細胞を用いた場合で体外成熟卵母細胞を用いた場合と比べて有意に高かった。さらに、正常卵割由来胚の受胎率は異常卵割由来胚と比較して有意に高かった。よって、体内成熟卵母細胞を用いた胚生産は、体外での移植可能胚の生産性を向上させるとともに、移植後に高い受胎率が望める正常卵割由来胚をより多く生産できることが示された。

次に、タイムラプスシネマトグラフィシステムを用いてIVF後の胚の発生動態を観察した後、個々の胚を移植することで発生動態と受胎性との関係を調査した。体内および体外成熟卵母細胞由来に関わらず、胚の卵割時間と受胎の成否との関係は認められなかった。一方で、使用した精液の種雄牛ごとに第1卵割時間を調べた結果、卵割時間は使用した精液の由来に大きく影響を受けることが明らかとなった。また、正常な第1卵割を経た胚では受胎率が高い傾向が認められた。以上のことから、高品質胚を選抜するためには移植前の形態学的な評価に加えて、第1卵割の正常性を指標とすることが簡便かつ客観的な方法であることが示唆された。

本研究の結果、生体卵巣内のCOCsに対する暑熱ストレスの影響が明らかになるとともに、体内成熟卵母細胞を用いることで高品質な胚を効率的に生産できることが示された。また、第1卵割パターンを観察することで受胎の可能性の高い胚を選択することができ、従来の胚の評価法と組み合わせることで受胎率の向上が期待される。これらの知見は、OPUを用いた体外胚生産系の高度化に大きく寄与するものであると考えられる。

よって、本論文は、博士(農学)の学位論文として十分な価値を満たしているものと判定した。