

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	北地 秀基
審査委員	主査 鹿児島大学 准教授 三好 和睦
	副査 鹿児島大学 准教授 大久津 昌治
	副査 琉球大学 教授 建本 秀樹 (
	副査 鹿児島大学 教授 佐藤 正宏
	副査 鹿児島大学 教授 上西 由翁
審査協力者	印
実施年月日	平成27年 1月20日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input type="checkbox"/> 口答・筆答	
<p>主査及び副査は、平成27年1月20日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏 名	北地 秀基
<p>[質問 1] 物理的刺激を与えながら媒精する試みは、本研究以外でも行われているのか。また、それらの研究では多精子受精を抑制することができたのか。</p> <p>[回答 1] 現在のところ、媒精時に回転培養処理を行っている研究報告は見られないが、振動させながら媒精した研究が報告されている。その研究では、多精子受精は軽減されたものの、満足できるレベルではないと報告されている。</p> <p>[質問 2] 本研究では多精子受精卵と単一精子受精卵を選別して培養したのか。また、これらの発生率に違いはあるのか。</p> <p>[回答 2] 媒精後に多精子受精卵と単一精子受精卵を選別する方法はあるが、その過程で受けるダメージにより受精卵の発生が著しく低下するので、本研究では選別しなかった。多精子受精卵も胚盤胞まで発生することを報告している研究がいくつか存在するが、発生率は単一精子受精卵と比較して低くなっている。</p> <p>[質問 3] 受精直後に多精子受精卵と単一精子受精卵を非侵襲的に選別することはできないのか。</p> <p>[回答 3] 現在のところ、非侵襲的に選別する方法はない。この点は今後の研究課題としたい。</p> <p>[質問 4] 緑茶由来ポリフェノールの最適な添加濃度は0.01%という結果になっているが、これは緑茶由来ポリフェノールの主成分であるエピガロカテキンが細胞障害を起こす濃度である。本研究では細胞障害は見られなかったのか。</p> <p>[回答 4] 本研究を行う前に、0.01%の緑茶由来ポリフェノールを添加した保存液で1~2週間液状保存した精子の性状を確認した。その結果、緑茶由来ポリフェノールを添加しなかった場合と比較して精子性状が明らかに悪化するようなことはなかったため、細胞障害はないと判断して本研究に供試した。</p> <p>[質問 5] 回転培養処理では、密閉状態で体外受精を行っているため精子が酸欠を起こし、活力が低下して多精子受精が減少したのではないか。また、密閉状態であることが卵子に悪影響を及ぼした可能性はないのか。</p> <p>[回答 5] 本研究では、静置培養した区および回転培養した区のいずれにおいても密閉状態で体外受精を行っている。それにもかかわらず、多精子受精卵の割合が静置培養した区で高く、回転培養した区で低くなったので酸欠の影響ではないと思う。また、本研究における受</p>	

精卵の発生率は、インキュベーター内において密閉しない状態で媒精した場合と比較して遜色ないので、密閉状態が卵子に悪影響を及ぼしている可能性はないと考えている。

[質問 6] ブタ A よりブタ B の方が精液性状検査の結果が良かったにもかかわらず、体外受精卵の作出にブタ B ではなくブタ A を使用したのはなぜか。

[回答 6] 実験期間中にブタ B が体調を崩して死亡してしまったからである。また、予備実験においてブタ B の精子を用いて体外受精を行ってみたが、精液性状検査の結果から期待されたほどは受精率や発生率が良くなかったため、体外受精卵の作出にはブタ A を用いた。

[質問 7] 媒精時の回転処理によって単一精子受精率が改善した要因は、精子側にあるのか。回転の刺激により、卵子の多精子受精拒否機構が活性化された可能性はないのか。

[回答 7] 主な要因は精子側にあると考えている。回転培養処理により卵子がチューブ内を常に移動することによって、精子が卵子に集まるという特性が阻害されたため単一精子受精率が改善したのではないかと思う。回転処理による刺激が卵子の多精子受精拒否機構に及ぼす影響については、今後検討したい。

[質問 8] 本研究のような緑茶由来ポリフェノールを添加する実験は、他の研究報告でも見られるのか。

[回答 8] 現在のところ、イヌ精子の液状保存液に緑茶由来ポリフェノールを添加した実験が 1 件あるのみで、本研究と同じように凍結前の精子保存液に緑茶由来ポリフェノールを添加した研究報告は見られない。

[質問 9] 本研究では、緑茶由来ポリフェノールを精子保存液にしか添加していない。凍結保存液にはなぜ添加しなかったのか。

[回答 9] 凍結保存液に緑茶由来ポリフェノールを添加する予備実験を行った結果、効果が認められなかったからである。凍結保存中の精子は代謝がほぼ停止しており、活性酸素が発生しない状態にあるため、抗酸化剤である緑茶由来ポリフェノールを添加しても効果が無いのだと思う。

[質問 10] 体外受精時にも活性酸素が発生するが、緑茶由来ポリフェノールを体外受精用培地に入れた研究報告はあるのか。

[回答 10] 現在のところ、ブタ卵子の体外受精用培地に緑茶由来ポリフェノールを添加した研究報告は見られないが、ウシ卵子においては体外成熟、体外受精および発生培養時に緑茶由来ポリフェノールを添加した実験がいくつか報告されている。緑茶由来ポリフェノールを添加した培地中で媒精したブタ卵子の受精状況および発生状況については、今後検討したい。