

氏名	岩田尚孝
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	論農博第2255号
学位授与の日付	平成11年7月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	牛胚の体外培養における活性酸素産生機構の解明と産子生産に及ぼす影響に関する研究
論文調査委員	(主査) 教授 今井 裕 教授 宮本 元 教授 佐々木義之

論文内容の要旨

牛体外受精卵を用いた受精卵移植は、我が国において産肉性の高い肥育素牛の大量生産に広く用いられている。しかし、体外受精卵はその卵質が体内受精卵より劣り、受胎率や移植後の産子の生産性が低く、体外で培養した受精卵を受卵牛に移植して得られた産子の生時体重が著しく大きいことも知られている。このことは、体外培養環境中に受精卵に傷害を及ぼす要因があるためと考えられており、このような要因を同定し、除去することは、胚および産子の生産性の向上に貢献できるものと考えられる。

胚の体外培養環境と体内培養環境の大きな違いの一つに、気相条件中の酸素分圧の差があり、高濃度の酸素分圧は活性酸素産生を引き起こすことが知られている。しかし、牛の体外培養環境中でいかなる要因を起因にして、どのような反応によって活性酸素が産生しているかは知られておらず、さらに体外受精卵に由来する産子過大現象の原因については、ほとんど推測の域を出ていなかった。

本論文では、牛胚の体外発生に大きな影響を及ぼすことが知られている培養液中のグルコース濃度と酸素濃度に着目し、これらと胚内における活性酸素産生の関係や産生機構を解明し、産子の過大現象を詳細に検討した上で、活性酸素産生の抑制が産子の生産性に与える影響について検討した結果をまとめた。

第2章では、体外受精卵の胚盤胞期胚への発育率を指標にして、高濃度のグルコース存在下における酸素濃度および抗酸化剤の培養液への添加が、胚発生に及ぼす影響について検討した結果、高濃度のグルコースの存在が胚内での活性酸素の産生を促していることを示した。

第3章では、胚内のキサンチンオキシダーゼ(XOD)とヒポキサンチン(HXT)の反応に着目し、XOD、HXTおよびXOD阻害剤(アロプリノール)の培養液への添加とグルコース濃度および酸素濃度が胚発生率に及ぼす影響について検討した。その結果、体外培養環境中でXODとHXTの活性酸素産生は高酸素の気相条件や、高濃度のグルコース条件下における反応により活性酸素が産生され、牛胚の体外発生能を損なっており、この現象は高酸素の気相条件や高濃度グルコースの存在下で助長されることが明らかになった。

第4章では、遺伝的に比較的斉一な牛群を用いて、体外受精卵に由来する産子の体重と、体内受精卵に由来する産子体重を比較検討した。その結果、体外受精産子の過大現象は雄において顕著に見られることが明らかになった。また、この現象は、妊娠期間の延長による体重増加によるものではないことを示した。そこで、アロプリノールを培養液に添加しXODとHXTの反応による活性酸素産生を抑制した条件下で体外受精卵を生産し、移植したところ、得られた産子の生時体重を体内受精卵由来の産子と同程度まで低下させることができた。

以上のことから、牛胚の体外培養環境中では、高酸素濃度の気相条件や高濃度のグルコースに起因した卵子内でのXODとHXTの反応により活性酸素が産生され、これが牛胚の体外発生能に害作用を及ぼすと同時に、受卵牛に移植後の胎児の発育にも影響を与えていることを明らかにした。さらに、活性酸素産生反応を抑制する条件下で、牛体外受精卵を発生させることによって、産子の過大現象の制御が可能であることを示した。

論文審査の結果の要旨

体外環境下で受精・発生させた牛胚から、受精卵移植によって産肉性の高い肥育素牛を大量生産するシステムは、日本独自の畜産生産形態として、技術確立が求められている。しかし、体外で生産された胚は、自然条件下で生産された胚と比べ、胚移植後の受胎率が低く、分娩された産子の生時体重は著しく過大化し、しばしば子牛生産に大きな阻害要因となってきた。

体外と体内環境の大きな違いの一つに、受精卵や胚が発生する培養液中の酸素濃度の差があげられる。一般的に、体外の培養条件下では、高濃度の酸素分圧が用いられ、このことが胚内での活性酸素の産生を引き起こし、結果的に体外培養胚の品質を低下させていると考えられている。しかし、どのような機構によって活性酸素が産生され、胚発生の阻害や過大子の出現に関係しているのかについては知られていない。

本論文では、牛胚の体外発生に大きな影響を及ぼすことが知られている、体外培養液中のグルコース濃度と酸素濃度に注目し、これらと活性酸素産生との関係やその産生機構を解明するとともに、活性酸素の産生を抑制した条件下で培養した牛胚由来の産子の生産性について検討している。得られた主な結果は以下の通りである。

1) 培養液中のグルコース濃度と活性酸素産生との関係を検討した結果、高濃度のグルコースは牛胚の発生を阻害し、抗酸化剤の添加によってこの阻害作用は解除された。低酸素濃度下や低濃度グルコース存在下では、胚発生阻害作用は認められないことから、高酸素・高グルコース存在下で産生された活性酸素が胚発生を抑制していると考えられた。

2) 活性酸素産生系として、キサンチンオキシダーゼ (XOD) およびヒポキサンチン (HXT) 反応系が関与する可能性について検討した。その結果、体外環境下での XOD と HXT の反応による活性酸素の産生が、牛胚の発生阻害の原因となっており、この現象は高酸素の気相条件や高濃度グルコースの存在下で助長されることが明らかとなった。

3) 遺伝的に比較的均一な牛群を用いて、体外受精卵に由来する産子の体重と、体内受精卵に由来する産子の体重を比較検討した。その結果、体外受精に由来する産子の過大化現象は、妊娠期間の延長にともなう体重増加ではなく、体外培養環境の違いによって生じるものであり、特に雄産子において顕著に観察された。しかし、胚内で活性酸素の産生に関与している XOD の阻害剤 (アロプリノール) を添加した培養液中で培養した牛胚を移植したところ、得られた産子の生時体重を体内受精卵由来の産子と同レベルまで低下させることが可能となった。

以上のように本研究は、体外環境下で培養した牛胚は、高酸素濃度や高グルコース存在下の胚内で産生された活性酸素により、胚発生時に大きな害作用を受けると同時に、胚移植後の受胎性や子牛生産を左右する大きな要因となっていることを明らかにしている。さらに、胚内の活性酸素の産生を抑制することによって、過大子の出現を回避できる体外培養系を提唱したものであり、家畜繁殖学、家畜生産学、生殖生物学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 11 年 5 月 20 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。