

## (論文内容の要旨)

ウシにおける効率的な育種改良と増殖を目指すために、凍結胚の移植を生産の基盤技術としているわが国において、移植後の低受胎率が大きな問題となっている。その原因の一つとして、凍結・融解時の胚へのダメージによる細胞数の減少があげられる。すなわち、着床前期の伸長胚の栄養膜細胞から、母体に放出される妊娠認識因子であるインターフェロン・タウが、胚細胞数の減少によって、結果的に分泌量の低下をまねくことが推察される。一方、この伸長胚の栄養膜細胞から作出される栄養膜小胞 (bTVs) は、黄体退行抑制作用を有し、胚の受胎性を向上させることが示唆されている。本論文は、bTVs の効率的な作出と凍結保存、胚との共移植による受胎促進効果と産子への影響および利便性の高い bTVs との共移植法について検討し、bTVs を利用したウシ凍結胚の受胎率向上技術の確立を目的とした。

まず、bTVs の作出素材となる伸長胚の生産方法および胚から bTVs の効率的な作出法を検討した。さらに、bTVs の凍結について、融解後直ちに雌ウシに移植可能な生存性の高い bTVs の凍結保存液について検討した。複数の体外受精胚を雌ウシに移植し、子宮から回収した伸長胚から bTVs を作出する方法は、移植胚数が少数では伸長胚の採取成績および bTVs の作出成績ともに低率であったが、移植胚数の増加あるいは採取日齢を延長した場合に作出成績は改善され、過剰排卵処理と人工授精による従来の bTVs 作出法と同等の成績が得られた。bTVs の凍結保存液としては、エチレングリコール単独の場合が、ショ糖またはトレハロースを添加した凍結媒液と比較して、融解後の生存性が向上した。これらの結果から、体外受精胚の複数移植による bTVs の作出は、供胚牛へのホルモン剤投与や人工授精処理を必要としないため、省力的かつ低コストであることを示した。

ついで、切断2分離胚を低受胎胚のモデルとして用い、体外受精胚由来の bTVs との共移植が、胚の受胎性および胎子の発生や発育に及ぼす影響について検討した。さらに、完全体外培養系で長期間継代培養した栄養膜細胞由来の bTVs の受胎促進効果についても検討した。胚のみの移植と比較して、bTVs との共移植が妊娠初期の受胎率を有意に高めることが明らかとなった。また、共移植による産子は、在胎日数と生時体重において非共移植の産子と差がなく、外貌上通常の産子と変わらないことを確認した。その一方で、長期間継代培養した栄養膜細胞に由来する bTVs との共移植では、伸長胚由来 bTVs との共移植あるいは非共移植の場合と比較して、受胎成績および産子生産成績が低下した。以上の結

果から、bTVs の共移植は、低受胎胚の受胎率改善に有効であることが明らかとなり、子宮内で胎子の発育や発生には悪影響を及ぼさないと考えられた。一方、継代培養由来 bTVs には胚の受胎促進効果はなく、培養の過程でその効果は失われていくことが示唆された。

最後に、凍結保存後の bTVs の黄体退行抑制作用を検証するとともに、胚と bTVs を同一ストロー内で凍結・融解後に共移植を行う、いわゆるダイレクト共移植法による受胎率の向上について検討した。エチレングリコールを用いて凍結した bTVs を移植した際の発情周期は、保存液のみを投与した対照群と比較して延長する傾向を認めた。また、ダイレクト共移植は、従来の胚のみのダイレクト移植に比べて、凍結胚の受胎率が高まる傾向を示した。これらの結果から、新鮮な bTVs と同様に凍結保存後の bTVs も黄体退行抑制効果を有し、胚との簡易なダイレクト共移植により、凍結胚の受胎率を向上させうることが示された。

以上のことから、体外受精胚を用いて効率的に bTVs が作出でき、これらは凍結後も黄体退行抑制作用を有することが示された。bTVs と胚を同時に凍結保存し、適時融解して共移植する方法は、利便性が高く、簡易に凍結胚の受胎率を向上させうる可能性を示した。本研究により、bTVs の作出から保存および共移植にいたる bTVs を利用した体系的なウシ凍結胚の受胎率向上技術が開発された。

氏名

橋谷田 豊

(論文審査の結果の要旨)

胚移植技術は、ウシにおける効率的な育種改良・増殖を図る上での基盤技術となっている。特に、わが国では、移植する胚として、長期保存が可能な凍結胚を用いることが多く、胚移植後の受胎率の低下が大きな問題となっている。この受胎率の低下は、妊娠認識因子として着床時に胚から分泌されるインターフェロン・タウ(IFN $\tau$ )が、凍結・融解による胚へのダメージにより、その分泌が低下するためであると推察されている。そこで、本研究では、IFN $\tau$ の産生源となる栄養膜小胞(bTVs)をウシ伸長胚の栄養膜細胞から様々な手法で調製し、bTVsを胚とともに共移植することによって、妊娠の維持と受胎率向上に対する効果について検討している。得られた結果の概要は以下の通りである。

1. 体外受精胚を移植し、雌ウシから回収した伸長胚から bTVs を調製した。形態的な品質は、体内受精胚に由来する bTVs と同等であった。体内受精胚の生産には、ホルモン投与による過剰排卵処理や人工授精が必要であり、体外受精卵を用いた bTVs の作出法は簡便で有効な bTVs 作出法であることを明らかにした。

2. bTVs の液体窒素下での長期的保存技術について検討した結果、エチレングリコールを凍結保護剤として用いることで、bTVs の生存性を維持しながら長期間の凍結保存が可能になった。

3. 体外受精胚由来の bTVs が胚移植後の受胎に及ぼす影響を検討した結果、胚単独の移植に比べて、bTVs と胚との共移植は受胎率を有意に高めることを明らかにした。

4. 長期間体外で培養した栄養膜細胞に由来する bTVs を作製し、これらの bTVs と胚との共移植を試みたが、受胎促進効果は認められなかった。栄養膜細胞の長期間の培養により bTVs の受胎促進効果が消失することが示唆された。

5. 受胎に対する bTVs の有効性を生産現場で検証するために、胚と同一の凍結ストロー内で bTVs を凍結保存し、両者を同時に胚移植する簡便なダイレクト共移植システムについて検討した。その結果、bTVs とのダイレクト共移植によって、凍結胚単独移植より受胎率が高まることを示すとともに、bTVs には妊娠維持に必要な黄体維持機能があることを明らかにした。

以上のように、本論文は、胚移植技術が効率的なウシ生産を行ううえで基幹技術でありながら、凍結保存胚の移植において受胎率の低下を招いている状況を、受胎時期の胚細胞との共移植によって、受胎性を高めるなど、生産現場に有用な技術情報を提供したものであり、家畜繁殖学、家畜飼養学、家畜管理学など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20年4月17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。