

氏 名	キム 金	カオン 光	ショク 植
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)		
学 位 記 番 号	農 博 第 933 号		
学位授与の日付	平 成 9 年 3 月 24 日		
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当		
研究科・専攻	農 学 研 究 科 畜 産 学 専 攻		
学 位 論 文 題 目	EFFECTS OF FOLLICULAR FACTORS ON IN VITRO MATURATION OF BOVINE OOCYTES (ウシ卵子の体外成熟における卵胞因子の効果)		
論文調査委員	(主 査) 教 授 宮 本 元	教 授 佐々木義之	教 授 矢野秀雄

論 文 内 容 の 要 旨

家畜においては、体外で成熟および受精した胚の発生率は体内で成熟、受精したものに比べ極めて低く、この原因についていくつかの問題点があげられている。その中でも卵子の性状とその成熟条件が重要であることが示唆され、現在も多くの研究が行われているが十分には解明されていない。本論文は、ウシ卵子を用いて、体外成熟培地への卵胞液の添加が体外受精後の胚発生に与える影響、および卵子を取り囲む卵丘細胞と放線冠細胞の卵子成熟過程における役割について検討したものである。主な内容は以下のとおりである。

ウシ卵胞から採取された卵胞液を無血清成熟培地に10%添加することにより、体外成熟卵子の体外受精後の発生能力、すなわち胚盤胞期への発生率および発生した胚盤胞期胚の細胞数が増加することを明らかにした。さらに受精後の胚発生を促進する卵胞液中の因子について検討した結果、分子量10,000以上の分画に胚盤胞期胚への発生を促進する因子が存在することが判明した。これらの結果は、卵胞液中には卵子成熟を促進する因子が含まれており、その促進因子は分子量10,000以上の物質であることを示している。

卵丘細胞および放線冠細胞がウシ卵子の成熟、受精および発生に対してどのような影響をおよぼすかについて検討した。卵子に付着している卵丘細胞あるいは放線冠細胞をあらかじめ分離調整し、放線冠細胞のみ付着した卵子には分離した卵丘細胞を添加し、完全に裸化した卵子には分離した卵丘細胞と放線冠細胞を添加して、卵子を培養した。その結果、放線冠細胞を付着した卵子では卵丘細胞の添加の有無にかかわらず体外受精後、高率に胚盤胞期へ発生した。しかし、裸化卵子では卵丘細胞と胚盤胞期細胞を添加することによって受精後の8-16細胞期への発生率が向上したが、胚盤胞期への発生は認められなかった。

卵子の成熟開始時間は、卵丘細胞が付着した卵子においては裸化卵子に比べて延長する傾向を示したが、成熟培養開始24時間後において成熟を完了した卵子の割合および受精率は、卵丘細胞あるいは放線冠細胞のみを付着した卵子、そして裸化卵子のいずれの卵子においても同等であった。しかし、成熟培養開始後16時間までに、卵子から卵丘細胞および放線冠細胞が取り除かれることによって、その卵子の体外受精後

の発生能力は低下することが明らかになった。以上の結果から、ウシ卵子の体外受精後の発生能力の獲得には、少なくとも卵子の成熟培養の間、放線冠細胞の存在が必須であり、その発生能力は、成熟培養開始後16時諸の間に放線冠細胞から賦与されることが示された。

次に、卵子成熟過程における卵子細胞質中の成熟促進因子の活性を測定した。その結果、成熟促進因子の活性のレベルおよび変動パターンは卵子の卵丘細胞の付着の有無には全く影響されないことから、成熟期間における卵子の成熟促進因子活性は卵子の受精後の発生能とは無関係であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

最近、体内受精によって発生したウシ初期胚を用いたクローン動物や、遺伝子導入によるトランスジェニック動物の作製技術、そして受精卵移植技術の発展にともない、より多くの体外受精卵が必要になってきた。しかし、ウシ卵子の成熟および発生機構は十分に解明されておらず、体内成熟卵子と同様の発生能力を持つ体外成熟卵子を大量に得ることは困難である。本研究は、ウシ卵子の成熟過程における卵胞液および卵子の周囲に付着している卵丘細胞と放線冠細胞の役割を検討し、体外成熟卵子の受精後の発生能力を向上させることを目的としている。得られた成果のうち評価すべき主な点は以下のとおりである。

1. ウシ小卵胞中の卵胞液を低濃度（10%）添加した無血清成熟培地中で卵子卵丘複合体を成熟させることによって、卵子の体外受精後の胚盤胞期胚への発生能力は増加し、その胚の細胞数が体内で発生した胚のものに匹敵することから、卵胞液中には卵子の成熟を促進する因子が含まれていることを明らかにした。さらにその促進因子が、分子量10,000以上の卵胞液分画中に存在することを確認した。

2. ウシ卵子の体外成熟における卵胞細胞の役割を究明するため、卵丘細胞および放線冠細胞が卵子の成熟、受精およびその後の胚発生におよぼす影響を検討した。体外受精後の卵子の正常な発生を維持するためには、少なくとも卵子の成熟期間の間、放線冠細胞の卵子への付着が必須であることを明らかにした。また受精後の卵子の発生能力は、成熟培養開始後16時間の間に卵丘細胞、とくに放線冠細胞から賦与されることを明らかにした。

3. ウシ卵子における成熟促進因子の活性の変動は卵子の核成熟過程にともなって起こり、またその変動は卵丘細胞の有無による影響を受けないことを明らかにした。

以上のように本論文は、ウシ卵胞液を利用して良質受精卵を効率よく生産する方法を開発し、卵子の成熟と発生における放線冠細胞および卵丘細胞の役割にも考察を加えたものであり、家畜繁殖学並びに生殖生理学に貢献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9年2月14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。