

氏 名	はし 橋 もと しゅう 周
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2383 号
学位授与の日付	平 成 13 年 5 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	ウシ卵子の体外受精後の発育能に影響する体外成熟培養時の諸要因に関する研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 今 井 裕 教 授 佐々木義之 教 授 宮 本 元

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、ウシ未成熟卵子の体外での成熟培養条件に着目し、体外成熟の作用機序を明らかにするとともに、異なった条件下で成熟した卵子の体外受精後の発育能への影響を検討することを目的としている。

第二減数分裂中期で停止しているウシ未成熟卵子を卵巣から取り出し、体外で成熟・受精・培養後、発育した胚を受胎雌牛に移植することにより産子の生産が可能になっている。しかし、その生産効率は体内で成熟した卵子を体外で受精・培養した場合に比べて低く、その原因の一つは未成熟卵子の体外成熟条件にあることが指摘されてきた。特に、ウシ未成熟卵子を取り巻く卵丘細胞の存在、活性酸素の産生に直接的に作用するグルコースおよび培養時の酸素濃度などは、卵子細胞の生存性のみならず、成熟卵子の個体生産能に大きな影響を及ぼすと考えられる。

本論文では、体外受精後のウシ卵子の胚盤胞期への胚発生能を指標にして、これらの要因がどのような機序で作用し、体外受精後の胚の発育能に影響を及ぼしているのかについて検討した。得られた結果の概要は以下の通りである。

1. ウシ未成熟卵子の成熟培養液中に存在する卵丘細胞密度が卵子の発育能に及ぼす影響について調べたところ、ウシ未成熟卵子と卵丘細胞間のギャップ結合が存在している場合、卵丘細胞は成熟培地に適正な密度で存在することにより成熟卵子の体外受精後の発育を支持できることが明らかとなった。さらに、卵丘細胞より分泌される液性因子が、ウシ卵子の体外受精後の発育能を支持する上で重要な役割を果たしている可能性が示唆された。しかし、ギャップ結合が存在しない場合、卵丘細胞による成熟卵子の発育能への影響は認められなかった。以上のことから、少なくとも1層以上の卵丘細胞に囲まれたウシ卵子を適切な卵丘細胞密度下で成熟培養を行えば、ウシ卵子の持つ発育能を十分に支持できることが明らかとなった。
2. ウシ生体から経腔的に回収された卵丘細胞の付着の少ない品質の低下した未成熟卵子を適切な濃度の卵丘細胞存在下で成熟培養を行ったところ、これらの卵子は高率に胚盤胞期胚に発育し、胚を受胎雌牛に移植することにより産子の生産が可能であることを示した。
3. 成熟培養液中のグルコース濃度がウシ卵子の発育能に及ぼす影響について調べたところ、ウシ卵子の発育能を支持するうえでグルコースの存在は必要であるが、高濃度のグルコースを含む培養液中で体外成熟を行うと、卵子内の活性酸素が増加し、それを除去する働きをもつグルタチオンが卵子内で減少することによってウシ卵子の体外受精後の発育能が低下することを明らかにした。
4. 20%の酸素を含む高酸素分圧下では、ウシ卵子の体外成熟後の発育能が低下することから、生体内の卵巣内卵胞の酸素分圧に相当する5%酸素下でのウシ卵子の体外成熟培養系について検討した。その結果、低酸素下ではグルコースを基質とする解糖系により生産されるATPがウシ卵子の核成熟の進行に重要であり、低酸素下と高酸素下とではATPを合成する代謝回路が異なることを明らかにした。また、低酸素下での体外成熟によって卵子内の活性酸素量は低下するとともに、体外受精後の発育能が改善されることを明らかにした。

本研究によって、ウシ未成熟卵子の体外成熟にともなって起こる卵子の成熟に必要な培養条件のいくつかを明らかにすると同時に、体外受精卵の発育能を改善する新たな体外成熟培養系が開発された。

論文審査の結果の要旨

屠畜場で廃棄される卵巣内には多くの未成熟卵子が存在する。これらを体外で成熟させ、精子との体外受精の後に個体生産に有効活用できれば、家畜の効率的増産に寄与するところが大きい。しかし、一般的にこの手法を用いた個体生産効率は低く、その主たる原因は未成熟卵子の体外成熟培養条件に帰すると考えられている。そこで本論文では、体外成熟条件、特に卵子を取り巻く卵丘細胞、卵子のエネルギー代謝、培養液中の酸素濃度、卵子内での活性酸素の産生がウシ卵子の体外成熟に及ぼす影響を体外受精後の胚発生能を指標にして検討したものであり、評価すべき主な点は以下の通りである。

1. 未成熟卵子を取り巻く卵丘細胞はギャップ結合を介して卵子の成熟を促進すると同時に、卵丘細胞から分泌される液性因子も成熟とその後の胚発生能に重要な働きをしていることを明らかにした。
2. 体外成熟培養系への適切な濃度の卵丘細胞の添加によって、低品質の未成熟卵子の成熟が誘導され、受胎雌牛への移植によって子ウシの生産が可能であることを示し、高能力牛の未成熟卵子の有効利用に道を開いた。
3. 体外成熟培養時のグルコースの存在は卵子の成熟とその後の胚発生に必須であるが、培養液中に添加した高濃度のグルコースは卵子内のスカベンジャーの低下と活性酸素産生を助長し、胚発生に害作用を及ぼすことを示した。
4. 通常の細胞培養に用いられる20%酸素濃度下では成熟後の胚発生能は低下した。生体の卵巣内に存在する酸素濃度は低く、5%酸素濃度下で成熟培養した卵子の活性酸素産生量は抑制され、体外での胚発生能も改善された。さらに、異なった酸素濃度で培養した卵子のATPは異なった合成経路により産生され、低酸素下のグルコースを基質とする解糖系により生産されたATPが卵成熟に重要であることを明らかにした。

以上のように、本論文は、ウシ未成熟卵子の体外成熟条件について詳細に検討し、卵巣内の未成熟卵子の有効活用に新たな視点を開いたものであり、家畜繁殖学、家畜発生学、家畜生理学の発展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13年4月19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。