

学位論文要旨 Dissertation Abstract

氏名： 高橋 利清
Name

学位論文題目： ウシ体外受精胚の生産性および品質の向上に関する研究
Title of Dissertation

学位論文要旨：
Dissertation Abstract

受精は多くの哺乳動物において雌の体内で行われ、配偶子である卵子および精子が卵管内で結合することにより成立する。体外受精は、卵子の成熟や精子の受精能獲得、受精、胚の発生という一連の過程を生体外で行う技術であり、発生生物学分野などの研究や、家畜の改良・増殖の手段として利用されている。しかし、体外生産胚は体内由来胚と比べて胚移植後の受胎率が低く、家畜の生産現場での大きな課題となっている。この低受胎率には、体内由来胚と比較して細胞数が少なく、細胞内脂質含有量が多いなど、胚の品質が影響していると考えられており、品質向上のために研究が進められている。

本研究では、従来の凍結保存法では高い受精率が望めない低耐凍性ウシ精子の凍結保存法の改良や、抗酸化物質や脂質代謝促進物質のウシ体外受精胚の品質に与える効果を検討し、ウシ体外生産胚の生産性と品質の向上を試みた。

1. 低耐凍性を示すウシ精液の凍結保存法の改良

体外受精によるウシ胚作出では、受精のために凍結精液が用いられる場合が多いが、雄の個体により精子の耐凍性が異なることが知られ、精液採取直後に比べ凍結・融解後の精子運動性が著しく低下する個体も存在する。このような低耐凍性を示す精子に対して、凍結・融解後の生存性の向上を図るため、凍結保存法について検討した。その結果、リノール酸アルブミンを希釈液に添加し、4℃での低温平衡時間を従来の5時間から30時間に大幅に延長することにより、融解後の精子運動性が改善されることが示唆された。また、この方法で凍結・融解した精子は、正常な受精能を有していた。以上の結果から、リノール酸アルブミンの添加や低温平衡時間の延長が、低耐凍性ウシ精子の凍結・融解後の生存性改善に効果があることが明らかとなった。

2. ウシ体外生産胚の発生能を向上させる新規抗酸化物質の探索

体外生産胚に対して、抗酸化作用を持つ新規物質について検討を行った。N, N-ジメチルグリシン(DMG)はグリシンの誘導体であり、ビタミン様物質として知られている。生体内ではタンパク合成や精神伝達物質の産生に関与しており、抗酸化作用もある。発生培養液に、DMGを0.1 μ M添加した場合、体外生産胚の胚盤胞への発生率と胚の細胞数が有意に増加した。また、DMGを添加すると、高酸素(20%)下で発生培養した場合でも、DMGを添加せずに低酸素(5%)下で発生培養した場合と同様に胚盤胞への発生率は高かった。また、DMG無添加の発生培養液に0.5 mM過酸化水素を添加した場合、胚盤胞への発生率は大きく低下したが、DMGを添加すると有意に改善された。以上の結果から、DMGはその抗酸化作用によって、ウ

シ体外生産胚の発生能を向上させることが示唆された。

3. 脂質代謝促進によるウシ体外生産胚の耐凍性向上

ウシ体外生産胚は、体内由来胚と比べて胚細胞内の脂質含有量が多いことが知られている。ブタ胚では細胞内の脂質顆粒を取り除くことによって耐凍性が向上することが報告されていることから、ウシ体外生産胚においても細胞内脂質が凍結保存後の生存性を低下させている可能性が示唆されている。そこで、体外生産胚のミトコンドリア活性を高め、脂質代謝促進による耐凍性の向上について検討した。脂質代謝の促進のため、発生培養液にL-カルニチンを添加した。その結果、0.3および0.6 mg/mlの添加濃度において、胚盤胞への発生率や胚の細胞数を有意に向上させた。特に0.6 mg/mlの濃度では、脂質含有量も有意に低下したほか、2細胞期胚ではATP含有量が有意に向上することや、凍結・融解後の生存性を高めることが明らかとなった。また、ミトコンドリアの代謝関連遺伝子の発現量が有意に上昇し、2細胞や8細胞期胚では過酸化水素産生量が減少したことから、L-カルニチンは、ウシ初期発生胚に対してミトコンドリア代謝活性作用や抗酸化作用を有することが示唆された。以上の結果から、L-カルニチンは、ウシ体外生産胚のミトコンドリアを活性化して脂質含有量を減少し、胚の品質と耐凍性を向上させることが明らかとなった。

本研究より、リノール酸アルブミンの添加や低温平衡時間の延長によって低耐凍性ウシ精子の凍結・融解後の生存性が向上することや、DMGおよびL-カルニチンの体外発生用培養液への添加によって、抗酸化作用や脂質代謝作用を補強し、ウシ体外生産胚の発生率や耐凍性が改善されることが明らかとなった。

これらの研究成果は、体外生産胚の生産性や品質の向上を図り、優良な経済形質を有するウシ産子の生産性を向上させ、我が国における畜産分野の発展に寄与すると期待される。