HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Improvement of the in vitro growth culture system for bovine oocytes derived from early antral follicles: Effect of the duration of culture, oxygen environment, and astaxanthin supplementation on the acquisition of oocyte developmental competence [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	CHELENGA, Madalitso
Citation	北海道大学. 博士(獣医学) 甲第14714号
Issue Date	2021-09-24
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/83329
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Madalitso_Chelenga_review.pdf (審査の要旨)

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）　　氏名：Chelenga Madaritso

審査委員	主査　教授	昆　　泰　寛
	副査　教授	坪　田　敏　男
	副査　教授	片　桐　成　二
	副査　助教	柳　川　洋　二　郎

学位論文題名

Improvement of the *in vitro* growth culture system for bovine oocytes derived from early antral follicles: Effect of the duration of culture, oxygen environment, and astaxanthin supplementation on the acquisition of oocyte developmental competence

（牛初期胞状卵胞由来卵子培養系の改善：培養期間、酸素濃度、アスタキサンチン添加が卵子の発生能獲得に及ぼす効果）

牛の胚移植技術は改良速度の向上および良質な乳肉製品の増産に欠かせない生殖技術であり、移植胚数は過去 20 年間で約 2 倍に増加している。なかでも体外産生胚は移植胚全体の約 7 割を占めており、増加し続ける需要を支えるとともに、生産コストの低減に貢献している。代表的な体外胚生産技術である体外受精は、本来であれば閉鎖・退行して失われる多数の小型胞状卵胞（直径 2 mm 以上）由来卵子を子牛生産に活用する技術として確立されているが、さらに多数が存在する、より小型の初期胞状卵胞（直径 0.5-1.0 mm）由来卵子を利用できれば、胚の供給数は飛躍的に増加する。しかし、初期胞状卵胞由来卵子を用いた胚生産技術の効率は低く、その改善が求められている。とくに、発育途上にある初期胞状卵胞中の卵子（直径約 95μm）を体外受精技術により利用可能な状態（直径約 110μm）にまで発育させる発育培養技術の改良は、初期胞状卵胞由来卵子を胚生産に活用する上で鍵となる。

そこで申請者は、初期胞状卵胞由来の卵子-卵丘細胞-顆粒層細胞複合体（OCGC）の発育培養系を改良するにあたり、培養期間の最適化を行った。また、OCGC による酸素利用性を高めることで OCGC の発育能を高めつつ、抗酸化剤を添加して活性酸素の増加による細胞傷害を抑制することにより、初期胞状卵胞由来卵子の発生能を高めることを試みた（Chapter I）。培養期間は生体内での卵胞発育期間に近い 8 日間と従来の体外発育培養系と同じ 12 日間の 2 群とし、ガス透過性細

胞培養プレートを用いた培養（Gas-permeable, GP 群）が OCGC 由来卵子の発生能獲得に及ぼす効果を、抗酸化剤であるアスタキサンチン(Ax)添加の効果とともに比較検討した。その結果、GP 群では OCGC の腔形成率は Ax 添加の有無によらずいずれの培養期間でもガス非透過性の通常の細胞培養プレート(Gas-impermeable, GIP 群)を用いた対照群に比べ低かった。また、OCGC の生存率は培養群および Ax 添加の有無によらず 8 日間培養で高かった。得られた卵子の直径および核成熟率は 8 日間培養した Ax 添加 GP 群では Ax 無添加の同群よりも高く、GIP 群と同等であった。OCGC 由来卵子の体外受精後の卵割率および胚盤胞への発生率には培養方法および Ax 添加の有無による差異はみられなかった。以上の結果より、Ax を添加した GP 法による OCGC 培養系を用いることで、生体内での卵胞発育期間に近い 8 日間で、従来の 12 日間の体外培養系と同等の発生能を有する卵子を得られることが示された。

Chapter I において、活性酸素種による細胞傷害の抑制が OCGC 由来卵子の発生能向上に有用であることが示されたため、Ax 添加に加えて、発育培養の酸素分圧を通常の 20%から 5%に低下させて卵子の発生能獲得に及ぼす効果を調べた。また、OCGC 培養期間中には顆粒層細胞の増殖や機能の変化により OCGC の酸素要求量が増加することを考慮し、8 日間の OCGC 発育培養期間中の酸素分圧を一定とする群（5-5%群）と、培養期間の後半 4 日間の酸素分圧を 20%とする群（5-20%群）の間で卵子発生能を比較した（Chapter II）。その結果、培養 8 日目における OCGC の生存率、腔形成率、顆粒層細胞の機能指標である性ホルモン（エストラジオールおよびプロジェステロン）の産生能および培養後の卵子直径に差異はみられなかったが、5-20%群では Ax 添加により生存率が高くなる傾向がみられた。また、同 Ax 添加 5-20%群では卵子の核成熟率が最も高かった。一方、体外受精後の卵割率には群間で差異はみられなかったが、胚盤胞への発生率は Ax 添加の有無によらず 5-5%群で高かった。胚盤胞への発生率は、Ax 添加 5-5%群で最も高く、Ax 無添加 5-20%群で最も低かったことから、OCGC 由来卵子の発生能を高めるためにはさらに活性酸素種による細胞傷害を抑制することが効果的であると推測された。

以上の研究により、申請者はガス交換可能な培養容器と細胞に対する抗酸化効果の高い Ax を組み合わせることで、体内での卵胞発育期間に近い 8 日間の OCGC 発育培養により、従来の発育培養系と同等の割合で子牛生産に利用できる発生能を備えた卵子を得ることができた。また、Ax 添加に加えて、低酸素分圧下での培養により活性酸素種による細胞傷害を抑制することで、胚盤胞への発生率を高めることに成功した。

よって，審査委員一同は，上記学位論文提出者 Chelenga Madaritso 氏の学位論文は，北海道大学大学院獣医学院規程第 10 条の規定による本学院の行う学位論文の審査等に合格と認めた。