HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on the aging-related changes in bovine oocytes during in vitro maturation [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	古山, 敬祐
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第11277号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56174
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Keisuke_Koyama_review.pdf, 審査の要旨

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：古山　敬祐

審査委員	主査　教授	滝口　満喜
	副査　教授	坪田　敏男
	副査　名誉教授	髙橋　芳幸
	副査　准教授	永野　昌志

学位論文題名

Studies on the aging-related changes in bovine oocytes during *in vitro* maturation
（体外成熟培養における牛卵子の老化に関する研究）

牛の体外受精・胚移植技術、特に体外成熟卵子を用いた体外受精技術は目覚ましく発展し、牛の増殖・改良に貢献している。現在では、牛体外成熟卵子から胚移植後に着床可能な胚盤胞が発生する割合は約 40%にまで向上したが、体内成熟卵子に比べて体外成熟卵子の発生能は低く、牛卵子の体外成熟培養系の改善が期待されている。

卵胞内の未成熟卵子は第一減数分裂前期で分裂が停止している状態から黄体形成ホルモンの刺激等を受け、減数分裂を再開する。そして、第二減数分裂中期（M-II 期）に達した後に、再び減数分裂が停止する。この M-II 期に達するまでの過程を核成熟と言う。卵子は核成熟後に正常な受精および発生に必要な細胞質の機能的変化である細胞質成熟を完了し、発生能を獲得すると考えられている。発生能を獲得した卵子はしばらくの間、発生能を維持した後、これを徐々に失う。この発生能の低下が卵子の老化と考えられている。ヒトやマウスの卵子では、老化に伴う形態学的あるいは細胞学的な変化が報告されているが、牛卵子においては老化に関する研究がほとんど行われておらず、牛卵子が核成熟に達した後の発生能獲得および低下時期は不明である。体外成熟により高い胚盤胞への発生率を得るためには、老化により発生能が低下する前に卵子は受精する必要がある。そこで本研究では、牛卵子を成熟培養して核成熟に達した後の発生能獲得および低下時期を推定するとともに、老化過程にある卵子内のミトコンドリア活性に関連した項目の変化について検討した。

第１章は、牛卵子の体外成熟時における発生能獲得および低下時期を推定することを目的とした。まず本研究で用いた培養系における核成熟完了時期および媒精後の精子侵入時期を明らかにするために、食肉検査場由来の牛卵巣から回収した卵子を用いて成熟培養および体外受精を行った。その結果、核成熟完了時期は成熟培養開始後 17.5 時

間であり、成熟培養時間と媒精から精子侵入までの時間の間には負の相関が見られた。次に、成熟培養、体外受精および発育培養を行い、核成熟完了から精子侵入までの時間と胚盤胞への発生率との関連性を調べた。その結果、核成熟完了後約 12 時間（成熟培養開始後約 30 時間）に精子が侵入した卵子の胚盤胞への発生率が最も高くなると推定された。また、精子侵入時期が成熟培養開始 30 時間以降になることによって、卵子の胚盤胞への発生率は低下することが推定された。以上の結果から、本研究の条件で成熟培養した牛の未成熟卵子は、成熟培養開始後約 30 時間で発生能が最も高くなり、その後、発生能が低下することが明らかになった。

第 2 章は、体外成熟時における老化に伴う牛卵子内での変化を明らかにすることを目的とした。成熟培養開始後 20 時間（核成熟完了直後の卵子)、30 時間（高い発生能を有する卵子）および 40 時間目(老化卵子)の牛卵子内における活性酸素種（H_2O_2）産生量、ミトコンドリア活性および ATP 含有量を調べた。その結果、成熟培養開始後 30 時間目の卵子内の H_2O_2 量は最も低く、この時期の卵子の発生能が高くなるのは、抗酸化能が高いためと推察された。また、成熟培養開始後 40 時間経過した老化卵子では、ミトコンドリア活性が高まり、ATP 含有量も多くなった。次に、成熟培養 22 あるいは 34 時間後に媒精して、その 3 日後に得られた胚の割球中のミトコンドリア活性を調べた。その結果、成熟培養 34 時間後に媒精して得られた胚（精子侵入は成熟培養開始後 40 時間目と推定）においては、高活性のミトコンドリアが割球辺縁に多く見られた。また、割球辺縁に存在するミトコンドリアは、割球外に放出されていると推定された。以上の結果から、成熟培養開始から長時間経過した老化卵子で見られる胚発生能の低下は、活性化したミトコンドリアが初期胚発生時に割球辺縁へ局在することに関連していることが示唆された。

本研究の結果から、牛の体外成熟卵子の発生能は、核成熟後約12時間、すなわち成熟培養開始後約30時間目に最も高くなり、その後は徐々に低下することが明らかになった。また、成熟培養開始後40時間経過した老化卵子ではミトコンドリア活性が高まり、ATP 含有量が増加していることが明らかになった。さらに、体外成熟後に老化した牛卵子はミトコンドリアを制御する能力を失い、ミトコンドリアの活性化により体外受精後の発生能が低下することが示唆された。

本研究の成果は、牛体外成熟卵子を用いた体外での胚生産技術の向上に寄与すると考えられる。よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者古山敬祐氏の学位論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第 6 条の規定による本研究科の行う学位論文の審査等に合格と認めた。