



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on in vitro maturation/fertilization/development and mitochondrial activity of in vitro-grown bovine oocytes derived from early antral follicles [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	黄, 偉平
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第11285号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56309
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Huang_Weiping_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称： 博士 (獣医学)

氏名： 黄 偉平

学位論文題名

Studies on *in vitro* maturation/fertilization/development and mitochondrial activity of *in vitro*-grown bovine oocytes derived from early antral follicles
(初期胞状卵胞由来体外発育牛卵子の体外成熟/受精/発生およびミトコンドリア活性に関する研究)

卵巣の中には数多くの発育途上の卵子が存在しており、これらを体外で発育させ、体外受精 (IVF: *in vitro* fertilization) に用いることが出来れば優良家畜の効率的増産や希少動物種の保護増殖などが可能となるほか、卵子発生機序の基礎的研究を体外で行うことが可能となる。しかし、現在までに発育途上にある卵子を用いた産子の効率的な作出はマウスでのみ報告されており、経済的価値の高い牛においては 2 例の産子作出報告があるのみである。また、牛卵子の体外発育培養 (IVG: *in vitro* growth culture) による胚の体外生産効率は、一般的な方法に比べて極めて低く、改善が強く望まれている。そこで、本研究では、牛卵巣中に存在する初期胞状卵胞 (直径 0.5~1 mm) から採取した発育途上にある卵子 (直径約 95 μ m) を用いて、IVG 法の改善に取り組むとともに IVG 卵子の発生能に影響を与える要因について検討を行った。

第 1 章では、発育途上卵子を 10、12 あるいは 14 日間 IVG を行い、体外成熟培養 (IVM: *in vitro* maturation) 前にホスホジエステラーゼ阻害剤である 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) を添加した培地で卵子を前培養 (pre-IVM) し、核成熟率に与える影響を調べた。その結果、12 あるいは 14 日間の IVG 後に 20 時間の pre-IVM を行うことにより、pre-IVM を行わない場合に比べて核成熟率 ($\geq 70\%$) は向上することが分かった。次いで、12 あるいは 14 日間 IVG 後に pre-IVM を行った卵子を IVM および IVF に供した結果、胚盤胞への発生率は 12 日間 IVG した卵子の方が高いこと (25% vs 10%) が明らかとなった。また、IVG 期間中の顆粒層細胞の性状を調べたところ、培養 12 日目のほうが 14 日目に比べて卵子を覆う顆粒層細胞膜の正常性が高いことが明らかになった。以上の結果から牛発育途上卵子の最適な IVG 期間は 12 日間であること、および pre-IVM を行うことによって卵子核成熟能と発生能が改善されることが示された。

第2章では、発生能の高かった IVG 12 日目の卵子を用いて実験を行った。IVG 卵子を 20 時間の pre-IVM に供し、pre-IVM 前後の卵核胞 (GV: germinal vesicle) の性状について検討した。その結果、pre-IVM 中に卵核胞ステージは GV1 期から GV2 あるいは GV3 期に進行し、核成熟能の改善はこれに起因していることが明らかになった。次に、pre-IVM を実施あるいは未実施の IVG 卵子を IVF に供し、受精能と発生能を比較した。その結果、pre-IVM の有無に関わらず、正常受精率は約 75% と同等であったが、胚盤胞への発生率は pre-IVM を行ったほうが高かった (26% vs 13%)。これらの結果から、12 日間 IVG 後に pre-IVM を実施することにより、GV ステージの進行程度が同調し、核成熟後の適切な時期に受精が成立することによって IVG 卵子の発生能が向上していることが推察された。

GV ステージの進行に伴い、卵子の細胞質成熟が進み、発生能が向上するという報告があることから、第3章では、卵子細胞質成熟に深い関係があるとされているミトコンドリア活性を pre-IVM の前、10 および 20 時間後に検査し、IVG 卵子の発生能との関係について検討を行った。その結果、pre-IVM 前に低かったミトコンドリア活性は 10 時間後に最も高くなり、20 時間後には低下することが明らかになった。次に、これら pre-IVM 時間の異なる IVG 卵子を IVM および IVF に供した。その結果、10 時間 pre-IVM した IVG 卵子は核成熟率 (92%) および胚盤胞への発生率 (39%) が体内成熟卵子と同等まで向上した。12 日間の IVG の後、10 時間の pre-IVM を実施した卵子から作出した胚盤胞をレシピエント牛に移植し、発情周期 16 日目 (移植後 9 日目) に胚回収を行って胚の発育を確認したところ、移植胚の半数以上 (6/11) が体内受精正常胚と同程度まで発育していることが分かった。また、別のレシピエント牛では妊娠が継続していることも確認済みである。

本研究によって、初期胞状卵胞由来の発育途上にある牛卵子は、体外で 12 日間 IVG し、その後 IBMX を用いた pre-IVM を 10 時間行うことによって、体内で発育した卵子と同等の発生能を獲得できることが明らかとなった。また、この発生能獲得にはミトコンドリアの活性が深く関連していると考えられた。