



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_review.pdf, 審査の要旨



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：黄 偉平

審査委員	主査	教授	滝口	満喜
	副査	教授	坪田	敏男
	副査	教授	昆	泰寛
	副査	准教授	永野	昌志

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を示した。

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を明らかにした。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。

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を明らかにした。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、胚移植後180日以降に妊娠の継続を確認した。

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になった。また、IVG卵子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ことが明らかになった。

以上のように、本研究は優良家畜の生産効率向上に寄与するのみならず、卵子発生機序研究の発展に必要な体外培養方法を提示した。よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者黄偉平氏の学位論文は、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。