



Title	Studies on in vitro production of bovine embryos : effects of penicillamine, hypotaurine and epinephrine on fertilization and individual embryo culture on blastocyst development [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	姜, 成植
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第11734号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59318
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Sung-sik_Kang_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：姜 成植

審査委員	主査	教授	木村	享史
	副査	教授	坪田	敏男
	副査	名誉教授	高橋	芳幸
	副査	准教授	永野	昌志

学位論文題名

Studies on *in vitro* production of bovine embryos: effects of penicillamine, hypotaurine and epinephrine on fertilization and individual embryo culture on blastocyst development

(牛の体外胚生産に関する研究：ペニシラミン、ハイポタウリンおよびエピネフリンが受精に与える影響と個別胚培養が胚盤胞発生に与える影響)

近年、性の決定した優秀な産子を作成するため、酪農および畜産現場では性選別処理を行った精子を用いた牛の体外受精 (IVF) が行われるようになった。しかし、性選別精子を用いた体外受精による胚の生産効率は通常精子を用いた場合よりも低下することが知られており、改善が求められている。牛 IVF において、精子受精能獲得を誘起するためには一般的にヘパリンが使用されているが、種雄牛毎に精子のヘパリンへの反応性は異なり、安定した受精成績が得られないことが報告されている。また、牛においては特定の優秀な雌牛から産子を得るため、経膈採卵が行われている。しかし、1 回の経膈採卵による採卵数は 5～6 個程度であり、少数胚の培養では胚盤胞への発生率が低下するため培養法の改善が求められている。そこで、本研究では、安定的な体外での牛胚生産を目的とし、用いる精子の種雄牛の違いおよび性選別処理の有無にかかわらず利用可能な IVF 法を開発するとともに、少数培養においても安定的な胚発生が得られる培養法について検討した。

第 I 章では、ヘパリンを添加せず、テオフィリンによって精子受精能獲得を誘起する IVF 培地にペニシラミン、ハイポタウリンおよびエピネフリン (PHE) を同時添加し、通常精子を用いた IVF において種雄牛に関係なく安定した胚生産が可能であるか検討した。さらにテオフィリンと PHE の添加が精子性状に与える影響について精査した。その結果、テオフィリンと PHE は卵子への精子侵入を促進するが、同時添加によって精子侵入率が相乗的に向上することが分かった。さらに精子の運動性を解析したところ、テオフィリンと PHE の同時添加によって、IVF 培地内での精子の生存性と直進運動性が維持されることが明らかになった。この運動性

維持作用は、テオフィリンによる精子内 cyclic AMP 濃度上昇が PHE 添加によって抑制されるためであることが示された。テオフィリンと PHE を添加した培地を用い、9 頭の種雄牛に由来する精子の濃度を 2×10^6 個/ml に調整して IVF を実施した場合、どの種雄牛の精子であっても比較的高い胚盤胞発生率（31.9～62%）が得られた。

第Ⅱ章では、性選別精子を用いて第Ⅰ章で開発した IVF を実施し、受精率と胚盤胞への発生率を調べた。さらにテオフィリンと PHE 添加が性選別精子の運動性に与える影響についても検討した。その結果、テオフィリンと PHE の同時添加は性選別精子においても卵子への侵入を促進することが分かった。しかし、その促進効果は精子を採取した種雄牛によって異なることも明らかになった。すなわち、ある種雄牛の性選別精子では、卵子への侵入は促進されるものの、その効果は通常精子に比べて低下しており、総精子侵入率が低下した。このほか、精子侵入後の前核形成率の低下が示唆された精子や、通常精子に比べて精子侵入促進が過剰となり、多精子侵入率の高くなる精子が確認された。また、性選別精子は融解直後から通常精子に比べて直進運動性が低く、運動性低下の早いことが分かった。3 頭の種雄牛由来の性選別精子を用いて得られた胚を発生培養に供したところ、1 頭では通常精子由来胚と同様の卵割率を示したものの、2 頭では卵割率は低下し、胚盤胞への発生率においては 3 頭とも通常精子由来胚に比べて低くなった。

第Ⅲ章では、培養ディッシュ内に 25 個の微小ウェルを有し、1 個のウェル内で 1 個ずつ胚を培養する WOW（well of the well）を用いて、少数胚培養時の胚発生率を検討するとともに、培養時の胚間距離と隣接胚の個数が発生に与える影響について検討した。その結果、WOW を用いることによって、少数胚培養であっても胚盤胞への発生率は低下せず、さらに WOW 内のどの微小ウェルであっても胚盤胞発生率は低下しないことが明らかになった。

以上の結果から、テオフィリンを含む IVF 培地への PHE 添加は、精子の卵子への侵入性を促進するとともに、通常精子においてはその運動性を維持することが分かった。さらに、IVF 時の精子濃度を 2×10^6 個/ml にすることによって、用いる種雄牛に関係なく、安定的に高い受精率と高い胚盤胞発生率を得られることが明らかとなった。一方、性選別精子では卵子への侵入性は促進されるものの、胚盤胞発生率は向上しなかった。また、WOW を用いた体外発生培養は、少数の胚であっても安定的に胚盤胞を得られる培養法であることが明らかになった。

本研究の成果は、体外での牛胚生産効率を向上させ、安定的な胚生産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 姜 成植 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。