



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Effects of ovarian reserve estimated with antral follicle counts on maturational ability and fertilizability of in vivo- and in vitro-grown oocytes in cattle [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	永井, 克尚
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第12176号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62067
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Katsuhisa_Nagai_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：永 井 克 尚

審査委員	主査	教授	片桐 成二
	副査	教授	昆 泰寛
	副査	教授	坪田 敏男
	副査	准教授	永野 昌志

学位論文題名

Effects of ovarian reserve estimated with antral follicle counts on maturational ability and fertilizability of *in vivo*- and *in vitro*-grown oocytes in cattle

(胞状卵胞数を指標とした牛卵巣予備能が体内および体外発育卵子の核成熟能および受精能に与える影響)

乳牛の受胎率低下は世界的な問題となっているが、雌動物の受胎性には様々な要因が関与するため、受胎率低下の原因に関わる全体像は明かにされていない。近年、人および牛の受胎性低下に卵巣予備能の低下が関係するとの報告がなされている。卵巣予備能は、受精能を有する卵子および性ホルモンの産生を含む卵巣機能の潜在的能力を指し、卵巣内に存在する原始卵胞数を反映するとされている。原始卵胞数は胞状卵胞数と高い正の相関を示すことから、超音波画像診断によって確認できる胞状卵胞数が卵巣予備能の指標として用いられている。牛では発育する胞状卵胞数の少ない個体は繁殖性の低いことが報告されているが、人で報告されている胞状卵胞数と卵子品質の関係は明らかになっていない。そこで本研究では、牛卵巣に観察される胞状卵胞数を卵巣予備能の指標とし、推定された卵巣予備能と卵子品質の関係について体内および体外発育卵子を用いて検討を行った。

第 I 章では、発情周期中に超音波画像で確認可能な胞状卵胞数が少なくとも 1 回は 30 個以上となった雌牛を **High** 群とし、その他の牛を **Low** 群として実験を行った。これら 2 群を 3～4 日あるいは 7 日間隔で経膣採卵法により卵子を反復採取し、卵子品質に対する卵胞数および採卵間隔の影響を検討した。採取した卵丘卵子複合体 (COC: cumulus-oocyte complex) は卵丘細胞の付着程度により形態学的に分類するとともに、全てを成熟培養後に体外受精に供した。その結果、3～4 日間隔で採卵した場合、COC 形態および体外受精後の精子侵入率には 2 群間で差異は認められなかったが、正常受精率は **High** 群が高くなった。7 日間隔で採卵した場合、**High** 群では卵丘細胞を欠く低品質 COC の割合が **Low** 群および 3～4 日間隔で採卵

した場合に比べて高くなり、正常受精率および精子侵入率は低くなった。しかし、Low 群では採卵間隔は、COC 形態および体外受精成績に影響を与えなかった。両群の卵胞発育について超音波画像による解析を行ったところ、High 群では採卵後 7 日目までに卵胞発育は停止するが、Low 群においては卵胞が発育を継続することが明らかになった。これら結果は、両群の卵胞発育動態が異なり、採卵間隔を 7 日間に延長すると High 群では卵胞退行が始まり、卵子品質が低下することを示唆している。

第 II 章では、第 I 章で示唆された卵胞発育動態に差異の生じた原因を明らかにするため、食肉検査場より採取した牛卵巢を用い、卵胞ウェーブに動員される前の初期胞状卵胞から卵子顆粒層細胞複合体（OGC: oocyte-granulosa complex）を採取して 12 日間の体外発育培養に供した。本実験では、卵巢 1 個中に 25 個以上の胞状卵胞を目視できる卵巢を High 群、それ以外の卵巢を Low 群とした。体外発育培養中に正常な形態を示す OGC の割合および顆粒層細胞の増殖能を調べたところ、OGC 形態の正常性には両群間に差異は認められなかったが、培養 8 日目の顆粒層細胞の生存率は High 群の方が高く、培養 12 日目の総顆粒層細胞数も High 群の方が多くなった。これらのことから、High 群の顆粒層細胞の増殖能の高いことが示唆された。次に、体外発育培養後の卵子について、卵細胞質内のミトコンドリア活性と活性酸素種含量を検査するとともに、成熟培養に供して卵子核成熟能を検査した。その結果、体外成熟培養前の卵子核相および卵細胞質内活性酸素種含量には両群間に差異は認められないものの、ミトコンドリア活性は High 群の方が高く、体外成熟培養後の核成熟率も High 群の方が高くなった。さらに、一部の卵子を体外受精に供し、卵割および胚盤胞への発生能を調べたところ、胚盤胞発生能には明らかな差異は認められなかったが、卵割率は High 群の方が高い傾向を示した。以上の結果から、High 群では、顆粒層細胞の高い増殖能によって、卵子のミトコンドリア活性が向上し、卵子の核成熟能と受精能が高くなったと推察された。

本研究の結果から、高い卵巢予備能を有すると推定された牛に由来する卵子は核成熟能および受精能の高いことが示唆された。これには卵胞発育時の高い顆粒層細胞増殖能と高い卵細胞質内ミトコンドリア活性が寄与していると考えられた。また、卵巢予備能の違いにより、個体内での卵胞発育動態が異なることが示されたことから、個体毎の卵胞発育動態に合わせた体内発育卵子の採取と体外受精を組み合わせることで、牛胚の効率的な生産に繋がると考えられた。以上のことから、本研究は畜産技術の向上および牛繁殖生理学研究の発展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 永井 克尚 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。