

氏名(国籍)	崔 龍 鎬 (大韓民国)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	獣医博甲第42号
学位授与年月日	平成9年3月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	帯広畜産大学
学位論文題目	Studies on the In Vitro Maturation and Fertilization of Equine Oocytes
審査委員	主査 帯広畜産大学 教授 佐藤 邦 忠 副査 帯広畜産大学 教授 齊藤 篤 志 副査 岩手大学 教授 三宅 陽 一 副査 東京農工大学 教授 金田 義 宏 副査 岐阜大学 教授 鈴木 義 孝

### 論文の内容の要旨

牛を初めとする多くの産業家畜においては体外受精した卵子を移植し、正常な産子を得ている。しかし、馬においては研究に利用可能な卵子数の制限や馬精子の体外での適切な受精能獲得誘起法が未だに見つけられていないことなどにより、受精率は非常に低いことが報告されている。そこで、①卵子の回収方法と体外成熟、②精子の受精能獲得誘起方法、③透明帯顕微操作による受精卵の作出などについて検討した。

試験材料は、熊本食肉センターで処理され、肉眼的に異常が認められない雌馬の生殖器を用いた。

#### 1. 馬卵巢からの卵子の採取および体外成熟

卵胞吸引法(直径3cm以下の卵胞)と卵巢細切法(剃刀で卵巢を5mm間隔で細切・洗浄)により卵丘卵子複合体を採取し、その卵子を卵丘細胞と卵細胞質に基づいて形態を分類し、採取時点での卵核胞期卵子の割合を検討した。卵巢1個当たりの卵子の平均採取数は吸引法では1.75個、細切法では4.14個、計約6個の卵子が得られた。卵子を卵丘細胞/卵細胞質の形態から、A)緊密/球形、B)緊密/偏形、C)膨潤、D)その他に分けた。両方法で採取された卵子のうち70~80%以上がA、B群であり、C群は17~25%であった。卵核胞期にある卵子の割合はA群ではいずれの方法で回収した卵子でもほぼ90%であり、B群では

吸引法66%、細切法80%であったのに対し、C、D群ではいずれも50%しかなかった。そこで、これらを体外成熟培養に供した。

体外成熟培養は血清とホルモンを含む成熟培地で8時間毎に40時間まで行った。卵核胞崩壊はいずれの方法でも8時間から16時間の間で起こった。第2減数分裂中期にある卵子の割合は両方法共に16時間から24時間の間で急増し、32時間培養後、吸引法では62%、細切法では60%に達した。

馬卵子の採取効率と体外成熟率に及ぼす要因については、卵胞吸引法では四季を通して一定の卵子数が採取されたが、細切法では春季と冬季の卵巣から効率よく卵子が回収され、季節による差が認められた。品種別では、軽種馬と小型馬よりも重種馬の卵巣からの方が両法のいずれにおいても多くの卵子が採取された。また、体外成熟率は卵巣の採取後における保存時間が3、6、ならびに9時間と延長されるにつれ漸減した。

## 2. 馬精子の受精能獲得誘起と体外成熟馬卵子との体外受精

凍結融解精子を受精能獲得誘起効果が報告されているheparin、hypotaurine、Ca-ionophore A 23187 (以下ionophore)、およびcaffeineを単独または複合で処理し、前培養(3~6時間)を行った。媒精時の精子の運動性は10~18%と低かった。透明帯を除去した卵子においては、5mM caffeine/0.1  $\mu$  M ionophore (3 h/1min) 処理により83%の精子貫通が観察された。

卵丘細胞、放線冠細胞、透明帯が体外受精率に及ぼす影響について検討した。卵子は体外成熟培養後、完全に膨潤した卵丘細胞に包まれた卵子、2-3層の卵丘細胞層に包まれた卵子、透明帯無傷卵子、透明帯除去卵子をそれぞれ5mM caffeine/0.1  $\mu$  M ionophore (3 h/1min)処理精子を用いて媒精に供した。受精率は卵丘細胞に関係なく透明帯を持つ卵子において3%以下であった。しかし透明帯除去卵子では、79%の受精率が得られ、精子にとって透明帯通過が困難であることが示唆された。なお、透明帯硬化現象はプロナーゼ、トリプシンに対する溶解性で判定する限り、起こらなかった。

## 3. 透明帯にバイパスを作製した馬卵子を用いた顕微授精

体外成熟培養後の卵子の受精率は、透明帯部分切開(PZD)処理卵子で12%であり、透明帯無傷卵子の4%との間には有意差が認められなかった。しかし、透明帯部分除去(PZR)処理卵子の受精率は52%で、透明帯完全除去卵子の86%との間に有意差があったが、単精子侵入率は両者の間で有意差が認められなかった。

PZR処理卵子における精子侵入と雄性前核の形成時期について検討した結果、PZR処理卵子における精子侵入は媒精後2.5時間ですでに起こっていた。一方、精子頭部の雄性前核への移行は媒精後20時間には90%の卵子で前核形成が見られた。一部の卵子を発育培養したところ、初期分割卵と44個の核を持つ胚が観察された。また、体外受精率には雄の個体差が関与することが分かった。

以上の結果は、馬の卵子を集める方法としては卵巣細切法が有用であり、第二減数分裂中期へ体外成熟するのは60%以上と高かった。精子が透明帯を通過する

ことは非常に困難であるが、透明帯部分除去により受精を可能にすることができ、今後これらの技術を応用し、遺伝資源の長期保存、優良形質の選抜、並びに生産率の向上にとって価値のある試験成績であると考えらる。

## 審 査 結 果 の 要 旨

牛を初めとする多くの産業家畜においては体外受精した卵子を移植し、正常な産子を得ている。しかし、馬においては研究に利用可能な卵子数の制限や馬精子の体外での適切な受精能獲得誘起法が未だに見つけられていないことなどにより、受精率は非常に低いことが報告されている。そこで、①卵子の回収方法と体外成熟、②精子の受精能獲得方法、③透明帯顕微操作による受精卵の作出などについて検討した。試験材料は、熊本食肉センターで処理され、肉眼的に異常が認められない雌馬の卵巣を用いた。

### 1. 馬卵巣からの卵子の採取および体外成熟

卵胞吸引法（直径3 cm以下の卵胞）と卵巣細切法（剃刀で卵巣を5 mm間隔で細切・洗浄）により卵丘卵子複合体を採取し、その卵子を卵丘細胞と卵細胞質に基づいて形態を分類し、採取時点での卵核胞期卵子の割合を検討した。その結果、卵巣1個当たりの卵子の平均採取数は吸引法で1.75個、細切法で4.14個であった。

体外成熟培養は、血清とホルモンを添加した培地で8時間毎に40時間まで行った。その結果、卵核胞崩壊は8時間から起こり、第二減数分裂中期にある卵子の割合は16時間から急増した。

馬卵子の採取効率と体外成熟率に及ぼす要因については、卵胞吸引法では四季を通して一定の卵子数が採取されたが、細切法では春季と冬季の卵巣から効率よく卵子が回収され、季節による差が認められた。品種別では、軽種馬と小型馬よりも重種馬の卵巣からの方が両法のいずれにおいても多くの卵子が採取された。また、体外成熟率はの採取後における保存時間が3、6、並びに9時間と延長されるにつれ漸減した。

### 2. 馬精子の受精能獲得誘起と体外成熟馬卵子との体外受精

凍結融解精子を受精能獲得のためheparin、hypotaurine、Ca-ionophore A 23187、およびcaffeineで処理し、前培養（3～6時間）を行った。

卵丘細胞、放線冠細胞、透明帯が体外受精率に及ぼす影響について検討した。卵子は体外成熟培養後、完全に膨潤した卵丘細胞に包まれた卵子、2～3層の卵丘細胞層に包まれた卵子、透明帯無傷卵子、透明帯除去卵子で媒精を行った結果、受精率は卵丘細胞に関係なく透明帯を持つ卵子において3%以下であり、精子にとって透明帯通過が困難であることが示唆された。

### 3. 透明帯にバイパスを作製した馬卵子を用いた顕微授精

体外成熟培養後の卵子の受精率は、透明帯部分切開卵子で12%であった。しかし、透明帯部分除去卵子の受精率は52%で、透明帯完全除去卵子の86

%との間に有意差があった。単精子侵入率は両者の間で有意差が認められなかった。

卵子における精子侵入と雄性前核の形成時期について検討した結果、透明帯部分除去卵子における精子侵入は媒精後 2.5 時間ですでに起こり、精子頭部の雄性前核への移行は媒精後 20 時間には 90% の卵子で前核形成が見られた。

以上の結果、馬の卵子を効率良く集める方法が分かり、馬体外受精卵の作出が可能となり、今後遺伝資源の保存、生産率の向上などに価値ある結果と考える。

平成9年1月20日に開催した学位論文審査委員会において、提出論文及び既発表論文（学術誌掲載2編）の内容について慎重に審議した結果、岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値あるものと審査委員会委員全員一致で認めた。