

# 博士學位論文

内容の要旨

および

審査の結果の要旨

第18号

平成30（2018）年9月授与分

県立広島大学

## はしがき

本編は、学位規則（昭和28年4月1日文部省令第9号）第8条による公表を目的として、平成30年9月に県立広島大学において博士の学位を授与した者の論文内容の要旨および審査結果の要旨を収録したものである。

学位記番号に付した「甲」は、学位規則第4条第1項によるもの（いわゆる課程博士）を、「乙」は学位規則第4条第2項によるもの（いわゆる論文博士）を示している。

# 目 次

県立広島大学

博士（生命システム科学）

1 博甲 第46号 日高 健雅

ウシ経膈採卵・体外成熟による効率的な和牛胚生産に関する研究：  
個体差の要因とその改善…………… 1

氏名・本籍	日高 健雅 (福岡県)
学位の種類	博士 (生命システム科学)
学位記番号	博甲 第46号
学位授与の日付	平成30年9月28日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 (課程博士)
学位論文題目	ウシ経膈採卵・体外成熟による効率的な和牛胚生産に関する 研究：個体差の要因とその改善
学位論文審査委員	主査 教授 堀内 俊孝 副査 教授 齋藤 靖和 准教授 山下 泰尚 准教授 阿部 靖之

## 学位論文の要旨

ウシの受精卵移植は、一般的には体内受精卵が用いられる。体内受精卵は、ホルモン剤投与による過剰排卵処理から採卵されるため、受精卵1個の生産コストは高い。生産コストの低減には、供卵牛の経膈採卵・体外成熟・体外受精 (OPU-IVM-IVF) を用いた効率的な和牛胚生産技術を確立することが必要である。OPUにより未成熟卵子を多く採取し、高発生能卵を作出する体外成熟 (IVM) 技術を確立することが重要である。しかし、OPU-IVM-IVFによる胚生産効率は、供卵牛の個体差に大きく影響を受ける。そこで、本研究は、胚生産における供卵牛の個体差の要因を解析し、その改善を図ることで、効率的で安定した胚生産技術を確立することを目的とした。まず、供卵牛のホルモン前処置がOPUによる回収卵数、回収卵の品質および胚発生に及ぼす影響を明らかにした。次いで、OPU-IVM-IVFにおける供卵牛の個体差を調べ、高発生と低発生個体を選抜した。さらに、これらのウシから採取した卵丘細胞・卵子複合体 (COCs) の遺伝子発現を網羅的に解析し、新規のIVM法を開発した。

第1章は緒言として、背景および目的を述べる。

第2章はOPU-IVFにおける供卵牛への発情ホルモン前処理の有効性を述べる。前処理として、OPUの88時間前のエストラジオール安息香酸エステル (EB) 投与が採卵成績および胚発生に及ぼす影響を調べた。EB投与によって、直径1-3mmの小卵胞の割合が減り、直径4-6mmの中卵胞の割合が増加した。その結果、OPUによるCOCsの採取数は増加し、採取卵の品質が向上し、IVFに使用可能な卵数は増加した。さらに、IVF後の胚盤胞率、移植可能胚率は有意に増加した。

第3章は供卵牛の個体差の影響とその改善を述べる。第1項では、13頭の黒毛和種のOPU-IVM-IVF後の胚盤胞率を調べた。胚盤胞率および移植可能胚率に個体差が認められ、高発生と低発生個体

を選別した。第2項では、第1項で明らかになった高発生個体2頭、低発生個体2頭の2群計4頭の排卵時における小卵胞（1-3mm）、中卵胞（4-6）、大卵胞（>7mm）の分布割合を観察し、卵胞数と胚盤胞率との関係を調べた。2群間の胚盤胞率には、30%以上の差があったが、卵胞分布割合、卵胞数には有意な差は認められず、胚盤胞率との関連はなかった。第3項では、高発生と低発生個体からOPUによりCOCsを回収し、遺伝子発現を網羅的に解析・比較した。その結果、高発生個体において *Glutathione S-transferase* 遺伝子の発現量が有意に高いことを見出した。そこで、第4項では、11頭の供卵牛のIVM後の卵子内のグルタチオン（GSH）濃度とIVF後の胚発生の相関を調べた。GSH濃度が高い個体は胚発生率が高く、胚盤胞率と卵子のGSH含量に高い正の相関が認められた。そのため、高発生と低発生個体から採取した卵子のGSH濃度と卵丘細胞のGSH合成系（*GCLC*, *GCML*, *GSS*）と利用系（*GPX*）の遺伝子発現を定量RT-PCRで比較した。高発生及び低発生個体ともに卵子のGSH濃度はIVM後0時間で最も高く、4、9時間で低下し、24時間で再び高くなった。高発生個体のGSH合成関連遺伝子発現は、0、4、9時間で低発生個体より高く、低発生個体のグルタチオンペルオキシダーゼ（*GPX*）遺伝子発現は高かった。この結果を活用し、低発生個体においてIVM培地にシステインを添加することで、卵子のGSH濃度は高まり、胚発生率は向上した。第5項では、OPU-IVM-IVFにおいて、システイン濃度を最適化したIVM培地による胚生産と胚移植による受胎性を述べる。システイン添加濃度の最適化によって、0.15mM添加IVM培地での胚盤胞への発生率が高く、総細胞数も多いことを見出した。さらに、胚移植により高い受胎率（62.5%）が得られた。

第4章は総合考察、第5章は総括を述べる。

本研究は、OPU-IVM-IVFにおいて、供卵牛の個体差の解析から、卵子内のGSH濃度と胚発生率に高い相関があり、GSH合成系の遺伝子発現、GSH利用系の*GPX*遺伝子発現に差異を見出し、個体差要因のひとつであることを明らかにした。さらに、システイン添加濃度を最適化したIVM培地の有効性を明らかにした。本研究での成果は、OPU-IVM-IVFによる効率的な胚生産に寄与するものである。

## 審査の結果の要旨

本研究は、経膈採卵（OPU）・体外成熟（IVM）による胚生産における供卵牛の個体差の要因を解析し、効率的で安定した胚生産技術を確立することを目的とした。

本論文は5章で構成される。第1章は緒言で、背景および目的を述べている。第2章は、OPUにおける供卵牛への発情ホルモン前処理の有効性を示した。OPUの88時間前にエストロジオール安息香酸エステルを投与することで、直径4-6mmの中卵胞の割合が増加し、卵丘細胞・卵子複合体（COCs）の採取数は増加した。さらに、体外受精後の胚盤胞率は有意に増加することを明らかにした。

第3章は、供卵牛の個体差の影響とその改善を述べている。第1項では、OPUによる胚盤胞率の個体差を示した。第2項では、高発生と低発生個体の採卵時における卵胞分布と胚盤胞率に関連はないことを示した。第3項では、高発生と低発生個体から採取したCOCsの網羅的遺伝子発現解析により高発生個体に*Glutathione S-transferase* 遺伝子発現量が有意に高いことを見出した。第4項では、卵子グルタチオン（GSH）含量と胚盤胞率に高い正の相関を認めた。さらに、卵子GSH濃度はIVMの0時間で高く、4、9時間で低下し、高発生個体では24時間で再び高くなった。一方、高発生個体におけるGSH合成系（*GSS*）の遺伝子発現は、0、4、9時間で低発生個体より高く、GSH利用系グルタチオンペルオキシダーゼ（*GPX*）の遺伝子発現は低かった。そこで、低発生個体のIVM培地へのシステイン添加により卵子GSH濃度は高くなり、胚発生率は向上することを明らかにした。第5項では、OPU-IVMでのシステイン添加濃度の最適化を検討し、0.15 mM添加で胚盤胞率が高いことを見出した。さらに、胚移植により高い受胎率（62.5%）が得られた。第4章は総合考察で、第5章は総括である。

本論文は、OPU-IVMにおける胚生産の個体差の原因として、卵子GSH濃度、卵丘細胞のGSH合成系、GSH利用系の遺伝子発現の差異を明らかにし、IVM培地へのシステイン添加の有効性を示した。これらの新知見は、畜産分野に貢献するのみならず、生殖科学分野に寄与するところが大きいと判断した。よって、本論文は博士（生命システム科学）の学位に値するものと認められる。