

氏名(本籍)	お <small>ざわ</small> <small>まなぶ</small> 小 沢 学(群馬県)
学位の種類	博 士(農 学)
学位記番号	博 甲 第 3074 号
学位授与年月日	平成15年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	受精直後の母体暑熱感作に起因するマウス初期胚発生阻害の誘発機序に関する研究
主 査	筑波大学教授 農学博士 金 井 幸 雄
副 査	筑波大学教授 農学博士 河 野 義 明
副 査	筑波大学助教授 P h . D . 田 島 淳 史
副 査	筑波大学助教授 農学博士 宮 崎 均

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

交配直後の雌家畜に対する暑熱ストレス(母体暑熱感作)により、受胎率の低下が起こることが広く知られており、この原因は、母体暑熱感作に起因した初期胚死滅の誘発であると考えられている。すなわち、体外培養胚を用いた既往の研究により、受精直後の1細胞期胚には熱耐性がなく41℃以上の高温度条件で容易に初期胚死滅が誘発されることが示され、初期胚死滅の直接的な原因は母体暑熱感作に起因した胚の温度上昇であると考えられている。しかしながら、母体暑熱感作を受けた雌家畜の体温上昇(過体温)は通常1℃から2℃(平均直腸温39.5℃から40.5℃)の範囲内であり、この程度の過体温を培養下の1細胞期胚に感作しても、必ずしも胚発生は阻害されないことから、この仮説を支持する実験的証左は十分とはいえない。また、初期胚は卵管との相互作用によって発生を進行するが、母体暑熱感作が初期胚に及ぼす影響について胚および胚を取り巻く環境である卵管とを関連づけて包括的に解析した研究は、これまでのところ皆無である。そこで本研究では、まず、1)家畜において観察される母体暑熱感作に起因した初期胚死滅の誘発を、実験動物のマウスで再現する解析モデルを構築した。次に、この実験動物モデルを用いて、2)母体暑熱感作が卵管環境および初期胚発生をどのように阻害するかについて解析し、母体暑熱感作に起因した初期胚発生阻害の作用機序を明らかにしようとした。

### 1. 初期胚の発生能を阻害する母体暑熱感作実験モデルの確立について

まず、マウスの直腸温を1℃から2℃の範囲で上昇させる母体暑熱感作条件について検討した。その結果、気温35℃、相対湿度60%の条件において、マウスの直腸温が再現性よく約1.5℃上昇した。次いで、この母体暑熱感作条件を交配から妊娠3日までの各時期のマウスに感作し、その後、適時に胚を回収して発生段階を比較した。その結果、交配直後の12時間の母体暑熱感作によって、著しい初期胚発生阻害を示すことが明らかとなり、この実験モデルの有効性を確認した。

### 2. 母体暑熱感作に起因した初期胚死滅の生理的な機序について

まず、母体暑熱感作を受けた1細胞期胚および体外培養下で直接暑熱感作(39.5℃、母体暑熱感作を受けたマウスの平均直腸温)を受けた1細胞期胚を培養し、初期胚死滅誘発の作用経路について検証した。その結果、母体暑熱感作胚の多くは2細胞期で発生を停止したが、直接暑熱感作胚は8割以上が桑実胚および胚盤胞期胚まで発

生し、対照区と同様に正常な発生能を示した。このことから、母体暑熱感作に起因する初期胚死滅の誘発は、胚の温度上昇によるものではなく母体と胚との相互作用によって誘発されることが示された。次に、過体温によって生体内の活性酸素の生成量が増加すること、および培養胚が酸化ストレスによって容易に死滅することに着目し、『母体暑熱感作によって胚および卵管の酸化ストレスが増加する』との仮説を立て、この仮説の検証を行った。その結果、母体暑熱感作に伴って胚中のグルタチオン濃度の減少および過酸化水素量の増加が確認された。また、卵管中の過酸化水素量が増加した。このことから、母体暑熱感作によって胚および卵管の酸化ストレスが増加することが示された。次いで、酸化ストレスを受けた胚はCdc2（細胞周期チェックポイント機構の実行因子）の不活性化により発生が停止することが知られていることから、母体暑熱感作胚におけるCdc2の活性化状態を解析した。その結果、母体暑熱感作胚ではCdc2の活性化が抑制されることが示され、母体暑熱感作に起因する初期胚死滅の誘発は細胞周期チェックポイント機構を介した現象であることが明らかとなった。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

暑熱ストレスに起因する雌家畜の受胎率低下は、耐暑性の低い高泌乳牛において特に顕著であり、その原因については、野外での観察結果ならびに体外培養胚を用いた研究から、初期胚そのものの熱耐性の欠如によるものと類推されている。本論文は、このような考えを支持する実験的証左が必ずしも十分でないことに着目し、独自の実験的アプローチ、すなわち、初期胚の発生過程が詳しく調べられているマウスを用いて、母体暑熱感作による初期胚死滅誘発モデルを確立し、この動物実験モデルを採用することにより、暑熱感作による初期胚死滅の誘発は、母体の体温上昇そのものに起因するのではなく、胚と卵管環境との相互作用を介した酸化ストレスの亢進が関与することを実証した。また、母体暑熱感作による胚発生停止の細胞学的機序についても検討を加え、暑熱ストレスに起因する初期胚死滅の直接的な引き金は、細胞周期のチェックポイント機構を介した2細胞期での発生停止であることを明らかにした。

以上のように、本研究は暑熱ストレスに起因する初期胚死滅の誘発機序について新たな知見を提示するものであり、その成果の畜産学分野での役割は大きいと判断する。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。