

氏名(国籍)	ダニルダ フファーナ ドウラン (フィリピン)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博乙第2412号		
学位授与年月日	平成21年1月31日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	<b>Studies for the Improvement of <i>in vitro</i> Culture Systems of Oocytes and Embryos in Water Buffalo</b> (水牛における卵子および胚の体外培養系の改良に関する研究)		
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	本田洋
副査	筑波大学准教授	Ph. D.	田島淳史
副査	筑波大学准教授	Ph. D.	DeMar TAYLOR
副査	筑波大学教授(連携大学院)	農学博士	竹中昭雄

## 論文の内容の要旨

卵子の体外成熟と体外受精による胚の生産及び体外生産胚の移植による産子の生産は、牛では人工授精に並ぶ改良増殖技術になっているが、水牛ではこの分野の研究が少なく、実用技術として定着するまでに至っていない。そこで本研究では、水牛における体外培養による胚生産技術の確立を目標として、一連の研究を行い、以下の成績を得た。

### 1. 既存体外受精技術の水牛における有効性の検証

牛での一般的な方法に従い、水牛の屠体卵巣から未成熟卵子を採取し、成熟培養・体外受精の後、10%牛胎児血清添加TCM199を基本培地として体外培養を行い、受精率及び胚盤胞発生率を調べた。その結果、受精率は53.5%、受精卵からの胚盤胞発生率は21.4%であった。次いで、体外培養で得た桑実期胚と胚盤胞期胚をガラス化保存に供した。その結果、密封ストローを用いた方法では再融解後の孵化率が低かったが、開口ストローを用いた改良法では、再融解後の培養で82～88%の高い孵化率が得られた。さらに、ガラス化保存胚を自然発情確認後の水牛に移植し、19.4%(7/36)分娩成績を得た。これらの結果から、牛で確立した卵子及び胚の体外培養技術、ならびに胚のガラス化保存法は水牛にも適用可能な基盤技術として利用できるが、体外受精率、胚発生率が低く、水牛卵子の特性解明とそれらに基づく培養法の改良が必要であることが明らかになった。

### 2. 水牛卵子の体外受精成績及び胚発生率に影響する要因の解析

体外受精率とその後の胚発生率は卵子の成熟度に大きく依存する。そこで、基本培地に卵胞刺激ホルモン(FSH)、エストラジオール、上皮成長因子(EGF)を添加し、卵子成熟との関係を調べるとともに、基本培地で得た初期胚の染色体異常の頻度を調べた。その結果、ホルモンと成長因子の同時添加により、卵子の減数分裂能(metaphase-IIへの到達率)が有意に増加するとともに、胚盤胞への発生率も有意に向上し、細胞数にも増加が認められた。一方、基本培地で得た初期胚には約半数に染色体異常が認められた。これらの結果から、牛での成績に比べて水牛での体外受精率と胚発生率が低いのは、卵子の成熟度が十分でないことに

起因すること、また、培地へのFSH、エストラジオール及びEGFの添加は、水牛卵子の体外成熟と発生能獲得に有効であることが明らかになった。

### 3. 水牛卵子及び胚の体外培養技術の改良

未成熟卵子には、発育段階の異なる多様な卵子が含まれるため、胚生産の効率を高めるためには、発育段階に合わせたきめ細かい培養法の検討、あるいは十分な発生能を持つ均質な卵子の選択が必要である。そこで本研究では、組織染色及び走査型電子顕微鏡により卵子の形態と発生能との関係を解析し、発生能獲得卵子の選別法について検討するとともに、活力の高い精子の分離及び体外発生培地の検討を行った。その結果、①卵子の発生能は顆粒層細胞の緻密度及び卵子の大きさと密接な関係があり、顆粒層細胞が3層以上、卵子直径が120 $\mu$ m以上の卵子を選別することにより、胚盤胞への発生成績が改善できること、②濃度勾配遠心法で精子の選別を行うことにより受精率が大幅に改善されること、③受精後に胚の代謝基質として一定量のピルビン酸塩と乳酸塩を加えることにより胚盤胞発生率が向上すること等を認め、これらの改良を加えることにより、水牛卵子の体外受精率及び胚盤胞発生率を牛卵子に近い水準（それぞれ、83.2%および43.5%）に高めることが可能であることを実証した。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

フィリピン、タイ、中国では、在来水牛の産肉・産乳能力の向上を図るため、成長速度・泌乳能力に優れた乳用水牛との交雑育種が実施されるとともに、優良個体の選択的増殖を目的として卵子の体外成熟・体外受精による移植胚の生産と胚移植技術の開発が進められている。しかしながら、後者については、水牛ではこの分野の研究が少なく、実用技術として確立するには至っていない。本研究は、牛での先行研究を参考にしつつ、未成熟卵子の採取、成熟培養、体外受精、胚培養の各段階で詳細な比較検討を行い、水牛卵子の体外培養による移植胚生産技術の確立を目指したものである。水牛卵子の種特異性についての包括的解明には至っていないが、形態的特徴に基づく均質な発生能獲得卵子の選別、ホルモン及び成長因子を用いた卵子成熟過程の制御、活力の高い精子の選別、受精後の体外培養培地の再検討など、本研究により、水牛卵子及び初期胚の特性を踏まえた独自の改良法が考案され、これらにより水牛での未成熟卵子を用いた移植胚の生産効率が牛に匹敵する水準にまで高められたことは、家畜繁殖学分野の優れた業績として高く評価できる。

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。