

氏名	大古田 治
学位(専攻分野)	博 士(農 学)
学位授与番号	博 甲 第 1146 号
学位授与の日付	平成 5 年 3 月 28 日
学位授与の要件	自然科学研究科生物資源科学専攻 (学位規則第 4 条第 1 項該当)
学位論文題目	ウシ体外成熟卵子の体外受精におよぼすカフェインとヘパリンの影響
論文審査委員	教授 丹羽 皓二 教授 湯原 正高 教授 佐藤 勝紀 教授 内田 仙二 教授 山本 格

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、ウシにおける精子の受精能獲得と卵子の対外受精におよぼすカフェインとヘパリンの影響について検討した結果を纏めたものである。凍結融解精子をカフェイン処理することにより体外成熟卵子の体外受精率は向上したが、雄ウシ個体間による変動が大きく、人工授精による受精率との間に相関は認められなかった。更に、カフェインの効果は用いる培養液により異なった。一方、ヘパリン処理精子の使用により一部の雄ウシによる受精率は向上したが、カフェイン処理精子による平均の受精率と比較して有意な差は認められなかった。しかし、カフェインとヘパリンの併用処理により何れの雄ウシから得られた精子においても受精率は有意に増加した。このことから、カフェインとヘパリンはウシ精子の受精能獲得と卵子の受精に対して相乗効果を有することが明らかとなった。また本法で得られた体外受精卵は体外培養で少なくとも 4 細胞期まで正常に発育した。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、ウシ未熟卵子の有効利用を目的として、凍結融解精子による体外成熟卵子の体外受精を試み、新しく得られた次のような成果をまとめたものである。

- 1) 精子のカフェイン処理が卵子の体外受精におよぼす影響：カフェイン添加培地で前培養した精子による体外受精率には、供試した 6 頭の種雄牛間で大きな変動（0～83 %）が認められた。また、2 種類の異なる培地（m-KRB 液と BO 液）を比較した結

果、前培養の間にカフェインが存在していれば、m-KRB液よりもBO液において有意に高い受精率が得られ、カフェイン濃度の上昇にともない受精率も上昇した。しかし、10mMのカフェイン添加により多精子受精率が高くなることから、最適カフェイン濃度は5mMであることが示唆された。

- 2) 体外受精におよぼすカフェインとヘパリンの影響：ヘパリンを含む受精培地中であらかじめ成熟卵子を導入し、カフェイン添加BO液で洗浄した精子液を等量添加して体外受精した結果、カフェインのみの存在下では受精の得られなかった雄ウシにおいて精子侵入が認められた。ヘパリンとカフェインの単独添加では精子侵入率(32~35%)に有意差は認められなかったが、両者の共存下では精子侵入率は有意に増加した(68%)。また、このカフェインとヘパリンの相乗効果に対してグルコースは全く影響をおよぼさなかった。これらのことから、カフェインとヘパリンの相乗効果は、カフェインによるグルコースの作用(ヘパリンによる受精能獲得誘起を阻害する作用)の抑制機構によるものではないことが推察された。
- 3) カフェインとヘパリンの存在下における精子の侵入時期と侵入卵の発生能：カフェイン(5mM)とヘパリン(10 μ g/ml)を含む培地内で、卵丘細胞付着卵子に授精した結果、精子侵入は前培養の有無にかかわらず3時間後から観察されたが、卵丘細胞を除去した裸化卵子では、授精後1時間で精子侵入が観察された。さらに、グルコース無添加、およびカフェインとヘパリンの添加条件下では、非前培養精子による卵丘細胞付着卵子への侵入は授精後3時間で初めて観察され、培養時間の経過にともなって侵入率も上昇し、授精後7~8時間で侵入率はピーク(83~96%)に達した。また、このように精子が侵入した卵子の大多数において少なくとも4細胞期までの初期発生が可能であることが明らかとなった。

これらの知見は、ウシ体外受精卵の生産効率の向上に寄与するのみならず、受精生理学上の新しい発見であり、きわめて有用な成果と考えられる。本学位審査委員会は上記の論文内容および参考論文を総合的に審査し、本論文が博士(農学)の学位に値するものと判定した。