| | |
|---|---|
| 氏　　名 | 朴　基殷 |
| 授与した学位 | 博　士 |
| 専攻分野の名称 | 学　術 |
| 学位授与番号 | 博甲第２９３２号 |
| 学位授与の日付 | 平成１７年　３月２５日 |
| 学位授与の要件 | 自然科学研究科生命分子科学専攻<br>（学位規則第４条第１項該当） |
| 学位論文の題目 | STUDIES ON THE DEVELOPMENT OF NEW TECHNOLOGIES FOR PRESERVATION OF PIG GAMETES<br>（ブタにおける配偶子の新しい保存技術の開発に関する研究） |
| 論文審査委員 | 教授　丹羽　晧二　　教授　奥田　潔　　教授　近藤　康博 |

## 学位論文内容の要旨

本研究では、ブタにおける未成熟卵子のガラス化凍結保存および精子の乾燥保存の可能性について検討し、以下のような結果を得た。卵丘細胞を一部除去した卵核胞期ブタ卵子を遠心分離し、卵子の一端に偏在した細胞質内脂肪顆粒の一部を除去した後、ガラス化凍結した。加温後の卵子を体外成熟させるとともに、顕微受精（ICSI）による受精および発生の能力について調べた。非ガラス化凍結卵子を 44-48 時間培養した結果、成熟率は非遠心分離と比較して遠心分離した卵子において有意に低下したが、脂肪顆粒除去によりさらに低下することはなかった。耐凍剤であるエチレングリコールを含む平衡液およびガラス化溶液にそれぞれ 10 および 1 分間処理後に培養した結果、これらの３つのグループの卵子間で成熟率に有意差は認められなかった。ガラス化凍結後に卵子を培養した結果、脂肪顆粒非除去卵子の成熟率は、遠心分離処理に関わりなく、脂肪顆粒除去卵子のそれと比較して有意に低かった。脂肪顆粒除去卵子をガラス化凍結後に凍結-融解精子で ICSI した結果、非ガラス化凍結卵子と同等の活性化率および活性化卵子における雄性前核（MPN）形成率が得られた。しかし、その後約 5.4%の非ガラス化凍結卵子が桑実期まで発生したのに対して、ガラス化凍結卵子では約 8%が４-細胞期まで発生したに過ぎなかった。つぎに、精子の乾燥方法がブタ顕微授精卵子の活性化、前核形成および初期発生におよぼす影響を検討するため、ブタ精子を凍結乾燥、対流乾燥、および加熱乾燥し、それぞれ 4℃で 1-3 ヶ月間保存した。1 ヶ月間保存した乾燥精子の精子頭部の ICSI では、卵子の活性化率および活性化卵子における MPN 形成率には 4 つの異なる乾燥方法の間で有意差は認められなかった。しかし、胚盤胞への発生率は、他の乾燥方法と比較して加熱乾燥において有意に低かった。一方、4℃で 3 ヶ月間保存した凍結乾燥および対流乾燥精子の顕微受精において、活性化卵子における MPN 形成率には 1 ヶ月間保存した乾燥精子と比較して有意差は認められなかったが、胚盤胞への発生は認められなかった。3 ヶ月間保存した乾燥精子を注入した卵子を 1.5 kV/cm の直流パルスで 100 μ秒処理した結果、一部の卵子において胚盤胞への発生が認められた。

論文審査結果の要旨

ブタにおける配偶子や胚の凍結保存はウシと比較して困難であり、未だ実用化に至っていない。本研究では、ブタにおける未成熟卵子のガラス化凍結保存および精子の乾燥保存の可能性について検討し、次のような新しい知見を得ている。

卵丘細胞を一部除去した未成熟ブタ卵子を遠心分離し、卵子の一端に偏在した細胞質内脂肪顆粒の一部を除去した後、ガラス化凍結した。加温後に体外成熟させるとともに、顕微受精（ICSI）後の卵子の受精および発生の能力について調べた。非ガラス化凍結卵子を44-48 時間培養した結果、成熟率は非遠心分離と比較して遠心分離した卵子において有意に低下したが、脂肪顆粒除去によりさらに低下することはなかった。耐凍剤であるエチレングリコールを含む平衡液およびガラス化溶液にそれぞれ 10 および 1 分間処理後に培養した結果、これらの３つのグループの卵子間で成熟率に有意差は認められなかった。ガラス化凍結後に卵子を培養した結果、脂肪顆粒非除去卵子の成熟率は、遠心分離処理に関わりなく、脂肪顆粒除去卵子のそれと比較して有意に低かった。脂肪顆粒除去卵子をガラス化凍結後に凍結-融解精子で ICSI した結果、非ガラス化凍結卵子と同等の活性化率および活性化卵子における雄性前核（MPN）形成率が得られた。しかし、ガラス化凍結卵子では、その後４-細胞期までしか発生しなかった。つぎに、射出濃厚部精液の精子を、1）凍結（凍結乾燥機で 4 時間）、2）対流（ゴム栓装着後に超音波加湿器を用いて窒素ガスを５あるいは 10 分間対流）、および 3）加熱（50℃の乾燥機で 10 時間）により乾燥した。再水和後、超音波処理により尾部から分離した精子頭部を ICSI した結果、１ヶ月間保存した乾燥精子の精子頭部の顕微受精では、卵子の活性化率および活性化卵子における MPN 形成率には 4 つの異なる乾燥方法の間で有意差は認められなかった。しかし、胚盤胞形成率は、他の乾燥方法と比較して加熱乾燥において有意に低かった。一方、4℃で３ヶ月間保存した凍結乾燥および対流乾燥（5 分）精子の ICSI において、活性化卵子における MPN 形成率は 1 ヶ月間保存した乾燥精子と比較して有意差は認められなかったが、胚盤胞への発生は認められなかった。３ヶ月間保存した乾燥精子を注入した卵子を 1.5 kV/cm の直流パルスで 100 μ秒処理した結果、一部の卵子において胚盤胞への発生が認められた。

これらの知見は、ブタ配偶子の保存に関する研究の進展に寄与するのみならず、ブタにおける発生工学的研究への応用などの実用面においても有用なものである。本学位審査委員会は本論文の内容および参考論文を総合的に審査し、本論文が、博士（学術）の学位に値いするものと判定した。