

氏 名	権 仁圭
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2937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 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	STUDIES ON FERTILIZATION OF PIG OOCYTES BY INTRACYTOPLASMIC INJECTION OF FREEZE-DRIED AND SALT-STORED SPERMATOZOA (凍結乾燥精子および塩漬精子によるブタ卵子の顕微受精に関する研究)
論文審査委員	教授 丹羽 皓二 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、凍結乾燥保存および液状保存されたブタ精子の ICSI による卵子の受精の可能性について検討し、つぎのような新しい知見を得た。12-18 時間かけて凍結乾燥した精子を 25℃で 1 ヶ月間保存し、完全精子あるいは精子頭部を体外成熟卵子に ICSI した結果、卵子の活性化率と雄性前核 (MPN) 形成率は、完全精子よりも精子頭部の ICSI において有意に高かったが、桑実胚および胚盤胞への発生は認められなかった。24 時間かけて凍結乾燥すると、4 および 25℃の何れの保存温度においても精子頭部注入後の卵子の活性化と MPN 形成は有意に抑制された。4 時間で凍結乾燥後 4℃で 1-6 ヶ月間保存した精子頭部を ICSI した結果、卵子の活性化率と MPN 形成率には保存期間による差は認められなかったが、胚盤胞形成は、1 ヶ月間保存精子頭部の ICSI においてのみ観察された。つぎに、TL-Hepes-PVA (THP) 液に懸濁させて 4 あるいは 25℃で 0-14 日間保存した精子から分離した精子頭部を ICSI した結果、卵子の活性化率はいずれの保存温度においても保存期間の延長に伴って徐々に低下したが、保存温度による差は認められなかった。しかし、MPN 形成率については、保存期間および保存温度による差は認められなかった。注入胚の胚盤胞への発生は 10 日間までの保存精子で認められた。一方、飽和濃度の NaCl を添加した THP で精子を両者の温度で 0-27 日間保存した結果、卵子の活性化率はいずれの保存温度においても保存 10 日後まで徐々に低下したが、MPN 形成率には保存期間および保存温度による差は認められなかった。胚盤胞への発生は 25℃では保存後 14 日まで、4℃では保存後 24 日までの精子を用いた時にのみ認められた。また、飽和塩溶液で 0-45 日間保存 (4℃) した精子頭部を注入した卵子を 1.5 kV/cm の直流パルス (100 μ秒) で処理した結果、胚盤胞への発生率は 0、28、35 日の保存期間の間で有意差は認められなかったが、40 日間の保存では 0 日間と比較して有意に低下し、45 日間の保存では胚盤胞への発生は認められなかった。

論文審査結果の要旨

本研究では、ブタ精子の凍結以外の保存方法を見出す目的で、凍結乾燥保存および液状保存された精子による卵子の受精成立の可能性について検討し、つぎのような新しい知見を得ている。

凍結乾燥した精子を4あるいは25℃で1-6ヶ月間保存後、TL-HEPES-PVA (THP) を用いて再水和させた。ついで、尾部を有する完全精子あるいは超音波処理により尾部から分離した精子頭部を体外成熟卵子に顕微注入し、卵子の活性化率、雄性前核 (MPN) 形成率、および発生率を調べた。その結果、12-18時間かけて凍結乾燥後、25℃で1ヶ月間保存した精子を用いた場合、活性化率とMPN形成率は、完全精子よりも頭部のみを注入した卵子において有意に高かったが、桑実胚および胚盤胞への発生は認められなかった。また、24時間かけて凍結乾燥すると、両者の温度で1ヶ月間保存した精子において、何れも精子頭部注入後の卵子の活性化率とMPN形成率は有意に抑制された。卵子の胚盤胞への発生は、4時間凍結乾燥後4℃で1ヶ月間保存した精子から分離した精子頭部を注入した時にのみ認められた。4時間凍結乾燥後4℃での保存期間を6ヶ月まで延長しても、卵子の活性化率と前核形成率は低下することはなかったが、胚盤胞への発生は1ヶ月間保存後においてのみ認められた。つぎに、THPあるいは最終濃度が5.59 MとなるようにNaClを添加したTHP (飽和塩溶液) に精子を懸濁させ、4℃あるいは25℃で0-45日間保存後、分離精子頭部を体外成熟卵子に注入した。その結果、0-14日間保存した精子頭部の注入において、卵子活性化率はいずれの保存温度においても保存期間の延長に伴って徐々に低下した。一方、MPN形成率には、保存期間および保存温度による差は認められなかった。また、注入胚の胚盤胞への発生は、いずれの保存温度においても14日間保存した精子では認められなかった。飽和塩溶液で精子を0-27日間保存した場合、卵子活性化率はいずれの保存温度においても保存10日後まで徐々に低下したが、MPN形成率には保存期間および保存温度による差は認められなかった。また、胚盤胞への発生は25℃では保存後14日まで、4℃では保存後24日までの精子頭部の注入において認められた。また、飽和塩溶液で0-45日間保存 (4℃) した精子頭部を注入した卵子を1.5 kV/cmの直流パルス (100 μ 秒) で処理した結果、40日間の保存精子においても、注入卵子の胚盤胞への発生が認められた。

これらの知見は、精子の受精能に関する研究の進展に寄与するのみならず、ブタ精子の保存に関する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) の学位に値するものと判定した。