

|         |                                                                                                                                        |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏名      | 王 維 華                                                                                                                                  |
| 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 1365 号                                                                                                                           |
| 学位授与の日付 | 平成 7 年 3 月 25 日                                                                                                                        |
| 学位授与の要件 | 自然科学研究科生物資源科学専攻<br>(学位規則第 4 条第 1 項該当)                                                                                                  |
| 学位論文題目  | Studies on <i>in vitro</i> fertilization of pig oocytes by frozen-thawed ejaculated<br>spermatozoa<br>(凍結・融解射出精子による体外成熟豚卵子の体外受精に関する研究) |
| 論文審査委員  | 教授 丹羽 皓二, 教授 湯原 正高, 教授 佐藤 勝紀<br>教授 内田 仙二, 教授 山本 格                                                                                      |

### 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

比較的最近になって新鮮精子および凍結精巢上体精子による豚卵子の体外受精の成功例が報告されているが、凍結射出精子による体外受精は困難とされてきた。射出精子は同一の雄個体から繰り返し採取することができ、さらにこれを凍結保存することにより、同一の射出精子を繰り返し実験に用いることができる。これにより、個体差および異なる射出精子による差を均一化できるので、実験による要因分析が極めて容易となる。本研究は、凍結・融解射出精子による豚卵子の体外受精系を開発する目的で着手されたものであり、この成功例を得るとともに受精に影響をおよぼす幾つかの条件を検討した。その結果、受精培地へのカフェイン添加、授精時の高精子濃度および卵胞細胞の存在は凍結射出精子の卵子への侵入に重要であることが示唆された。また、未熟豚卵子は成熟のいずれの段階においても精子侵入が可能であることおよび成熟途上卵に侵入した精子核は中期像染色体を形成しうることが明らかとなった。さらに、無蛋白限定培地での豚卵子の体外受精および無血清培地での豚卵子の成熟培養にも成功した。

## 論文審査結果の要旨

比較的最近になって、新鮮射出精子および新鮮あるいは凍結精巢上体精子による豚卵子の体外受精の成功例が報告されているが、凍結射出精子による体外受精は困難とされてきた。射出精子は同一の雄個体から繰返し採取することができるので、これを用いることにより、少なくとも変動要因の一つである雄による個体差を無視できる。さらに、凍結保存された射出精子が供試できれば、同一の射出精液に由来する精子を繰返して実験に用いることができるので、異なる射出精液による差をも均一化できる。本研究は、この点に着目し、凍結・融解射出精子による豚卵子の体外受精系を開発する目的で行われた。

まず、受精時の条件について幾つかの要因の影響を調べた結果、非常に高い濃度( $25-100 \times 10^6$ 個/ml)の精子を授精することによって、雄豚の個体によっては安定した高い受精率(85-89%)の得られること、さらに受精培地へのカフェインおよび卵胞細胞の添加が受精成立に必須の条件であることを見いだした。これらの知見に基づいて開発された系を用いて、凍結・融解射出精子が成熟途上の未熟卵子にも侵入しうることも明らかにした。さらに、培地のpHを7.4から7.8に高めるとともに、 $\text{NaHCO}_3$ 濃度も37から46-50 mMまで高めることによって、卵丘細胞を除去した裸化卵子の無蛋白限定培地における受精も可能であることを見いだした。このことは、無蛋白限定培地においても精子の受精能獲得が誘起されることを示唆するが、クロルテトラサイクリン(CTC)染色法によりこの事実を確認している。最後に、無血清培地における豚卵子の核成熟について調べ、上皮成長因子およびゴナドトロピンが重要な役割を果たしていることを示唆した。

これらの知見は、豚卵子の新しい体外受精系の確立に寄与するのみならず、受精機構を理解する上でもきわめて有用な示唆を与えるものである。本学位審査会は、これらの成果をまとめた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。