

氏名	金 宗 興		
学位(専攻分野)	博 士(農 学)		
学位授与番号	博 甲 第 1147 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	Studies on development in culture of bovine oocytes matured and fertilized <i>in vitro</i> (ウシ体外成熟・受精卵子の培養に関する研究)		
論文審査委員	教授 丹羽 皓二	教授 湯原 正高	教授 佐藤 勝紀
	教授 内田 仙二	教授 山本 格	

### 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

ウシ受精卵の体外培養において体細胞との共培養が多用されているが、本研究では、共培養に依存しない培養系の開発を目的として、血清などの未知成分を含まない限定培地を用いて、ウシ胚の発生におよぼす幾つかの要因について検討した。その結果、グルコースはウシ胚の発生を 8~16細胞期で完全に阻止するが、桑実胚から胚盤胞への発生には必要であることが明らかとなった。また、乳酸とピルビン酸はいずれも重要な基質であり、低濃度 (0.35mM) のリン酸とアミノ酸も 1-細胞期胚の胚盤胞への発生に必要であることが明らかとなった。一方、培地の物理的条件として浸透圧も重要な因子であり、既存の培地よりやや低い浸透圧 (290mOsm) で胚盤胞への発生率が高くなることが認められた。グルタミンとビタミンの効果は認められなかったが、牛血清アルブミンは桑実胚から胚盤胞への発生に重要な作用をおよぼすことが推察された。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、血清や体細胞などの未知成分を含まない限定培地を用いて、ウシ体外受精胚の発生におよぼす幾つかの要因について検討して得られた次のような成果をまとめたものである。

- 1) 半限定培地における初期発生におよぼすエネルギー基質の影響：授精後 8 時間で、

実験により条件の異なるグルコース欠修正TCM-199 (mTCM-199) に卵子を移し、40時間後に卵丘細胞を除去して培養を継続した。その結果、桑実胚/胚盤胞への発生率は、乳酸 (10mM) とピルビン酸 (0.5mM) の共存下で最も高かったが、これにグルコースが加わると低下した。しかし、授精後120時間以降に5.56mMのグルコースを添加することにより桑実胚 (19~25%) および胚盤胞 (8~16%) への発生率は高くなった。さらに、桑実胚/胚盤胞への発生には、授精後96時間以上ピルビン酸が存在する必要があることが明らかとなった。

2) 限定培地におけるリン酸塩とエネルギー基質およびアミノ酸が初期発生におよぼす影響：限定培地 (修正タイロイド液; mTLP-PVA) にアミノ酸 (19種類) を添加した場合、リン酸 (1.05mM) 添加の有無にかかわらずグルコース (5.56mM) の添加 (0~1%) よりも無添加 (9~13%) において胚盤胞への発生率は有意に高かったが、アミノ酸無添加では胚盤胞への発生は困難であった。グルコース無添加の条件下では、0.35mMのリン酸濃度で胚盤胞への発生率 (24%) は最も高かった。また、乳酸 (10mM) とピルビン酸 (0.5mM) の両者を除去すると胚盤胞への発生は困難であったが、いずれか一方 (10~15%) よりも両者 (22%) の存在下で胚盤胞への発生率は有意に高くなった。

3) 限定培地の浸透圧とビタミン、グルタミンおよびウシ血清アルブミン (BSA) の添加が初期発生におよぼす影響：NaClでmTLP-PVAの浸透圧を調節した結果、桑実胚と胚盤胞への発生率は215-240または315-365よりも265 290 mOsmの浸透圧で有意に高かった。授精後120時間でグルコースを添加した場合、290mOsmの浸透圧で桑実胚 (40%) および胚盤胞 (32%) への発生率が最も高かった。mTLP-PVA (290 mOsm) における胚盤胞への発生率は、グルタミン (0.1mM) の有無にかかわらずアミノ酸 (19種類) の無添加よりも添加において有意に高かった。また、ビタミンの添加は胚盤胞への発生において全く効果がなかった。さらに、授精後120時間でBSAを添加した場合、胚盤胞への発生率は無添加と比較して有意に高かった。

これらの知見は、実用面ではウシ胚の体外培養系の簡易化に役立つとともに、学術面では初期発生に必要な要因の分析に貢献するものであり、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。