

氏名	関澤 文夫		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	農学		
学位授与番号	博甲第4574号		
学位授与の日付	平成24年 3月23日		
学位授与の要件	自然科学研究科 バイオサイエンス専攻 (学位規則第5条第1項該当)		
学位論文の題目	胚移植による子牛の効率的生産と核移植胚の子牛生産に関する研究		
論文審査委員	教授 奥田潔	教授 近藤康博	准教授 アコスタ トマス

### 学位論文内容の要旨

牛における胚移植に関する研究は近年急速に行われるようになってきたが、その受胎率や生産率は未だ満足できるものではない。本研究では、胚移植による子牛の効率的生産を目的として、牛における過排卵処置技術、牛胚の凍結保存技術、および凍結保存胚移植後の流産の発生に関する研究とともに、核移植胚にこれらの技術を応用するために以下の研究を実施した。

(1) 胚移植胚による子牛の効率的作出方法を確立するために、過排卵処置をM法(FSH 20 mgの4日間減量投与方法)、C法(FSH 24 mgの3日間減量投与方法)、S法(FSH 12 mgの3日間減量投与方法)、およびP法(FSH 30 mgとPVPの1回投与方法)について実施し、採卵数、正常胚数、正常胚率を検討した。その結果、M法は正常胚数ならびに正常胚率ともに他の方法と比べて著しく高かったことから、過排卵処置法として最も有効であることが明らかになった。採卵時における血漿β-カロテン(BC)濃度と採卵成績の関係を調べた結果、血漿BC濃度と正常胚数および正常胚率の間に正の相関が認められ、採卵時に血漿BC濃度を高くすることにより採卵成績を向上することが示唆された。また胚移植法についてグリセリンとショ糖を耐凍剤として用いるM法とエチレングリコールを耐凍剤として用いるD法の2種類のダイレクト法ならびにステップワイズ法を比較した結果、3つの方法の中でD法が最も操作性に優れ、受胎率も安定して高かったことから、D法が実用性に優れていることが確認された。

(2) クローン胚の効率的作出方法を確立するために、ドナー胚として体外受精胚または生体由来胚を用いてクローン胚を作出し、それぞれの胚における発生能、流産発生率を比較した。いずれの胚をドナーとして用いた場合でも、産子への発生能が高かったが、生体由来胚をドナー胚として用いた場合、体外受精胚をドナー胚として用いた胚と比較し、産子への発生能が高く、流産発生率が低い傾向を示した。これは生体由来の新鮮胚および凍結胚移植後の早期胚死滅発生率は、体外受精胚由来の凍結胚移植後のそれと比較して有意に低い( $P<0.01$ )のと同様であった。また、核移植胚由来の雌牛の繁殖能力ならびに泌乳能力を調べたところ、いずれも正常であることが国内においては初めて明らかにされた。これらのことからクローン胚をダイレクト法により、凍結融解後に簡易に受胎牛に移植して、子牛を生産することが可能であることが明らかになった。

本研究の結果から、過排卵処置技術およびダイレクト凍結法などの胚移植技術の核移植への応用は可能であることが示された。さらに、これらの成果は子牛の効率的生産を目的とする牛胚移植技術の野外普及に貢献する可能性が示された。

## 論文審査結果の要旨

本論文は、胚移植および核移植による子牛の効率的作出方法を確認するための臨床繁殖学的研究として実施された以下の実験の成果をまとめたものである。

胚移植による子牛の効率的作出方法を確認するために、過排卵処置を M 法 (FSH 20 mg の 4 日間減量投与方法)、C 法 (FSH 24 mg の 3 日間減量投与方法)、S 法 (FSH 12 mg の 3 日間減量投与方法)、および P 法 (FSH 30 mg と PVP の 1 回投与方法) について実施し、採卵数、正常胚数、正常胚率を検討した。その結果、M 法は正常胚数ならびに正常胚率ともに他の方法と比べて著しく高かったことから、過排卵処置法として最も有効であることが明らかになった。採胚時における血漿  $\beta$ -カロテン(BC)濃度と採胚成績の関係を調べた結果、血漿 BC 濃度と正常胚数および正常胚率の間に正の相関が認められ、採胚時に血漿 BC 濃度を高くすることにより採胚成績が向上することが示唆された。また胚移植法についてグリセリンとショ糖を耐凍剤として用いる M 法とエチレングリコールを耐凍剤として用いる D 法の 2 種類のダイレクト法ならびにステップワイズ法を比較した結果、3 つの方法の中で D 法が最も操作性に優れ、受胎率も安定して高かったことから D 法が実用性に優れていることが確認された。

クローン胚の効率的作出方法を確認するために、ドナー胚として体外受精胚または生体由来胚を用いてクローン胚を作出し、それぞれの胚における発生能、流産発生率を比較した。いずれの胚をドナーとして用いた場合でも、産子への発生能が高かったが、生体由来胚をドナー胚として用いた場合、体外受精胚をドナー胚として用いた胚と比較し、産子への発生能が高く、流産発生率が低い傾向を示した。また、核移植胚由来の雌牛の繁殖能力ならびに泌乳能力を調べたところ、いずれも正常であることが国内においては初めて明らかにされた。これらのことからクローン胚をダイレクト法により、凍結融解後に簡易に受胎牛に移植して、クローン牛を生産することが可能であることが明らかになった。

これらの知見は牛胚移植技術の野外普及に大きく貢献するもので、極めて意義深いものである。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文献を総合的に審査し、本論文が博士学位(農学)に値するものと判断した。