

学位論文の審査結果の要旨

本論文は、動物発生工学の発展を支える「ウシ精子の凍結乾燥」技術に関するものである。復水後に精子が運動性を失っていたとしても顕微授精技術の適用により胚盤胞を作出してレシピエント雌に移植すれば個体生産も可能となる。ところがウシにおける卵細胞質内精子顕微注入法（以下、ICSI と略）研究の歴史は浅く、凍結乾燥ウシ精子を対象とした胚盤胞の体外作製システムはまだ確立されていない。まず、体外受精（IVF）したウシ卵子の胚盤胞発生に抗酸化効果の増強が有効かを調べた。有効ならばその処理を ICSI 卵子にも適用しようとしたが、結果はネガティブであった。次に ICSI 由来の胚盤胞のガラス化耐性を、対照の IVF 由来胚盤胞と比較した。胚移植に備えて ICSI 由来胚盤胞を保存する際には、拡張胚盤胞に到達するまで発生培養時間を延長してからガラス化に供すればいいことがわかった。また、受精成立後の雌雄両前核の移動・接近に必須と考えられている精子星状体形成能（中心体による微小管形成中心機能を反映）を前核期卵のチューブリン抗体染色により調べたところ、精子星状体形成阻害は凍結乾燥ではなく、ICSI の行程によって引き起こされるとわかった。最後に、凍結乾燥後の溶液に「コラプス」と呼ばれる凍結乾燥ケーキの構造崩壊を生じていない多孔質のスポンジ様構造を形成させる方法を模索した。コラプス発生の回避のためには、溶液の最大凍結濃縮層ガラス転移温度 (T_g) と乾燥温度の関係に注意を払うことが重要であるとわかり、この点の最適化によって凍結乾燥ウシ精子の ICSI に由来する胚盤胞の作製効率を有意に改善することができた。

上記の内容をコンテンツとする学位論文は、4 編の英語発表論文（うち 3 編はカテゴリー別インパクト係数ランキングで上位 30%以内に入る生殖生物学領域・低温生物学領域の一流国際誌）に基づいて、読者にとって研究背景の理解を助ける図表を各章に補いながら、正確な英語で書かれていた。公聴会・最終試験において確認できた英語力や基礎学力、プレゼンテーション能力を含め、原 弘真 氏は「博士（農学）」の学位授与に必要な生物機能科学講座における博士課程在籍 30 ヶ月での早期修了の条件等をすべて満たし、学位号を授与されるに十分に値する、と審査委員全員一致で判断した。

公表主要論文名

1. H. Abdalla, M. Shimoda, H. Hara, H. Morita, M. Kuwayama, M. Hirabayashi, S. Hochi. (2010) Vitrification of ICSI- and IVF-derived bovine blastocysts by minimum volume cooling procedure: effect of developmental stage and age. *Theriogenology*, 74 (6), 1028-1035. 【2010 年 10 月発行に掲載】
2. H. Hara, H. Abdalla, H. Morita, M. Kuwayama, M. Hirabayashi, S. Hochi. (2011) Procedure for bovine ICSI, not sperm freeze-drying, impairs the function of the microtubule-organizing center. *J. Reprod. Dev.*, 57 (3), 428-432. 【2011 年 6 月発行に掲載】
3. H. Hara, M. Tagiri, IS. Hwang, M. Takahashi, M. Hirabayashi, S. Hochi. (2014) Adverse effect of cake collapse on the functional integrity of freeze-dried bull spermatozoa. *Cryobiology* 68 (3), 354-360. 【2014 年 6 月発行に掲載】
4. H. Hara, I. Yamane, I. Noto, N. Kagawa, M. Kuwayama, M. Hirabayashi, S. Hochi. (2014) Microtubule assembly and in vitro development of bovine oocytes with increased intracellular glutathione level prior to vitrification and in vitro fertilization. *Zygote* 22, DOI 10.1017/S0967199413000105. 【2014 年発行に掲載予定】