

## 卵胞切出し法による胚盤胞の発生率と品質向上

鈴木亜由美・高山世絵梨・岡田幸之助\*

(畜産技術科・\*日獣大)

---

**【要 約】** トウキョウX卵巣から卵胞切出し法で採取した卵丘-卵母細胞複合体は、吸引法で採取したときよりも胚盤胞発生率が高く、発生した胚盤胞のうち約46%は細胞数が50個以上である。

---

### 【目 的】

トウキョウX体外生産胚を効率的に作出するため、卵母細胞へのダメージが少なく発生率が高いとされる卵胞切出し法を導入し、胚盤胞発生率を検証する。あわせて、発生した胚盤胞の品質(細胞数)を評価し、高品質胚盤胞の作出を目指す。

### 【方 法】

食肉処理場由来のトウキョウX卵巣から卵丘-卵母細胞複合体を異なる方法で採取し、体外発生試験に供した際の胚盤胞発生率を比較した。注射針-注射筒で卵胞から吸引する方法(吸引法)と、4から6mmの卵胞を切り出し、周囲に付着している結合組織を取り除いた後、顕微鏡下で卵胞膜を切開する方法(卵胞切出し法)により卵丘-卵母細胞複合体を採取した。40~41時間体外成熟した後、 $1.7\sim 3.4\times 10^5/\text{mL}$ に調整した凍結-融解精液で6時間媒精し、体外発生培養開始48時間後の卵子分割率を調査した。体外発生培養開始7日目に実体顕微鏡下で観察し、初期胚盤胞以上のものを採取した(図1)。これらを4%パラホルムアルデヒドで固定、蛍光色素(4',6-diamidino-2-phenylindole)で染色した。蛍光顕微鏡下で細胞数を測定し、20個以上を胚盤胞として発生率を算出した(図2)。

### 【成果の概要】

1. 採取方法の違いによる胚盤胞発生率を比較した結果、卵胞切出し法は吸引法よりも発生率が高かった(表1)。また得られた胚盤胞に対する拡張胚盤胞の割合は、吸引法では48.0%であったのに対し、切出し法では65.2%に向上した。
2. 切出し法で採取した卵丘-卵母細胞複合体を用いて、体外発生試験を24回実施した結果、17回で胚盤胞の発生が認められた。発生しなかった7回との培養条件を比較したところ、媒精時の精子数に有意差みられ(表2)、精子数と発生率に弱い負の相関が認められた( $r=-0.32$ )。しかし、体外発生培養開始2日目の卵子分割率および媒精精液の運動性(活発に運動している精子の割合を%で示す)に差はみられなかった(表2)。
3. 発生した胚盤胞の細胞数を測定した結果、吸引法において平均細胞数は34.0個に対し、切出し法では50.2個であり、また最大細胞数は前者が53個に対し後者では116個であった(表3)。切出し法では、得られた全胚盤胞の45.9%が細胞数50個以上であり、うち100個以上のものも少数ながら観察された(表3)。
4. まとめ:卵丘-卵母細胞複合体の採取法の違いにより、胚盤胞発生率に差が認められた。今後、媒精時の精子数調整により、さらなる発生率向上を検討する。

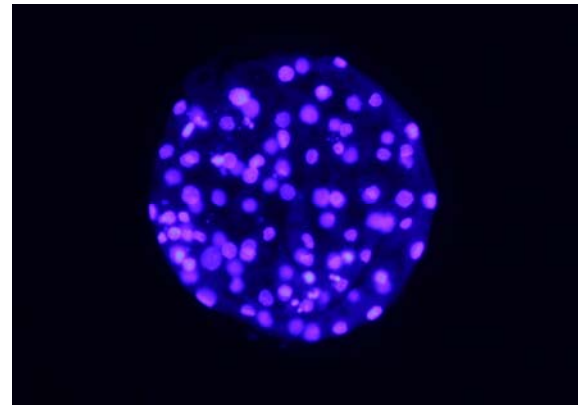
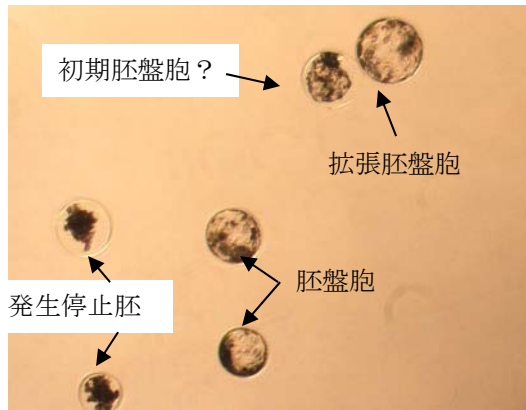


図1 初期胚盤胞～拡張胚盤胞(発生7日目)

図2 蛍光染色した胚盤胞(発生7日目)

表1 採取法の違いによる胚盤胞発生率の比較

採取法	供試卵母細胞数	分割率(%) (発生2日目)	胚盤胞発生率(%) (発生7日目)	
			総合	拡張
吸引法	455	215(47.3)	25(5.5)	12(2.6)
卵胞切出し法	463	283(61.1)	46(9.9)	30(6.5)
$\chi^2$ -test		P<0.01	P<0.05	n. s.

n. s. 有意差なし

表2 体外発生試験における培養条件の比較

胚盤胞出現の有無	実験反復回数	体外成熟時間(h) <sup>1</sup>	媒精時間(h)	媒精時平均精子濃度( $\times 10^5$ /mL) <sup>1</sup>	精子運動性(%) <sup>1</sup>	分割率(%) (発生2日目) <sup>1</sup>
有	17	40.9 $\pm$ 0.73	6	2.02 $\pm$ 0.16	38.4 $\pm$ 13.1	55.0 $\pm$ 13.7
無	7	40.7 $\pm$ 0.49	6	2.34 $\pm$ 0.50	54.3 $\pm$ 18.1	41.5 $\pm$ 19.0
$t$ -test <sup>2</sup>		n. s.		P<0.05	n. s.	n. s.

<sup>1</sup>平均値 $\pm$ 標準偏差, <sup>2</sup>n. s. 有意差なし

表3 得られた胚盤胞の細胞数

採取法	供試胚盤胞数	平均細胞数 <sup>1</sup>	最大細胞数	細胞数50以上(%) <sup>2</sup>	細胞数100以上(%) <sup>2</sup>
吸引法	7	34.0 $\pm$ 11.5	53	-	-
卵胞切出し法	87	50.2 $\pm$ 23.6	116	40(45.9)	4(4.7)

<sup>1</sup>平均値 $\pm$ 標準偏差, <sup>2</sup>吸引法は供試数が少ないため算出せず