

ウシ体外受精における極少数胚培養に対する多数胚培養液の胚発生に及ぼす影響

藤田達男・広瀬啓二¹⁾・志賀一穂 (大分県畜産試験場, ²⁾三重家畜保健衛生所)

Tatsuo FUJITA, Keiji HIROSE and Kazuho SHIGA :

Effects of Medium Cultivated a Large Number of Bovine Oocytes on In Vitro Development of Embryos Cultivated in Very Low Numbers

超音波経膈採卵法によって血統の明らかな体外受精胚作出が可能となったが、藤田¹⁾らは採取された正常卵子数が少ない場合、胚盤胞率が低下する傾向がみられたことを報告している。本研究では極少数胚培養での発生率を確認し、多数胚培養液を極少数胚培養液へ添加し培地交換することによって、極少数胚の発生率が改善するかどうかを明らかにする。

1. 試験方法

屠場ウシ卵巣から吸引採取した卵子卵丘細胞複合体を100 μ lの5%CS加TCM-199スポット中に約20個導入し、20時間成熟培養した後、heparin - caffeine法で処理した精子浮遊液100 μ lスポットに移し、5時間媒精した。媒精後、卵丘細胞を除去し、発生培地(0.25mg/mlリノール酸アルブミン+5%CS加CRLaa)に投入した。なお、成熟培養、媒精、発生培養は、すべて38.5°C、5%CO₂、95%空気湿度条件下で行った。

実験1:胚1個当たり5 μ lの培養液量で、1, 2, 3, 4および5個を発生培養した。

実験2:胚55個を400 μ lのスポットで発生培養し、2日目に培養スポットから培養液350 μ lを除去し、培養開始日に作製した培養条件中に保存していた培養液350 μ lを加え培地交換した。同様に3, 4, 5および6日目に個々のスポットを培地交換した。

実験3:胚1個を5 μ lのスポットで発生培養し、2日目に、同時に発生培養を開始した多数胚(55胚/400 μ l)発生培養液5 μ lを1胚培養スポットに添加、混和後、5 μ lを除去する方法で同様に3, 4日目にも培地交換した。以上の実験では、媒精日を0日として、2日目に卵割率、7~9日目に胚盤胞率およびB/C率(胚盤胞数/卵割数×100)を調べた。

2. 結果および考察

第1表に極少数胚発生培養成績を示した。1個の胚を5 μ lの培養液で発生培養した場合、胚盤胞率13.3%、B/C率20%。1胚当たりの培養液量を5 μ lにして胚数を2~5個と増やしていくと、胚盤胞率、B/C率は胚数が増えるほど高くなり、胚数が1~2個の極少数での発生培養は、5個の発生培養よりも有意に低かった。この

第1表 極少数胚発生培養成績 (実験1)

胚数	培養液量 (μ l)	卵割率 (%)	胚盤胞率 (%)	B/C率 (%)
1	5	30/45 (66.7)	6/45 (13.3) a	20.0 a
2	10	31/49 (63.3)	7/49 (14.3) ab	22.6 a
3	15	29/50 (58.0)	12/50 (24.0) ab	41.4 ab
4	20	32/50 (64.0)	13/50 (26.0) ab	40.6 ab
5	25	31/49 (63.3)	16/49 (32.7) b	51.6 b

注) B/C率: 胚盤胞数/卵割数×100
ab: 異符号間に有意差あり (P<0.05)

ことから、O'Dohertyらが報告しているように胚は互いに作用し合って胚の発育を促進する何らかの物質「胚発育因子」を培養液中に分泌していることが示唆された。

第2表に培地交換日の発生への影響を示した。2日目に培地交換を行った場合、胚盤胞率37.7%、B/C率43.5%。3~4日目の培地交換でも、2日目とはほぼ同程度の発生率であったが、これらは、5~6日目の発生率よりも低い値であった。交換日ごとの有意差はみられなかったが、前半(2~4日目)と、後半(5~6日目)では有意差がみられ、2~4日目の培地交換は発生率を低下させたことから、「胚発育因子」は主に発生培養の前半に分泌されていることが示唆された。従って、極少数胚の発生培養液に、2~4日目の多数胚培養液を添加し、培地交換すれば発生率が改善すると考えた。

第2表 培地交換日の違いによる発生への影響 (実験2)

交換日	卵割率 (%)	胚盤胞率 (%)	B/C率 (%)
2日目	46/53 (86.8)	20/53 (37.7)	20/46 (43.5)
3日目	45/54 (83.3)	22/54 (40.7)	22/45 (48.9)
4日目	42/52 (80.8)	20/52 (38.5)	20/42 (47.6)
5日目	40/50 (80.0)	25/50 (50.0)	25/40 (62.5)
6日目	38/51 (74.5)	24/51 (47.1)	24/38 (63.2)

注) (55胚/400 μ l)、350 μ l培地交換

第3表に、多数胚培養液培地交換による1胚発生培養への影響を示した。培地交換しなかった場合は胚盤胞率13.2%、B/C率18.3%培地交換した場合は、胚盤胞率27.7%、B/C率36.5%と約2倍になり、発生率は有意に改善した。この実験で交換培地を供給した多数胚培養3回分の胚盤胞率は53.1%であった。今回の実験では1回50%ずつ培地交換したが、交換割合を高めれば発生率はさらに向上し、多数胚培養の発生率に近づくものと思われる。

第3表 多数胚培養液培地交換による1胚発生への影響 (実験3)

培地交換	卵割率 (%)	胚盤胞率 (%)	B/C率 (%)
無	82/114 (71.9)	15/114 (13.2) a	15/82 (18.3) a
有	85/112 (75.9)	31/112 (27.7) b	31/85 (36.5) b
多数胚 (3回)	128/155 (82.6)	68/155 (43.9) c	68/128 (53.1) c

注) abc: 異符号間に有意差あり (P<0.05)

以上の結果から、発生培養前半に胚が分泌し、互いに作用し合う「胚発育因子」の存在が示唆され、この因子を多く含むと思われる多数胚培養液を極少数胚培養液へ培地交換することによって、極少数胚の発生率を改善できることが明らかになった。超音波経膈採卵において採取卵子数が少なかった場合の体外受精胚発生培養に応用可能と思われる。

参考文献

- 1) 藤田達男・広瀬啓二・志賀一穂:平成8年度大分県畜産試験場試験成績報告書。26:15-19, 1997.
- 2) O'DOHERTY E.M. et al, *Theriogenology* 48: 161-169, 1997.