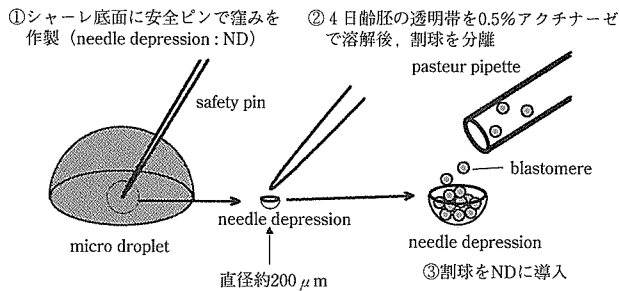


Needle Depression を用いた割球集合法によるウシ体外受精由来胚の細胞数改善

小林修司・今井 敬¹⁾・後藤裕司²⁾・金山佳奈子³⁾・阪谷美樹・高橋昌志・小島敏之¹⁾
 (九州沖縄農業研究センター・¹⁾家畜改良センター・²⁾家畜改良センター十勝牧場・³⁾生物資源研究所)

Shuji Kobayashi, Kei Imai, Yuji Goto, Kanako Kaneyama, Miki Sakatani, Masashi Takahashi and Toshiyuki Kojima :
 A Possible Method for Increasing Cell Number of In Vitro Produced Bovine Embryos

ウシ核移植胚は生体由来胚や体外受精胚と比較して受胎率および耐凍性が劣るといわれており、その理由の一つとして胚盤胞期胚における細胞数が少ないことが挙げられる。そこで本実験では、受精卵移植後の受胎率向上を図ることを目的とし、再構築した初期胚の割球を過剰に集合させることにより胚盤胞期胚の細胞数を増加する割球集合法の検討を、核移植胚の代替として体外受精胚を用いて行った。



第1図 needle depression を用いた割球集合法

1. 材料および方法

食肉処理場由来卵巣より吸引採取した卵子を体外受精した4日齢胚を供試した。割球集合法は、0.5%アセチン酸で透明帯を溶解後、ピペッティングにより分離した割球を、安全ピンで作製したシャーレ底面の窪み（needle depression: ND）に導入し培養を行った。

体外受精後7日齢胚の胚盤胞発生数および細胞数について観察し、NDへの導入割球数、1ドロップ当たりのND数等の最適条件について実験1-3の通り検討した。全ての実験について対照区として通常の体外受精胚の細胞数を比較検討した。実験1ではNDによる胚盤胞の作出について検討した。底面の形状がU字型の培養プレートにNDを作製（1ND/1ウェル）し、割球を16または32個導入し検討した。実験2では培養用シャーレにドロップを作製し、1ドロップ当たりのND数（1個 vs. 10個）について検討した。実験3では1ドロップ当たり9-11個のNDを作製し、NDへの導入割球数（30 vs. 45 vs. 60）について検討した。

2. 結果および考察

実験1より、NDに割球を導入することによって vesicle（胚盤胞）を形成することがわかり、細胞数に関

して割球数の多い32個区（140.6個）が16個区（48.2）に対し有意に高い値を示した（ $0 < 0.05$ ）。

実験2より、培養ドロップ中のNDについては10個区（160.3個）が1個区（132.4個）より細胞数が多かった。

第2表 1ドロップ当たりのND数が作出胚盤胞数と平均細胞数に及ぼす影響

	作製ND総数	作出胚盤胞数	平均細胞数
1ND区	30	30 (100)	132.4±7.2 ^{ab}
10ND区	30	30 (100)	160.3±10.2 ^a
体外受精胚	—	16	98.8±6.5 ^b

注) 異符号間に有意差あり (P < 0.05)。

実験3よりNDへの割球導入数を30、45および60個で細胞数を比較検討したところ、45および60個区が30個区に対し有意に高い値を示した（ $0 < 0.05$ ）。

第3表 NDへの導入割球数が作出胚盤胞数と平均細胞数に及ぼす影響

	作製ND総数	作出胚盤胞数	平均細胞数
30個区	23	23 (100)	127.6±11.0 ^a
45個区	20	20 (100)	214.1±16.1 ^a
60個区	18	18	224.0±12.5 ^a

注) 異符号間に有意差あり (P < 0.05)。

以上の結果、NDへの割球導入数および1ドロップ当たりのND数を考慮することにより細胞数の多い vesicle（胚盤胞に相当）を作出することが可能となった。細胞数が増加することにより、インターフェロン α 等の分泌も通常と比較して増加すると考えられ、体細胞クローン、特にトランスジェニック動物の作出効率を改善できることが示唆された。

第1表 NDを用いた胚盤胞作出効率と平均細胞数

	作製ND総数 (ウェル総数)	作出胚盤胞数 (%)	平均細胞数
16個区	6	6 (100)	48.2±8.6 ^b
32個区	18	18 (100)	140.6±15.2 ^a
体外受精胚	—	14	117.6±8.0 ^a

注) 異符号間に有意差あり (P < 0.05)。