

○曾我康史・江副大輔・井上一輝・宮島恒晴
(佐賀畜試)

【目的】

ウシ卵子は経膣採卵により育成牛、妊娠牛を含む高能力雌牛から数多く採取できるようになった。採取した卵子は一般的に体外受精し、受精胚は凍結保存されるが、直ちに体外受精せずに卵子だけを保存できれば、雌側からの改良が効率的に行えると考えられる。

佐賀県では、これまでガラス化保存した卵子からの子牛生産には成功しているものの、加温後の卵子の生存性および体外受精後の胚発生率が低いと改善する必要がある。

そこで、本試験では効率的な卵子のガラス化保存するためにガラス化保存に用いるデバイスの違いがガラス化保存卵子の体外受精後の発生胚の発育および品質に及ぼす影響について調査した。

【材料および方法】

食肉処理場由来のウシ卵巣の長径3 mm以下の卵胞より吸引回収した卵丘細胞の付着および卵細胞質に顕微鏡下で異常の認められない G1~G3 の卵子を供した。

供試卵子は成熟培養を 21 時間行い、培養終了後、卵丘細胞を 1~2 層残すように一部除去し、平衡液中で 12 分間平衡した後、ガラス化液に移してから 30 秒以内にデバイスに乗せ液体窒素に浸漬してガラス化した。デバイスは Mounted CryoLoop (CL 区) および CryoTop (CT 区) を用い、デバイス 1 つにつき供試卵子を CL は 5 個、CT は 10 個を一度にガラス化保存した。

成熟培養後、直ちに体外受精に供したものを対照区とした。

ガラス化保存卵子は加温後体外受精を行い、卵丘細胞および付着精子を完全に除去し発生培養を行った。

発生培養 2 日目に卵割胚数 (率)、8 日目までの発生胚数 (率) を調査し、8 日目における胚盤胞 (BL) および拡張期胚盤胞 (Ex) は内部細胞塊 (ICM) および栄養外胚葉 (TE) の細胞数の計数を行った。

また、ガラス化保存を行った試験区については、加温後の回収卵子数 (率) および加温後の生存卵子数 (率) も調査した。

【結果および考察】

胚発生成績は、加温後の回収卵子率 (CL 区 : 88.9%, CT 区 : 98.0%) に有意な差は認められなかったが、生存卵子率は CL 区 (81.7%) が CT 区 (66.4%) と比較して有意 ($p < 0.05$) に高かった。また、その後の発生培養胚数からの胚発生率は試験区間 (対照区 : 34.5%, CL 区 : 20.9%, CT 区 : 22.5%) に有意な差は認められなかったものの、供試卵子数からの胚発生率は対照区 (34.0%) と比較して CL 区 (15.0%), CT 区 (15.0%) とともに有意 ($p < 0.01$) に低かった。

発生培養 8 日目の胚盤胞および拡張胚盤胞では、ステージが BL である発生胚の ICM (対照区 : 24.3 ± 2.9 , CL 区 : 19.0 ± 4.2 , CT 区 : 20.0 ± 1.6) および TE (対照区 : 44.5, CL 区 : 52.3, CT 区 : 57.6) の細胞数に有意な差は認められなかった。また、ステージが Ex である発生胚についても ICM (対照区 : 32.1, CL 区 : 26.1, CT 区 : 21.4) および TE (対照区 : 95.5, CL 区 : 92.7, CT 区 : 90.3) の細胞数に有意な差は認められなかった。

以上の結果から、CL もしくは CT をデバイスに用いてガラス化保存した場合、対照区と比較して胚発生成績は劣るものの、発生した胚の形態的な品質については同等であると考えられる。また、CL と比較してより多くの卵子を一度にガラス化保存できる CT の方がより効率的な胚生産が可能であると考えられる。