

○杉野文章・松尾麻未  
(宮崎畜試)

### 【目的】

近年、黒毛和種素牛の需要増加から胚移植 (ET) 技術への関心が高まっており、本県においても ET 頭数は年々増加している。そのような中、体外胚の生産技術が現場普及しつつあり、本県においても体外胚の利用割合は年々増加している。しかしながら、本県での胚移植頭数 5,317 頭の内、体外胚移植頭数は 497 頭 (9.3%) に留まっており (2019)、大きく普及はしていない現状である。体外胚移植が現場普及しない大きな要因として、体内胚と比較し、受胎率が低く、流産や難産率が高いことが挙げられ、体外胚の品質向上が望まれている。

そのような中、マウスの分野では、マイクロ流体デバイスで選別された精子を用いた体外受精を行った結果、受精率やその後の胚発生率が向上したとの報告があり (Tubasa TAKAHASHI et. al., 2017)、ウシの分野でも国立研究開発法人産業総合研究所 (以下、産総研) が「牛用の運動性精子選別器具 (図 1)」を開発している。

そこで、本研究では、産総研が開発した選別器具により運動性の高い精子を捕集し、この選別精子を用いた体外受精により、分割率や胚発生率が向上するか検証した。

### 【材料および方法】

食肉処理場で採取した黒毛和種雌牛 53 頭の卵巣及び宮崎県畜産試験場内で飼養されている繁殖雌牛 2 頭から卵丘細胞卵子複合体 (COCs) を回収した。なお、場内飼養牛については経膈採卵により COCs を回収した。吸引した COCs は、細胞質が均一で、かつ、卵丘細胞が数層緊密に付着しているものを試験に供した (食肉加工所由来卵子: 548 個、場内飼養牛由来卵子: 101 個)。試験区 (運動性精子区) 及び対照区 (場内定法区) を設定し、COCs の品質・個数に偏りがないよう振り分けた。

体外培養法については、試験区でマイクロ流体デバイスによって選別された精子を媒精に使用した以外、場内定法に従って培養を行った。

媒精から 48 時間目に 2~4 細胞期、5 細胞期以上、未受精卵の個数を調べ、卵割率を算出した。また、

食肉加工場由来卵子については、卵割検査終了後、媒精日を 0 日として、6~9 日目に胚盤胞発生数、10 日目に脱出胚盤胞数及び生存胚数を調査した。なお、OPU 由来卵子については、6~9 日目に胚盤胞に発生したものを、宮崎シンプル法にて凍結保存を行った。その後、定法に従って融解した後、38.5℃、5%CO<sub>2</sub>、95%空気下、100 μM β-メルカプトエタノールを添加した 10%FBS 添加 TCM-199 で培養し、24、48、72 時間目の生存胚数と脱出胚盤胞数について調査を行った。

なお、統計解析は  $\chi$  二乗検定で実施した。

### 【結果および考察】

食肉加工場由来卵子では、卵割率は対照区 79.9%、試験区 68.2%であり、対照区が有意に高い結果となった ( $P < 0.01$ )。また、対照区の方が 5 細胞以上胚の割合が高く、試験区では分割速度が遅くなる可能性が示唆された。また、対照区で胚盤胞発生率、脱出胚盤胞率が有意に高くなった。OPU 由来卵子でも同様の結果となった。

さらに、凍結融解後の生存性についても有意な差は認められず、選別精子を用いることによる効果は確認されなかった。

選別精子による効果が認められなかった要因として、使用したマイクロデバイスでは体外受精に必要な精子数を捕集できず、受精率が低下したことが挙げられる。今後、体外受精に精子選別器具を活用するには、さらに効率的に精子が捕集できる器具の開発が必要である。

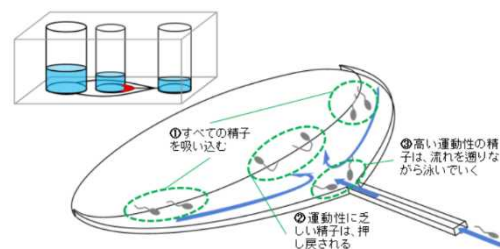


図1 器具の概要 (産総研 HP より抜粋)

精子の走流性を活用し、  
運動性の高い精子のみを捕集する