

2016年度
修士論文

胚盤胞への発生能および受胎性の高いウシ体
外受精卵の選別方法の確立に関する研究

*Study on establishment of a kinetics-based
selection system of in vitro fertilization
embryos with high competence for
development into blastocysts and conception*

21531011

高山 茉莉

指導教員 家畜繁殖学 堂地 修 教授

動物生殖工学 今井 敬 教授

酪農学園大学酪農学部酪農学科

目次

緒論	1
第 I 章 ウシ体外受精卵の卵割形態が受精卵の発生に及ぼす影響		
第 1 節 緒言	4
第 2 節 材料および方法	5
第 3 節 結果	12
第 4 節 考察	23
第 5 節 要約	27
第 II 章 ウシ性選別精液が体外受精後の卵割開始時間に与える影響		
第 1 節 緒言	29
第 2 節 材料および方法	30
第 3 節 結果	35
第 4 節 考察	39
第 5 節 要約	43
第 III 章 ウシ体外受精卵の卵割形態が新鮮卵移植の受胎率に及ぼす影響		
第 1 節 緒言	45

第 2 節	材料および方法	4 6
第 3 節	結果	5 2
第 4 節	考察	5 8
第 5 節	要約	6 2
第 IV 章	総括	6 4
謝辞		7 0
引用文献		7 1
英文要約		7 8

緒 論

哺乳動物における受精卵移植は、1890年に Heape[14]が、初期受精卵の移植試験で子ウサギの生産に成功したことが始まりである。ウシ受精卵移植の初めての成功は、1951年に Willettら[33]が報告している。また、1970年代には受精卵の凍結保存技術や[32, 34]、ウシでは頸管経由による受精卵移植技術が開発されたことにより、急速に実用化が進んだ。世界で行なわれているウシの受精卵移植頭数は年々増加している。また、近年経膈採卵（OPU：Ovum Pick-Up）技術と体外受精（IVF：*In Vitro Fertilization*）技術の普及から、体外受精卵の移植頭数の増加が著しい。世界における OPU-IVF由来の体外受精卵の移植頭数は、1997年に 30,569頭であり、2013年には 393,625頭となっている[16-17]。

体外受精技術は、哺乳動物では 1951年に Chang[7]がウサギの生産に初めて成功した。ヒトでは、1978年に初めて体外受精卵による子供が誕生しており[27]、ウシでは 1982年に Brackettら[4]によって報告されている。近年、ウシの体外受精による子牛生産は確立されつつあるが、過大子、妊娠期間の延長、流産の割合が高いなどの問題点が指摘されている[18]。また、体外受精卵は体内受精卵に比べて受胎率が低い

という課題がある。Sugimuraら[28]は、タイムラプスシネマトグラフィー、受精卵呼吸量測定装置および個別管理培養ディッシュを用い、5つの指標により受精卵を選別することで新鮮卵移植において受胎率の高い受精卵の選別が可能であると報告している。しかし、タイムラプスシネマトグラフィーおよび受精卵呼吸量測定装置は高額であるため畜産現場への普及は難しい。そこで、谷合[31]は、倒立顕微鏡と個別管理培養ディッシュを用いた簡易な観察により受精卵を選別することで、胚盤胞発生能の高い良質な受精卵の選別が可能であると報告した。

ヒトの体外受精では受精卵を選別する際に胚盤胞期の品質評価のみでなく、発生過程の形態観察によって受胎能力の高い受精卵の選別が行なわれている[3, 10, 24]。中でも、第一卵割の時間が受精卵の選別の指標として用いられており、第一卵割が早い受精卵が、遅い受精卵に比べて胚盤胞発生能力および受胎能力が高いと報告されている[24]。一方、ギルヌス[11]は、卵割速度の遅い受精卵が存在し、それらの受精卵は胚盤胞発生能が低いとは限らず、谷合[31]の報告に加えて新たに観察時間を追加するとともに、第一卵割が遅れる理由について検討する必要があると報告している。

Bermejo-Alvarez ら[1]は、ウシ性選別精液を用いた体外受精において、第一卵割は通常精液を用いた場合に比べて著しく遅延すると報告している。このことから、体外受精において、性選別精液を用いることが第一卵割の時間に影響している可能性が考えられる。

そこで、本研究では倒立顕微鏡と個別管理培養ディッシュを用いた簡易な受精卵の形態観察の有効性を明らかにするため、5つの指標を用いて受精卵を選別し、胚盤胞発生率および生産胚率に及ぼす影響について検討した。また、ウシ性選別精液が体外受精後の卵割開始時間に与える影響について検討した。そして、5つの指標を用いて選別した受精卵の新鮮卵移植の受胎率についても検討した。

第 I 章 ウシ体外受精卵の卵割形態が受精卵の発生に及ぼす 影響

第 1 節 緒 言

近年、ウシ受精卵移植の実施頭数は増加し、体外受精卵の需要が増えている。平成 26 年度農林水産省生産局の調査[23]によると、わが国のウシ体外受精卵の移植頭数は平成 21 年度が 9,048 頭であったのに対し、平成 26 年度には 18,907 頭と約 2 倍に増加している。しかし、体外受精卵は体内受精卵に比べて新鮮卵および凍結卵ともに受胎率が低い。また、体外受精卵の移植では過大子、妊娠期間の延長、流産の割合が高いなどの問題点が指摘されている[18]。

ヒトの体外受精では、妊娠率の高い受精卵を選別する方法として初期受精卵の形態観察が用いられている[3, 9, 24]。ウシの体外受精においても、Sugimura ら[28]がタイムラプスシネマトグラフィー、受精卵呼吸量測定装置および個別管理培養ディッシュを用い、5 つの指標により受精卵を選別することで新鮮卵移植において受胎率の高い受精卵の選別が可能であると報告している。このことから、体外受精卵を選別する際には胚盤胞期の品質評価のみでなく、発生過程の形態観察

を行い受精卵の選別をする必要があると考えられる。しかし、タイムラプスシネマトグラフィーおよび受精卵呼吸量測定装置は高額であるため畜産現場への普及は難しい。そこで、谷合[31]は倒立顕微鏡と個別管理培養ディッシュを用いた簡易な受精卵の観察が、胚盤胞発生能の高い良質な受精卵の選別方法として有効であると報告した。また、ギルヌス[11]は卵割速度の遅い受精卵が存在し、それらの受精卵は胚盤胞発生能が低いとは限らず、谷合[31]の報告に加えて新たに観察時間を追加する必要があると報告している。

そこで、本研究では倒立顕微鏡と個別管理培養ディッシュを用いた簡易な受精卵の形態観察の有効性を明らかにするため、再度指標を見直し、胚盤胞発生率および生産胚率に及ぼす影響について検討した。

第2節 材料および方法

1. 供試牛

本章における経膈採卵（以下 OPU : Ovum-Pick Up）の供卵牛は、ホルスタイン種未經産牛 5 頭（延べ 6 頭）および経産牛 26 頭（延べ 36 頭）、黒毛和種未經産牛 1 頭（延べ 1 頭）および経産牛 21 頭（延べ 41 頭）である。

2. 供試卵子

1) 卵子の採取

供試牛から OPU により未成熟卵子を採取した。OPU は、超音波画像診断装置 (HS-2000 または HS-2100V、本多電子) に採卵用プローブ (以下プローブ ; HCV-4710MV、本多電子) を装着して行った。卵子吸引に先だって、プローブを腔内に挿入して、両側卵巢の卵胞数および黄体数を計測した。その後、プローブの採卵針ガイドに採卵針 (COVA ニードル A タイプ、ミサワ医科工業) を挿入し、卵胞液を吸引した。吸引にはバキュームポンプ (Model4、富士平工業) を用い、吸引圧は 120mHg に調節した。卵子の回収液には 1% の子牛血清 (以下 CS ; 16170-078、Gibco) および 5~10 単位/ml ヘパリンナトリウム (ノボヘパリン、持田製薬) を添加した乳酸リンゲル液 (ハルゼン-V 注射液、日本全薬工業) または修正リン酸緩衝液 (エンブリオテック、日本全薬) を用いた。OPU 終了後、回収液の入った 50ml 遠沈管は、発泡スチロールの容器に入れ、保温した状態で実験室に持ち帰った。

2) 卵子の検索

持ち帰った回収液はエムコン受精卵回収用フィルター（EM CON™ Filter、04135、Immuno Systems, Inc.）を用いて、液が透明になるまでろ過および洗浄した。その後、回収液を90mmプラスチックシャーレ（I-90-20、BIO-BIK）に移し、実体顕微鏡（SMZ645-3、Nicon）を用いて卵子の検索を行なった。回収した卵子は、10%CSを添加した修正ダルベッコリン酸緩衝液（以下D-PBS; 14190-136、Gibco）を入れた35mmプラスチックシャーレ（627161、Greiner bio-one）に集めた。

3) 卵子の品質評価

卵子の品質は、卵丘細胞が2層以上付着しているものをGrade1、卵丘細胞が1層以上付着しているものをGrade2、卵丘細胞の付着が1層以下または1/3以上付着しているものをGrade3、卵丘細胞が完全に剥離または付着が少ないものをGrade4、卵丘細胞が膨化またはクモの巣状に変性しているものを膨化卵子、卵子の直径が小さいものを小卵子として計6種類に分類した。そのうち、Grade1、2、3、4および膨化卵子の5種類を培養した。

3. 卵子の体外成熟培養

卵子の体外成熟培養には、5% CS および 0.02AU/ml FSH (アントリン R10、共立製薬) を添加した HEPES 緩衝 TCM-199 (以下 TCM-199 ; 12340-030、Gibco) を体外成熟培養液として用いた。回収した卵子は、10% CS を添加した D-PBS を入れた 35mm プラスチックシャーレを 3 枚用意し、順に卵子を移動して洗浄した。その後、体外成熟培養液で 2 回洗浄した。

洗浄した卵子は、60mm プラスチックシャーレ (1007、Falcon) に作製した 100 μ l の体外成熟培養液のドロップを流動パラフィン (ナカライテスク) で覆ったものに 20 個ずつ導入した。回収卵子数が 10 個以下であった場合は、50 μ l の体外成熟培養液のドロップに導入した。体外成熟培養は 38.5 $^{\circ}$ C、5% CO₂、95% 空気、湿度飽和の気相条件下で 22 時間行なった。

4. 体外受精

1) 生存精子の分離

体外受精には 25 頭のホルスタイン種雄牛 (このうち 9 頭は性選別精液) および 20 頭の黒毛和種雄牛の凍結精液を用い

た。凍結精液は37℃の温湯中に30秒間浸漬して融解した。融解した精液は、Takahashiら[30]の方法に準じてパーコール密度均衡法により生存精子を分離した。すなわちパーコール溶液（17-0891-01、GE Healthcare Bio-Sciences AB）および10倍濃度のBO液[4]を用い調製した90%パーコール溶液と、1倍濃度のBO液と90%パーコール溶液を同量ずつ混合して調製した45%パーコール溶液を用いた。性選別精液は、90%パーコール溶液と、1倍濃度のBO液と90%パーコール溶液を1:2の割合で混合して調製した60%パーコール溶液を用いた。調製した45%パーコール溶液を15mlプラスチック遠沈管

（Corning）に2ml入れた後、90%パーコール溶液または60%パーコール溶液2mlを底に入れ、融解した精液を45%パーコール溶液の上に重層した。重層した精液は、2000rpmで20分間遠心分離を行なった後、上清をアスピレーターで吸引除去し、生存精子を分離した。

2) 精子の受精能誘起法

精子の受精能誘起法は、IVF100（14E2J、機能性ペプチド研究所）の仕様書に従って実施した。すなわち、パーコールで選抜した精子に6mlのIVF100を加え、1800rpmで5分間遠心

分離を行い、上清をアスピレーターで吸引除去した。

3) 精子濃度調整および体外受精

洗浄した精液は、精子濃度が $10 \times 10^6/\text{ml}$ になるように IVF100 を加え調整し、精子浮遊液とした。

成熟卵子は IVF100 で 3 回洗浄した後、IVF100 で 35mm プラスチックシャーレに $50\mu\text{l}$ のドロップを作製し、流動パラフィンで覆ったものに 20 個ずつ導入した。成熟卵子を導入したドロップに精子浮遊液を $50\mu\text{l}$ 加え、最終精子濃度を $5 \times 10^6/\text{ml}$ に調整し、体外成熟培養と同様の気相条件下で 6 時間培養を行った。

5. 体外発生培養

体外発生培養には、5% CS を添加した CR1aa[26] を体外発生培養液として用いた。接合子は、ピペッティングにより卵丘細胞を完全に除去した後、体外発生培養液で 3 回洗浄した。洗浄した接合子は、個別管理培養ディッシュ（大日本印刷）を用いて培養した。個別管理培養ディッシュは 35mm シャーレ内の中央部（ $\phi 7\text{mm}$ の枠の中）に 25 個の微細なウェル（直径 $280\mu\text{m}$ 、深さ $160\mu\text{m}$ 、底面 7 度のテーパ形状）がある。こ

の上に体外発生培養液で $125\mu\text{l}$ のドロップを作製し、流動パラフィンで覆ったものに接合子を 25 個導入した。体外発生培養は 38.5°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 、 $5\% \text{O}_2$ 、 $90\% \text{N}_2$ 、湿度飽和の気相条件下で行なった。

媒精日を 0 日目として、7 から 9 日目に胚盤胞発生率および生産胚（移植可能受精卵）率を調べた。

6. 受精卵の選別指標

受精卵は 5 つの指標（図 1）を用いて選別した。受精卵の選別は倒立顕微鏡を用い、指標 1 を体外受精開始後 27 時間目に、指標 2 から 4 を体外受精開始後 31 時間目に、指標 5 を体外受精開始後 55 時間目に観察して行なった。指標 1 では、体外受精開始後 27 時間目に 2 細胞期の受精卵と、1 細胞期または 3 細胞期以上の受精卵に分類した。指標 2 では、体外受精開始後 27 時間目において卵割率が 50% 未満で、31 時間目に 50% 以上となった培養シャーレを対象とし、体外受精開始後 31 時間目に 2 細胞期の受精卵と、1 細胞期または 3 細胞期以上の受精卵に分類した。指標 3 では、体外受精開始後 31 時間目に 2 細胞期の受精卵と、1 細胞期または 3 細胞期以上の受精卵に分類した。指標 4 では、体外受精開始後 31 時間目に 2

細胞期の受精卵を対象とし、均等な 2 細胞期の受精卵と、不均等な 2 細胞期の受精卵またはフラグメントを有する 2 細胞期の受精卵に分類した。指標 5 では、体外受精開始後 55 時間目に 8 細胞期以上の受精卵と、8 細胞期未満の受精卵に分類した。

6. 統計分析

胚盤胞発生率および生産胚率は χ^2 検定を用いて分析した。

第 3 節 結 果

1) 胚盤胞発生率および生産胚率

指標 1 による選別での胚盤胞発生率および生産胚率を表 1-1 に示した。胚盤胞発生率および生産胚率は、体外受精開始後 27 時間目に 2 細胞期の受精卵が、1 細胞期と 3 細胞期以上の受精卵に比べ有意に高かった ($p < 0.01$)。指標 2 による分類での胚盤胞発生率および生産胚率を表 1-2 に示した。胚盤胞発生率は、体外受精開始後 31 時間目に 2 細胞期の受精卵が、1 細胞期と 3 細胞期以上の受精卵に比べ有意に高かった ($p < 0.01$)。また、3 細胞期以上の受精卵が、1 細胞期に比べて有意に高かった ($p < 0.01$)。生産胚率は、2 細胞期の受精卵

が、1細胞期 ($p < 0.01$) と 3細胞期以上の受精卵 ($p < 0.05$) に比べて有意に高かった。さらに、3細胞期以上の受精卵が、1細胞期に比べて有意に高かった ($p < 0.01$)。指標 3 による分類での胚盤胞発生率および生産胚率を表 1・3 に示した。胚盤胞発生率および生産胚率は、2細胞期の受精卵が、1細胞期のと 3細胞期以上の受精卵に比べ有意に高かった ($p < 0.01$)。指標 4 による分類での胚盤胞発生率および生産胚率を表 1・4 に示した。胚盤胞発生率は、体外受精開始後 31 時間目に均等な 2細胞期の受精卵が、不均等な 2細胞期の受精卵またはフラグメントを有する受精卵に比べて有意に高かった ($p < 0.01$)。指標 5 による分類での胚盤胞発生率および生産胚率を表 1・5 に示した。胚盤胞発生率および生産胚率は、体外受精開始後 55 時間目に 8細胞期以上の受精卵が、8細胞期未満の受精卵に比べ有意に高かった ($p < 0.01$)。

2) 選別指標の組み合わせによる胚盤胞発生率および生産胚率

指標 1 を用いた組み合わせによる胚盤胞発生率および生産胚率を表 1・6 に示した。胚盤胞発生率は、指標 1、3、4、5 (1+3+4+5) の組み合わせが、指標 1 ($p < 0.01$)、指標 1+3

($p < 0.01$) および指標 1+3+4 ($p < 0.05$) に比べて有意に高かった。生産胚率は、指標 1+3+4+5 が指標 1 および指標 1+3 に比べて有意に高かった ($p < 0.01$)。

指標 2 を用いた組み合わせによる胚盤胞発生率および生産胚率を表 1-7 に示した。指標 2+4+5 が胚盤胞発生率および生産胚率ともに最も高かったが、有意な差は認められなかった。

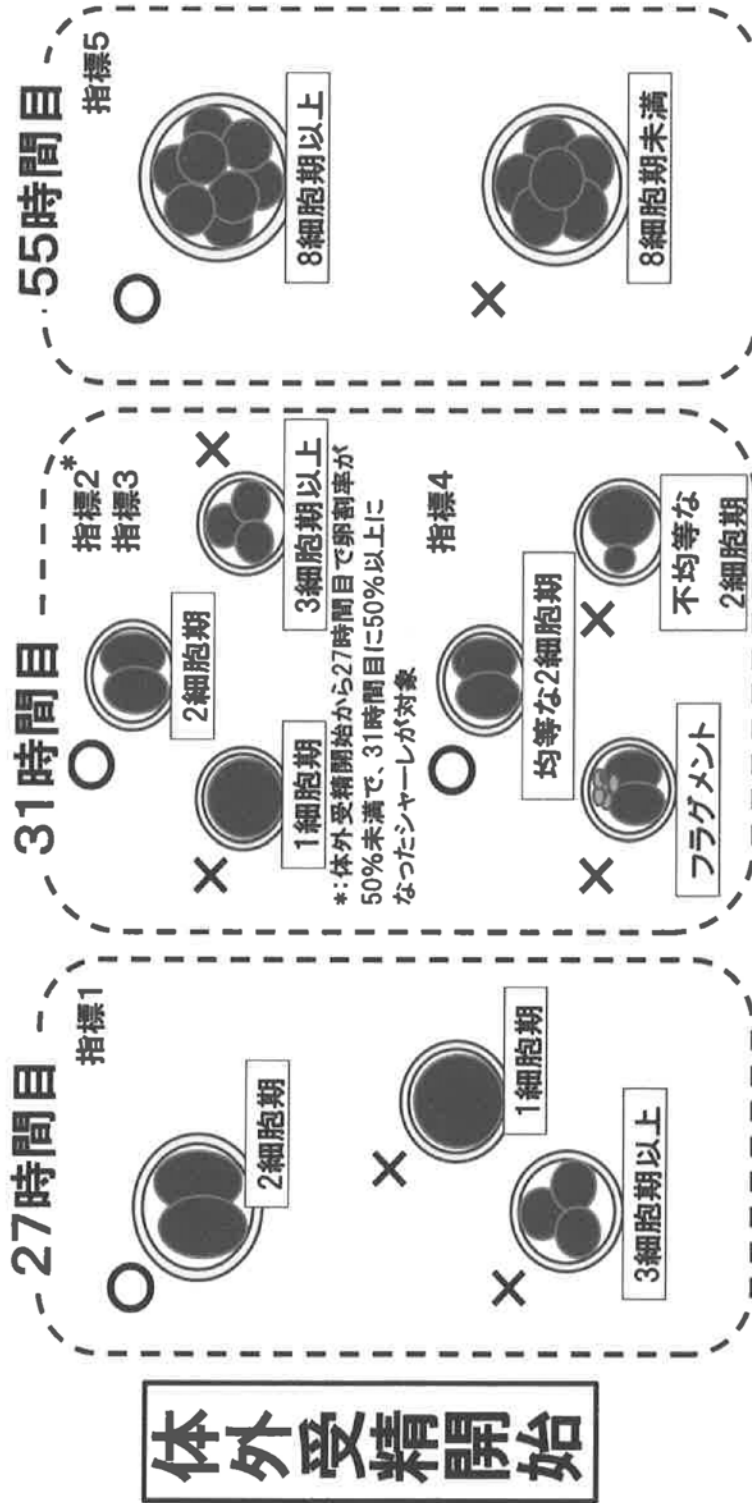


図1. 受精卵の選別指標

指標1は体外受精開始後27時間目に、指標2から4を体外受精開始後31時間目に、指標5は体外受精開始後55時間目を実施した。
 指標1：体外受精開始後27時間目に2細胞期の受精卵と、1細胞期または3細胞期以上の受精卵に分類
 指標2：体外受精開始後27時間目に卵割率が50%未満で、31時間目に50%以上となった培養シャーレを対象とし、体外受精開始後31時間目に2細胞期の受精卵と、1細胞期または3細胞期以上の受精卵に分類
 指標3：体外受精開始後31時間目に2細胞期の受精卵と、1細胞期または3細胞期以上の受精卵に分類
 指標4：体外受精開始後31時間目に2細胞期の受精卵を対象とし、均等な2細胞期の受精卵と、不均等な2細胞期の受精卵またはフラグメントを有する2細胞期の受精卵に分類
 指標5：体外受精開始後55時間目に8細胞期以上の受精卵と、8細胞期未満の受精卵に分類

表 1-1. 指標 1: 体外受精開始後 27 時間目の卵割形態が胚盤胞発生率および生産胚率に及ぼす影響

卵割形態	供試卵子数	胚盤胞数 (%)	生産胚数 (%)
1 細胞期	1,016	286(28.1) ^a	225(22.1) ^d
2 細胞期	384	270(70.3) ^b	237(61.7) ^e
3 細胞期以上	124	18(14.5) ^c	6(4.8) ^f

a-b^c,d-e^f: 異符号間に有意差あり (p<0.01)

表 1-2. 指標 2: 体外受精開始後 27 時間目の卵割率が 50%未満で、31 時間目に 50%以上となった培養シャーレの 31 時間目の卵割形態が胚盤胞発生率および生産胚数に及ぼす影響

卵割形態	供試卵子数	胚盤胞数 (%)	生産胚数 (%)
1 細胞期	268	33(12.3) ^a	17(6.3) ^d
2 細胞期	209	136(65.1) ^b	112(53.6) ^{e, f}
3 細胞期以上	59	27(45.8) ^c	23(39.0) ^{e, g}

a-b-c, d-e: 異符号間に有意差あり(p<0.01)

f-g: 異符号間に有意差あり(p<0.05)

表 1-3. 指標3:体外受精開始後 31 時間目の卵割形態が胚盤胞発生率および生産胚率に及ぼす影響

卵割形態	供試卵子数	胚盤胞数 (%)	生産胚数 (%)
1 細胞期	620	52 (8.4) ^a	32 (5.2) ^d
2 細胞期	673	446 (66.3) ^b	384 (57.1) ^e
3 細胞期以上	229	130 (56.8) ^c	104 (45.4) ^f

a·b·c, d·e·f: 異符号間に有意差あり (p<0.01)

表1-4. 指標4:体外受精開始後31時間目で2細胞期の胚の形態が胚盤胞発生率および生産胚率に及ぼす影響

卵割形態	供試卵子数	胚盤胞数(%)	生産胚数(%)
均等な2細胞期	442	319(72.2) ^a	273(61.8)
不均等または フラグメントを有する2細胞期	115	67(58.3) ^b	62(53.9)

a,b:異符号間に有意差あり(p<0.01)

表1-5. 指標5:体外受精開始後55時間目の卵割形態が胚盤胞発生率および生産胚率に及ぼす影響

卵割形態	供試卵子数	胚盤胞数(%)	生産胚数(%)
8細胞期未満	994	240(24.1) ^a	196(19.7) ^c
8細胞期以上	502	379(75.5) ^b	316(62.9) ^d

a-b, c-d: 異符号間に有意差あり(p<0.01)

表1-6. 指標1との組み合わせが胚盤胞発生率および生産胚率に及ぼす影響

選別指標	供試卵子	胚盤胞数(%)	生産胚数(%)
指標1	384	270(70.3) ^a	237(61.7) ^c
指標1+3	350	250(71.4) ^a	223(63.7) ^c
指標1+3+4	279	211(75.6) ^e	187(67.0)
指標1+3+4+5	167	143(85.6) ^{b, f}	126(75.4) ^d

a-b, c-d: 異符号間に有意差有り(p<0.01)

e-f: 異符号間に有意差有り(p<0.05)

表1-7. 指標2との組み合わせが胚盤胞発生率および生産胚率に及ぼす影響

選別指標	供試卵子	胚盤胞数(%)	生産胚数(%)
指標2	209	136(65.1)	112(53.6)
指標2+4	163	108(66.3)	86(52.8)
指標2+4+5	75	58(77.3)	44(58.7)

第 4 節 考 察

体外受精卵において、体外受精開始から第一卵割までの時間が早い受精卵は胚盤胞発生能が高いと報告されている[24]。Sugimura ら[28]はウシ体外受精卵において第一卵割が体外受精開始から 27 時間以内に終了した受精卵が、27 時間以降に終了した受精卵よりも胚盤胞発生率が高く、染色体異常を示す細胞の割合が有意に低かったと示している。また、谷合[31]は第一卵割が体外受精開始から 27 時間以内に終了し、卵割形態が均等な 2 細胞期の受精卵の胚盤胞発生率が高かったと報告している。本研究でも同様に、胚盤胞発生率および生産胚率は体外受精開始後 27 時間目に 2 細胞期の受精卵が、1 細胞期と 3 細胞期以上の受精卵に比べ有意に高かった

($p < 0.01$)。このことから、本研究で用いた指標 1 は胚盤胞発生能の高い受精卵を選別するのに有効であることが示された。

一方、第一卵割が早い受精卵が必ずしも品質の良い受精卵ではないという報告もある[9]。ギルヌス[11]は第一卵割が遅れる場合もあり、第一卵割の新たな選別指標を体外受精開始後 27 から 55 時間の間で設ける必要があると報告している。このことから、本研究では体外受精開始から 27 時間目において卵割率が 50% 未満で、31 時間目に 50% 以上に上昇した培

養シャーレについては、31時間目の卵割形態での受精卵の選別を行なった。胚盤胞発生率は、体外受精開始から31時間目に2細胞期の受精卵が、1細胞期と3細胞期以上の受精卵に比べ有意に高かった ($p < 0.01$)。生産胚率は、2細胞期の受精卵が、1細胞期 ($p < 0.01$) と3細胞期以上の受精卵 ($p < 0.05$) に比べて有意に高かった。このことから、第一卵割が遅れる受精卵については指標2による受精卵の選別が有効である可能性が示された。しかし、第一卵割が遅れる理由については使用精液、供卵牛、培養手法など様々な要因が考えられるため、さらに詳しく検討する必要があると考えられた。

Sugimuraら[28]は、体外受精開始から 25.9 ± 1.9 時間で第一卵割が終了し、その後 9.1 ± 1.3 時間で第二卵割が終了すると報告している。谷合[31]は、卵割休止期でのフラグメントの有無を指標として用い、第一卵割時のフラグメントの有無も考慮する必要があると報告している。本研究では新たに、体外受精開始から31時間目の卵割形態によって受精卵を選別する指標を設けて2細胞期の受精卵を選別した。胚盤胞発生率および生産胚率は、2細胞期の受精卵が、1細胞期と3細胞期以上の受精卵に比べ有意に高かった ($p < 0.01$)。このことから、体外受精開始から31時間目に第二卵割が終了してお

らず、2細胞期の胚が胚盤胞発生能の高い胚であると示された。

フラグメントとは、細胞質が卵割せずに断片化したものである。フラグメントの有無やその割合は、受精卵の品質評価の基準として用いられており[3]、フラグメントの割合が高い受精卵は、フラグメントが無い受精卵に比べて胚盤胞発生率が低いことが報告されている[28, 31]。本研究でも、胚盤胞発生率は、体外受精開始から31時間目に均等な2細胞期の受精卵が、不均等な2細胞期の受精卵またはフラグメントを有する受精卵に比べて有意に高かった ($p < 0.01$)。このことから、体外受精開始から31時間目にフラグメントがなく、均等な2細胞期の受精卵を選択することで、胚盤胞発生能の高い受精卵が選別できることが示された。

ウシ体外受精卵は一般に8~16細胞期で卵割休止期に入り、この時期に8細胞期であった受精卵は、8細胞期未満であった受精卵に比べて胚盤胞発生率が高いと報告されている[12]。本研究でも、胚盤胞発生率および生産胚率は、体外受精開始後55時間目に8細胞期以上の受精卵が、8細胞期未満の受精卵に比べ有意に高かった ($p < 0.01$)。Sugimuraら[28]は卵割休止期の細胞数が4~5細胞期の受精卵は、染色体異常が認め

られる割合が高く、8～16細胞期の受精卵に比べて内細胞塊および胚盤胞の総細胞数が有意に少ないと報告している。このことから、卵割休止期では、8細胞期以上の受精卵が、8細胞期未満の受精卵に比べて胚盤胞発生能が高いことが示された。

本研究で用いた指標を組み合わせて受精卵を選別すると、体外受精開始から27および31時間目にフラグメントの無い、均等な2細胞期で、55時間目に8細胞期以上である受精卵がその他の受精卵に比べて有意に高い胚盤胞発生率を示した。また、第一卵割が遅れる受精卵については、体外受精開始から31時間目に第一卵割の形態を観察し、選別することで胚盤胞発生能の高い受精卵の選別が可能であることが示された。以上の結果から、体外受精開始から27、31および55時間目での倒立顕微鏡を用いた受精卵の観察による、胚盤胞発生能の高い良質な受精卵の選別が可能であるということが示された。

第 5 節 要 約

本研究では、倒立顕微鏡と個別管理培養ディッシュを用いた簡易なウシ体外受精卵の形態観察の有効性を明らかにするため、5つの指標で受精卵を選別し、胚盤胞発生率および生産胚率に及ぼす影響について検討した。実験には、OPU由来の未成熟卵子を用い、発生培養時に個別管理培養ディッシュを用いた。受精卵の観察は倒立顕微鏡を用い、指標1を体外受精開始後27時間目に、指標2から4を体外受精開始後31時間目に、指標5を体外受精開始後55時間目に観察して行なった。指標1:2細胞期の受精卵と1細胞期または3細胞期以上の受精卵、指標2:卵割率が50%未満で31時間目に50%以上となった培養シャーレを対象とし、2細胞期の受精卵と1細胞期または3細胞期以上の受精卵、指標3:2細胞期の受精卵と1細胞期または3細胞期以上の受精卵、指標4:2細胞期の受精卵を対象とし、均等な2細胞期の受精卵と不均等な2細胞期またはフラグメントを有する2細胞期の受精卵、指標5:8細胞期以上の受精卵と、8細胞期未満の受精卵に、それぞれ分類した。体外受精開始から27および31時間目にフラグメントの無い、均等な2細胞期で、55時間目に8細胞期以上である受精卵がその他の受精卵に比べて有意に高い胚盤胞

発生率を示した。また、第一卵割が遅れる受精卵については、体外受精開始から 31 時間目に第一卵割の形態を観察し、選別することで胚盤胞発生能の高い受精卵の選別が可能であることが示された。以上の結果から、体外受精開始から 27、31 および 55 時間目での倒立顕微鏡を用いた受精卵の観察による胚盤胞発生能の高い良質な受精卵の選別が可能であるということが示された。

第Ⅱ章 ウシ性選別精液が体外受精後の卵割開始時間に与える影響

第1節 緒言

ウシ凍結精液の性選別技術は、酪農・畜産農家において、効率的な子牛生産に貢献できる技術である。近年、性選別精液を用いた人工授精技術では、約90%の精度で選択した性の産子が得られるようになった[8]。また、過剰排卵誘起処置による受精卵生産においても性選別精液を利用することで、希望する性の受精卵を生産することが可能である[22]。しかし、性選別精液は生存精子の割合が少ないことや、精子活力が通常精液に比べて低下しているなどの問題がある[2, 22]。

性選別精液を用いた過剰排卵誘起処置による受精卵生産では、ホルスタイン種の経産牛において移植可能受精卵の回収率が低く、未経産牛での活用を推奨している[13]。一方で、経膈採卵（OPU：Ovum Pick-Up）と体外受精（IVF：*In Vitro Fertilization*）を組み合わせた OPU-IVF 技術では、未経産牛、経産牛に関係なく受精卵生産が可能である。Matobaら[20]は、OPU-IVF 技術による性選別精液を用いた効果的な受精卵

生産方法について報告している。

Sugimura ら[28]はウシ体外受精卵において、第一卵割が体外受精開始から 27 時間以内に終了した受精卵は受胎能力の高い受精卵であると報告している。一方で、ギルヌス[11]は卵割速度の遅い受精卵の胚盤胞発生能が低いとは限らず、第一卵割が遅れる原因は様々考えられると報告している。なかでも、使用する精液の種雄牛の違いは体外受精成績に大きく影響していると報告されている[15]。また、本研究の第 I 章では、第一卵割が遅れる受精卵については、体外受精開始から 31 時間目での卵割検査が、受精卵の選別に有効であることが示された。しかし、第一卵割が遅れる原因については明確にされていない。そこで、本研究ではウシ性選別精液が体外受精での卵割開始時間に与える影響について検討した。

第 2 節 材料および方法

1. 供試卵子

1) 供試卵巣

供試卵巣には、食肉処理場由来のウシ卵巣を用いた。ウシ卵巣は採取後、パウチパックに入れ、20℃のクールインキュ

ウベーターに保管し、BSE検査終了後に、それを発泡スチロールの箱に入れ実験室に持ち帰った。

2) 卵子の採取

卵巢は、卵巢間膜および脂肪を除去した後、36.0℃に保温した滅菌生理食塩水で数回洗浄し、滅菌したペーパータオルで水分および血液を除去した。未成熟卵子は、19Gの注射針を装着した5mlシリンジに3%CSを添加したD-PBSを少量吸引してシリンジ内を洗浄した後、3%CSを添加したD-PBSを約1ml吸引し、直径2~6mmの卵胞から未成熟卵子を採取した。

3) 卵子の検索

卵巢から未成熟卵子を吸引後、50ml遠沈管中で3分間未成熟卵子を沈殿させた後、卵子を含む沈殿物を残してアスピレーターで卵胞液を吸引除去した。残った沈殿物に3%CSを添加したD-PBSを加え、転倒混和した後、再び3分間未成熟卵子を沈殿させ、残りの液をアスピレーターで吸引除去した。残った沈殿物を90mmプラスチックシャーレに出した。その後、3%CSを添加したD-PBSを加えて沈殿物を希釈して、実

体顕微鏡を用いて卵子の検索を行った。回収した卵子は、10% CS を添加した D-PBS を入れた 35mm プラスチックシャーレに集めた。

4) 卵子品質

卵子の品質は、卵丘細胞が 2 層以上付着し細胞質が均一なものを Grade1、卵丘細胞が 1 層以上付着し細胞質が均一なものを Grade2、卵丘細胞がわずかしか付着しておらず、細胞質が均一または卵丘細胞が付着し細胞質が不均一なものを Grade3、卵丘細胞が付着していないものまたは卵丘細胞がほとんど付着していないものを Grade4 とした。さらに、膨化した卵丘細胞が付着したものの計 5 種類に選別した。体外成熟培養には、Grade1 および 2 の未成熟卵子を用いた。

2. 卵子の体外成熟培養

卵子の体外成熟培養には、5% CS および 0.02AU/ml FSH を添加した TCM-199 を体外成熟培養液として用いた。回収した卵子は、10% CS を添加した D-PBS を入れた 35mm プラスチックシャーレを 3 枚用意し、順に卵子を移動して洗浄した。その後、体外成熟培養液で 2 回洗浄した。

洗浄した卵子は、60mmプラスチックシャーレに作製した100 μ lの体外成熟培養液のドロップを、流動パラフィンで覆ったものに20個ずつ導入した。回収卵子数が10個以下であった場合は、50 μ lの体外成熟培養液のドロップに導入した。体外成熟培養は38.5 $^{\circ}$ C、5%CO₂、95%空気、湿度飽和の気相条件下で20時間行なった。

3. 体外受精

1) 生存精子の分離

体外受精には、ホルスタイン種雄牛2頭の性選別精液（雌精液：種雄牛A、種雄牛B）と、1頭の通常精液（種雄牛C）を用いた。凍結精液は37 $^{\circ}$ Cの温湯中に30秒間浸漬して融解した。精液の分離には、パーコール溶液および10倍濃度のBO液[4]を用い調製した90%パーコール溶液と、1倍濃度のBO液を同量ずつ混合して調製した45%パーコール溶液を用いた。調製した45%パーコール溶液を15mlのプラスチック遠沈管に3ml入れた後、融解した精液を45%パーコール溶液の上に重層した。重層した精液は、2000rpmで20分間遠心分離を行なった後、上清をアスピレーターで吸引除去し、生存精子を分離した。

2) 精子の受精能誘起法

精子の受精能誘起法は、IVF100の仕様書に従って実施した。すなわち、パーコールで選抜した精子に6mℓのIVF100を加え、1800rpmで5分間遠心分離を行い、上清をアスピレーターで吸引除去した。

3) 精子濃度調整および体外受精

洗浄した精液は、精子濃度が $10 \times 10^6/\text{m}\ell$ になるようにIVF100を加え調整し、精子浮遊液とした。

成熟卵子はIVF100で3回洗浄した後、IVF100で35mmプラスチックシャーレに50 $\mu\ell$ のドロップを作製し、流動パラフィンで覆ったものに20個ずつ導入した。成熟卵子を導入したドロップに精子浮遊液を50 $\mu\ell$ 加え、最終精子濃度を $5 \times 10^6/\text{m}\ell$ に調整し、体外成熟培養と同様の気相条件下で6時間培養を行った。

4. 体外発生培養

体外発生培養には、5%CSを添加したCR1aa[26]を体外発生培養液として用いた。接合子は、ピペッティングにより卵

丘細胞を完全に除去した後、体外発生培養液で3回洗浄した。洗浄した接合子は、個別管理培養ディッシュを用いて培養した。個別管理培養ディッシュは35mmシャーレ内の中央部(φ7mmの枠の中)に25個の微細なウェル(直径280μm、深さ160μm、底面7度のテーパ形状)がある。この上に体外発生培養液で作製した125μlのドロップを、流動パラフィンで覆ったものに接合子を25個導入した。体外発生培養は38.5℃、5%CO₂、5%O₂、90%N₂、湿度飽和の気相条件下で行なった。

媒精開始後27、31および55時間目の卵割率を調査した。また、媒精日を0日目として、7から9日目に胚盤胞発生率を調べた。

5. 統計分析

卵割率はおよび胚盤胞発生率は χ^2 検定を用いて分析した。胚盤胞の発生日齢は χ^2 検定またはフィッシャーの直接確率法を用いて分析した。

第3節 結果

表2-1に各種雄牛の卵割時間、卵割率を示した。種雄牛A

における卵割率は体外受精開始後 31 時間目が、27 時間目に比べ有意に高かった ($p < 0.01$)。また、体外受精開始後 55 時間目が、27 および 31 時間目に比べ有意に高かった ($p < 0.01$)。種雄牛 B における卵割率は体外受精開始後 31 および 55 時間目が、27 時間目に比べ有意に高かった ($p < 0.01$)。種雄牛 C における卵割率は体外受精開始後 31 および 55 時間目が、27 時間目に比べ有意に高かった ($p < 0.01$)。また、体外受精開始後 55 時間目が、31 時間目に比べ有意に高かった ($p < 0.05$)。さらに、体外受精開始後 27 時間目の卵割率は種雄牛 C が、種雄牛 A ($p < 0.01$) と種雄牛 B ($p < 0.05$) に比べ有意に高かった。

表 2-2 に種雄牛の違いが胚盤胞の発生日齢に及ぼす影響を示した。種雄牛 A における 7 日目の胚盤胞発生率は種雄牛 B と種雄牛 C に比べ有意に低かった ($p < 0.01$)。また、種雄牛 A における 8 日目の胚盤胞発生率は種雄牛 B と種雄牛 C に比べ有意に高かった ($p < 0.05$)。

表2-1. 種雄牛の違いが卵割率および胚盤胞発生率に与える影響

種雄牛	供試卵子数	卵割個数(%)		
		27 時間目	31 時間目	55 時間目
A(♀精液)	99	13(13.1) ^{a, a'}	54(54.5) ^{b'}	79(79.8) ^{c'}
B(♀精液)	96	20(20.8) ^{c, d'}	58(60.4) ^{e'}	67(69.8) ^{e'}
C(通常精液)	107	37(34.6) ^{b, d, f, h'}	70(65.4) ^{g, i'}	84(78.5) ^{g, i'}

a-b: 異符号間に有意差有り(p<0.01)

c-d: 異符号間に有意差有り(p<0.05)

a'-b'-c': 同行の異符合間に有意差あり(p<0.01)

d'-e': 同行の異符合間に有意差あり(p<0.01)

f'-g': 同行の異符合間に有意差あり(p<0.01)

h'-i': 同行の異符合間に有意差あり(p<0.05)

表2-2. 種雄牛の違いが胚盤胞の発生日齢に及ぼす影響

種雄牛	供試卵子数	胚盤胞数(%)			合計
		7日目	8日目	9日目	
A(♀精液)	99	11(11.1) ^a	18(18.2) ^c	9(9.0)	38(38.4)
B(♀精液)	96	26(27.1) ^b	6(6.3) ^d	5(5.2)	37(38.5)
C(通常精液)	107	27(25.2) ^b	7(6.5) ^d	4(3.7)	38(35.5)

a·b: 異符号間に有意差有り(p<0.01)

c·d: 異符号間に有意差有り(p<0.05)

第 4 節 考 察

本研究では、種雄牛 A、B および C のいずれも体外受精開始から 31 時間目の卵割率が 27 時間目に比べて有意に高く ($p < 0.01$)、27 時間目では卵割率が 50% 未満であったのに対し、31 時間目には 50% 以上に上昇した。Bermejo-Alvarez ら [1] は、性選別精液を用いた体外受精において、第一卵割は通常精液を用いた場合に比べて著しく遅延すると報告している。本研究では、性選別精液のみでなく、通常精液においても第一卵割が遅延した。体外受精後の卵割率および胚盤胞発生率には性選別精液の影響よりも種雄牛の違いが影響していると報告されている [15, 19]。このことから、卵割速度にも種雄牛の違いが影響していると考えられた。

しかし、体外受精開始から 27 時間目の卵割率は通常精液である種雄牛 C が、性選別精液である種雄牛 A ($p < 0.01$) と種雄牛 B ($p < 0.05$) に比べ有意に高かった。このことから、性選別精液が通常精液に比べて顕著に第一卵割が遅れるということが確認できた。これは、Bermejo-Alvarez ら [1] の報告と同様の結果であった。彼らは雌精液および雄精液の間で、性別に関する 3 つの遺伝子 (GSTM3、DNMT3A、および PGRMC1)

の発現量に差が認められ、この3つの遺伝子が第一卵割開始時間に影響している可能性がある」と報告している。また、通常精液を用いた体外受精においても、雄性受精卵は、雌性受精卵よりも速く発生することが報告されている[35]。本研究で用いた性選別精液は雌精液だったことから、第一卵割が通常精液に比べて遅れたと考えられる。本研究で種雄牛Aの胚盤胞発生日齢が遅れた理由についても同様の理由であると考えられる。

Palmaら[25]は体外受精に性選別精液を使用した場合、通常精液を使用した場合と比べて卵割率および胚盤胞発生率が低下すると報告している。この原因として、性選別精液は選別時に受ける損傷により、精子の運動性および生存時間が短いことが挙げられる[21]。しかし、性選別精液の中でも種雄牛によっては、通常精液と同等の胚盤胞発生率を得たものもあり、種雄牛の個体差も体外受精成績に大きく影響していると報告している。また、Carvalhoら[6]は、性選別精液の精子活力は通常精液と比べて低下しているが、卵割率および胚盤胞発生率は変わらないと報告している。本研究でも同様に、体外受精開始から31時間目および55時間目の卵割率と胚盤胞発生率に種雄牛間で有意な差は認められなかった。このこ

とから、性選別精液を用いた体外受精においては通常精液を用いた場合と同様に卵割率や胚盤胞発生率に種雄牛の違いが大きく影響し、なかには卵割率や胚盤胞発生率が低い個体が存在することも考えられる。そのため、種雄牛ごとの体外受精成績をあらかじめ把握できるような試験を実施していく必要があると考えられる。

ウシ体外受精において、第一卵割が体外受精開始から 27 時間以内に終了した受精卵は胚盤胞発生能が高いと報告されている [28, 31]。一方で、ギルヌス [11] は卵割速度の遅い受精卵の胚盤胞発生能が低いとは限らず、第一卵割が遅れる原因は様々考えられると報告している。本研究では性選別精液が通常精液に比べて第一卵割が遅れることが示された。また、第一卵割が遅れてもその後の受精卵発生には影響がないことが明らかになった。性選別精液は選別時に DNA の損傷を受けている可能性が高く、運動性が低く生存時間も短いなど、通常精液とは異なる特性を有している [2]。本研究では胚盤胞発生速度は種雄牛 A が、種雄牛 B と種雄牛 C に比べて遅かった。このことは、雄性受精卵は雌性受精卵よりも速く発生すること [35]、精子活力が低下していること [2, 6]、種雄牛間の個体差 [15, 19, 25] などが影響していると推測される。これらのこ

とから、卵割開始が遅れる受精卵については本研究第 I 章で示したように体外受精開始から 31 時間目にも卵割形態の観察を行う必要性が確認された。また、第一卵割が遅れる理由については種雄牛間の個体差以外にも考えられるため、今後詳細に検討する必要がある。

以上の結果より、性選別精液を用いた体外受精では通常精液を用いた場合よりも顕著に第一卵割が遅れることが示された。しかし、本研究においては体外受精開始から 31 および 55 時間目の卵割率と胚盤胞発生率に種雄牛間で差が無かったため、第一卵割が遅れる受精卵においてもその後の受精卵発生に影響がないと示された。

第 5 節 要 約

本研究ではウシ性選別精液が卵割開始時間に与える影響について検討した。実験には食肉処理場由来のウシ卵巢から採取した未成熟卵子を用いた。体外受精には、ホルスタイン種雄牛 2 頭の性選別精液（雌精液：種雄牛 A、種雄牛 B）と、1 頭の通常精液（種雄牛 C）を用いた。体外発生培養には個別管理培養ディッシュを用いた。卵割率は体外受精開始から 27、31 および 55 時間目に調べた。また、媒精日を 0 日目として、7 から 9 日目に胚盤胞発生率を調べた。

種雄牛 A、B および C のいずれも体外受精開始から 31 時間目の卵割率が 27 時間目に比べて有意に高く ($p < 0.01$)、27 時間目では卵割率が 50% 未満であったのに対し、31 時間目には 50% 以上であり、性選別精液のみでなく、通常精液においても第一卵割が遅延した。また、体外受精開始から 27 時間目の卵割率は通常精液である種雄牛 C が性選別精液である種雄牛 A ($p < 0.01$) と種雄牛 B ($p < 0.05$) に比べ有意に高かった。このことから、性選別精液が通常精液に比べて顕著に第一卵割が遅れるということが確認できた。しかし、体外受精開始から 31 時間目および 55 時間目の卵割率と胚盤胞発生率に種雄牛間で有意な差は認められなかった。

以上のことから、性選別精液を用いた体外受精では通常精液を用いた場合よりも顕著に第一卵割が遅れることが示された。しかし、本研究においては体外受精開始から 31 および 55 時間目の卵割率と胚盤胞発生率に種雄牛間で差が無かったため、第一卵割が遅れる受精卵においてもその後の受精卵発生に影響がないと示された。

第Ⅲ章 ウシ体外受精卵の卵割形態が新鮮卵移植の受胎率に 及ぼす影響

第1節 緒言

近年、経膈採卵（OPU：Ovum Pick-Up）技術と体外受精（IVF：*In Vitro Fertilization*）技術の普及から、体外受精卵の移植頭数は増加している。平成26年農林水産省生産局の調査[23]によると、受精卵移植の受胎率は体内受精卵の新鮮卵で51%、凍結卵で46%、体外受精卵の新鮮卵で41%、凍結卵で39%であり、体外受精卵は体内受精卵に比べると受胎率が低い。

ヒトの体外受精では受精卵の形態的品質よりも、発生過程の形態による受精卵の選別で受胎能力の高い受精卵の選別が可能であると報告されている[36]。谷合[31]は倒立顕微鏡と個別管理培養ディッシュを用いた簡易な形態観察で胚盤胞発生能力の高い受精卵の選別が可能であると報告している。本研究でも第Ⅰ章において、体外受精開始から27、31および55時間目での形態観察によって胚盤胞発生能の高い良質な受精卵の選別が可能であるということが示された。また、第一卵割が遅れる受精卵についても、体外受精開始から31時間目で

の形態観察を選別指標に加えることで胚盤胞発生能力の高い受精卵が選別できることが示された。

本章では第 I 章で用いた 5 つの指標を用いて選別した受精卵の受胎能力を明らかにするため、OPU-IVF により生産した体外受精卵の新鮮卵移植試験を実施した。

第 2 節 材料および方法

1. 供試牛

本章における OPU の供卵牛は、ホルスタイン種未経産牛 4 頭、および経産牛 16 頭（延べ 18 頭）、黒毛和種未経産牛 1 頭および経産牛 6 頭である。

2. 供試卵子

1) 卵子の採取

未成熟卵子は、供試牛の生体内から OPU により採取した。OPU は、超音波画像診断装置にプローブを装着し、腔内に挿入後、両卵巢の卵胞個数および黄体数を数えて記録した。その後、プローブの採卵針ガイドに採卵針を挿入し、卵胞液を吸引した。吸引にはバキュームポンプを用い、吸引圧は 120mHg に調節した。卵子の回収液には 1% の CS および 5～

10 単位/mℓ ヘパリンナトリウムを添加した乳酸リンゲル液
または修正リン酸緩衝液を用いた。OPU 終了後、回収液の入
った 50mℓ遠沈管は、発泡スチロールの容器に入れ、保温した
状態で実験室に持ち帰った。

2) 卵子の検索

持ち帰った回収液はエムコン受精卵回収用フィルターを用
いて、液が透明になるまでろ過および洗浄した。その後、回
収液を 90mm プラスチックシャーレに移し、実体顕微鏡を用
いて卵子の検索を行なった。回収した卵子は、10% CS を添加
した D-PBS を入れた 35mm プラスチックシャーレに集めた。

3) 卵子の品質評価

卵子の品質は、卵丘細胞が 2 層以上付着しているものを
Grade1、卵丘細胞が 1 層以上付着しているものを Grade2、
卵丘細胞の付着が 1 層以下または 1/3 以上付着しているもの
を Grade3、卵丘細胞が完全に剥離または付着が少ないものを
Grade4、卵丘細胞が膨化またはクモの巣状に変性しているも
のを膨化卵子、卵子の直径が小さいものを小卵子として計 6
種類に分類した。そのうち、Grade1、2、3、4 および膨化卵

子の 5 種類を培養した。

3. 卵子の体外成熟培養

卵子の体外成熟培養には、5% CS および 0.02 AU/ml FSH を添加した TCM-199 を体外成熟培養液として用いた。回収した卵子は、10% CS を添加した D-PBS を入れた 35mm プラスチックシャーレを 3 枚用意し、順に卵子を移動して洗浄した。その後、体外成熟培養液で 2 回洗浄した。

洗浄した卵子は、60mm プラスチックシャーレに作製した 100 μ l の体外成熟培養液のドロップを、流動パラフィンで覆ったものに 20 個ずつ導入した。回収卵子数が 10 個以下であった場合は、50 μ l の体外成熟培養液のドロップに導入した。体外成熟培養は 38.5 $^{\circ}$ C、5% CO₂、95% 空気、湿度飽和の気相条件下で 22 時間行なった。

4. 体外受精

1) 生存精子の分離

体外受精には 18 頭のホルスタイン種雄牛（このうち 2 頭は性選別精液）および 5 頭の黒毛和種雄牛の凍結精液を用いた。凍結精液は 37 $^{\circ}$ C の温湯中に 30 秒間浸漬して融解した。融解し

た精液は、Takahashiら[30]の方法に準じてパーコール密度均衡法により生存精子を分離した。すなわちパーコール溶液および10倍濃度のBO液[4]を用い調製した90%パーコール溶液と、1倍濃度のBO液と90%パーコール溶液を同量ずつ混合して調製した45%パーコール溶液を用いた。性選別精液を用いる際は、90%パーコール溶液と、1倍濃度のBO液と90%パーコール溶液を1:2の割合で混合して調製した60%パーコール溶液を用いた。調製した45%パーコール溶液を15mlプラスチック遠沈管に2ml入れたのち、90%パーコール溶液または60%パーコール溶液2mlを底に入れ、融解した精液を45%パーコール溶液の上に重層した。重層した精液は、2000rpmで20分間遠心分離を行なった後、上清をアスピレーターで吸引除去し、生存精子を分離した。

2) 精子の受精能誘起法

精子の受精能誘起法は、IVF100の仕様書に従って実施した。すなわち、パーコールで選抜した精子に6mlのIVF100を加え、1800rpmで5分間遠心分離を行い、上清をアスピレーターで吸引除去した。

3) 精子濃度調整および体外受精

洗浄した精液は、精子濃度が $10 \times 10^6/\text{ml}$ になるように IVF100 を加え調整し、精子浮遊液とした。

成熟卵子は IVF100 で 3 回洗浄した後、IVF100 で 35mm プラスチックシャーレに $50\mu\text{l}$ のドロップを作製し、流動パラフィンで覆ったものに 20 個ずつ導入した。成熟卵子を導入したドロップに精子浮遊液を $50\mu\text{l}$ 加え、最終精子濃度を $5 \times 10^6/\text{ml}$ に調整し、体外成熟培養と同様の気相条件下で 6 時間培養を行った。

5. 体外発生培養

体外発生培養には、5% CS を添加した CR1aa[26] を体外発生培養液として用いた。接合子は、ピペッティングにより卵丘細胞を完全に除去した後、体外発生培養液で 3 回洗浄した。洗浄した接合子は、個別管理培養ディッシュを用いて培養した。個別管理培養ディッシュは 35mm シャーレ内の中央部 (ϕ 7mm の枠の中) に 25 個の微細なウェル (直径 $280\mu\text{m}$ 、深さ $160\mu\text{m}$ 、底面 7 度のテーパ形状) がある。この上に体外発生培養液で作製した $125\mu\text{l}$ のドロップを、流動パラフィンで覆ったものに接合子を 25 個導入した。体外発生培養は 38.5°C 、

5% CO₂、5% O₂、90% N₂、湿度飽和の気相条件下で行なった。

6. 受精卵の選別指標

受精卵は5つの指標（図1）を用いて選別した。受精卵の選別は、倒立顕微鏡を用い、指標1を体外受精開始後27時間目に、指標2から4を体外受精開始後31時間目に、指標5を体外受精開始後55時間目に観察して行なった。指標1では、体外受精開始後27時間目に2細胞期の受精卵と、1細胞期または3細胞期以上の受精卵に分類した。指標2では、体外受精開始後27時間目において卵割率が50%未満で、31時間目に50%以上となった培養シャーレを対象とし、体外受精開始後31時間目に2細胞期の受精卵と、1細胞期または3細胞期以上の受精卵に分類した。指標3では、体外受精開始後31時間目に2細胞期の受精卵と、1細胞期または3細胞期以上の受精卵に分類した。指標4では、体外受精開始後31時間目に2細胞期の受精卵を対象とし、均等な2細胞期の受精卵と、不均等な2細胞期の受精卵またはフラグメントを有する2細胞期の受精卵に分類した。指標5では、体外受精開始後55時間目に8細胞期以上の受精卵と、8細胞期未満の受精卵に分類した。

7. 受精卵移植

受精卵移植は、媒精日を 0 日目として、7 日目に発生した体外受精新鮮卵を用い、黄体側子宮角に 1 卵移植した。移植頭数はホルスタイン種 57 頭、黒毛和種 25 頭の計 82 頭であった。

8. 統計分析

受胎率は、 χ^2 検定またはフィッシャーの直接確率法を用いて分析した。

第 3 節 結 果

指標別の新鮮卵移植の受胎率を表 4-1 に示した。新鮮卵移植の受胎率は、ホルスタイン種および黒毛和種において、指標 1 から 5 それぞれに有意な差は認められなかった。

指標 1、3、4、5 (1+3+4+5) の組み合わせによる新鮮卵移植の受胎率を表 4-2 に示した。新鮮卵移植の受胎率は、ホルスタイン種および黒毛和種において、1 つ以上の指標が当てはまらなかったものが、指標 1+3+4+5 に比べて低かったが有意な差は認められなかった。

指標 2+4+5 の組み合わせによる新鮮卵移植の受胎率を表 4-3 に示した。新鮮卵移植の受胎率は、ホルスタイン種および黒毛和種において、1 つ以上の指標が当てはまらなかったものが、指標 2+4+5 に比べて低かったが有意な差は認められなかった。

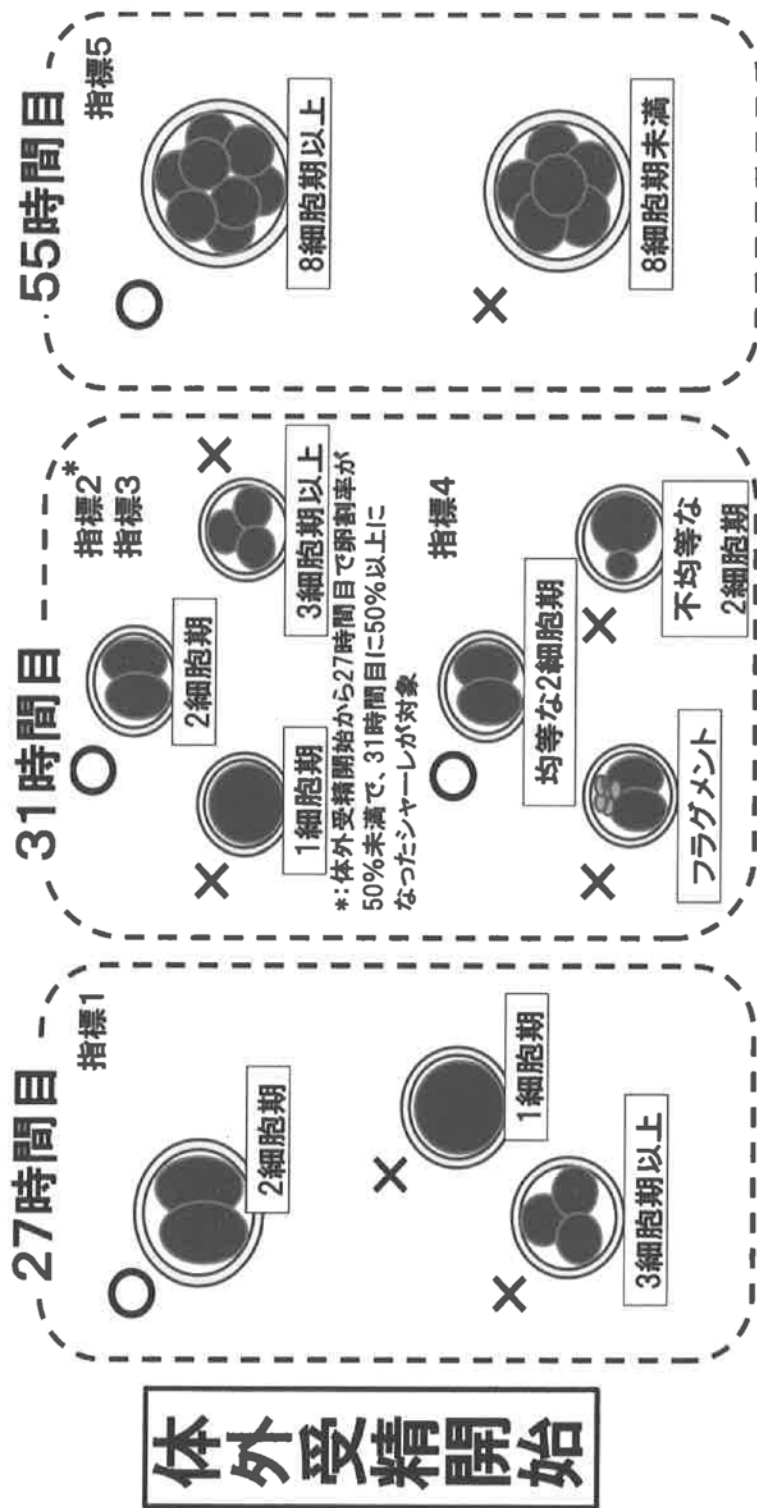


図1. 受精卵の選別指標

指標1は体外受精開始後27時間目に、指標2から4を体外受精開始後31時間目に、指標5は体外受精開始後55時間目に実施した。

指標1：体外受精開始後27時間目に2細胞期の受精卵と、1細胞期または3細胞期以上の受精卵に分類

指標2：体外受精開始後27時間目に卵割率が50%未満で、31時間目に50%以上となった培養シャーレを対象とし、体外受精開始後31時間目に2細胞期の受精卵と、1細胞期または3細胞期以上の受精卵に分類

指標3：体外受精開始後31時間目に2細胞期の受精卵と、1細胞期または3細胞期以上の受精卵に分類

指標4：体外受精開始後31時間目に2細胞期の受精卵を対象とし、均等な2細胞期の受精卵と、不均等な2細胞期の受精卵またはフラグメントを有する2細胞期の受精卵に分類

指標5：体外受精開始後55時間目に8細胞期以上の受精卵と、8細胞期未満の受精卵に分類

表4-1. 選別指標が新鮮卵移植の受胎率に与える影響

指標	移植頭数			受胎頭数(%)		
	ホルスタイン種	黒毛和種	合計	ホルスタイン種	黒毛和種	合計
指標 1	15	14	29	6(40.0)	9(64.3)	15(51.7)
指標 2	26	3	29	10(38.5)	3(100.0)	13(44.8)
指標 3	51	24	75	20(39.2)	16(66.7)	36(48.0)
指標 4	42	23	65	16(38.1)	15(65.2)	31(47.7)
指標 5	39	20	59	17(43.6)	15(75.0)	32(54.2)

表4-2. 指標の組み合わせが新鮮卵移植の受胎率に及ぼす影響

指標	移植頭数			受胎頭数(%)		
	ホルスタイン種	黒毛和種	合計	ホルスタイン種	黒毛和種	合計
指標 1	15	14	29	6(40.0)	9(64.3)	15(51.7)
指標 1+3	15	14	29	6(40.0)	9(64.3)	15(51.7)
指標 1+3+4	12	14	26	5(41.7)	9(64.3)	14(53.8)
指標 1+3+4+5	8	13	21	4(50.0)	9(69.2)	13(61.9)
1つ以上の指標が当てはまらない	21	9	30	7(33.3)	5(55.6)	12(40.0)

表4-3. 指標の組み合わせが新鮮卵移植の受胎率に及ぼす影響

指標	移植頭数		合計	受胎頭数(%)	
	ホルスタイン種	黒毛和種		ホルスタイン種	黒毛和種
指標 2	26	3	29	10(38.5)	3(100.0)
指標 2+4	22	3	25	9(40.9)	3(100.0)
指標 2+4+5	18	1	19	8(44.4)	1(100.0)
1つ以上の指標が当てはまらない	10	2	12	3(30.0)	2(100.0)
					合計
					13(44.8)
					12(48.0)
					9(47.4)
					5(41.7)

第4節 考 察

近年、ウシ受精卵生産において OPU-IVF 技術を用いた体外受精卵の生産が普及し、移植頭数も増加している。しかし、体外受精卵は体内受精卵と比べると受胎率が低いことが知られている。

平成 26 年農林水産省生産局の調査[23]によると、受精卵移植の受胎率は、体内受精卵の新鮮卵で 51%、体外受精卵の新鮮卵で 41% である。本研究では、第 I 章で用いた指標

1+3+4+5 を組み合わせて受精卵を選別し、新鮮卵移植を行ない 61.9% (13/21) の受胎率を得られた。また、1 つ以上の指標が当てはまらない受精卵を移植すると、受胎率は 40.0%

(12/30) であった。谷合[31]は倒立顕微鏡と個別管理培養ディッシュを用いた簡易な受精卵の観察が胚盤胞発生能の高い良質な受精卵の選別方法として有効であると報告しており、本研究においても同様の結果を得られた。このことから、本研究で用いた指標は体外受精卵の新鮮卵移植において受胎能力の高い良質な受精卵の選別が可能であることがと示された。

ギルヌス[11]はウシ体外受精卵において第一卵割が遅れる場合もあり、第一卵割の新たな選別指標を体外受精開始後 27 から 55 時間の間で設ける必要があると報告している。卵割開

始時間の遅れる原因については、本研究の第Ⅱ章で性選別精液および種雄牛の違いが影響していることが示され、体外受精開始後 31 時間目に第一卵割の形態観察による受精卵の選別が有効であることも示された。本研究の移植頭数は十分な頭数ではないが、第一卵割が遅れた受精卵の受胎率は、指標 2+4+5 を組み合わせたもので 47.4% (9/19) であり、指標 1+3+4+5 の組み合わせで選別した受精卵に比べて低かった。また、1 つ以上の指標が当てはまらない受精卵を移植すると受胎率は 41.7% (5/12) であり、指標 1+3+4+5 の組み合わせで選別した受精卵と比べると選別の精度は低下した。本研究では移植時の受精卵の形態的品質は示さなかったが、第一卵割が遅れた受精卵の移植時の形態的品質は、早かった受精卵と差のない品質であった。第Ⅰ章において第一卵割が遅れる受精卵については指標 2 で選別することで胚盤胞発生率は差のないことが確認され、第Ⅱ章でも同様の結果が示された。このことから、第一卵割が遅れる受精卵は早かった受精卵に比べて胚盤胞期以降の発生能力、すなわち胎子への発生能力が劣る可能性が示唆され、今後この理由について詳細な検討が必要であると考えられる。また、OPU-IVF により生産した体外受精卵を用いて子牛を生産する場合は第一卵割の早い受

精卵を選択して移植に用いるべきであると考えられた。

Sugimuraら[28]はタイムラプスシネマトグラフィー、受精卵呼吸量測定装置個および別管理培養ディッシュを用いて5つの指標を組み合わせ、選別した受精卵を移植することで78.9%と高い受胎率を得られたと報告している。また、個別管理培養ディッシュを用いて生産したウシ体外受精卵は、マイクロドロップ法で生産した受精卵よりも体内受精卵に近く、受胎率も向上することが報告されている[28-29]。本研究ではタイムラプスシネマトグラフィーおよび受精卵呼吸量測定装置を用いずに、倒立顕微鏡と個別管理培養ディッシュを用い、体外受精開始から27、31および55時間目に卵割形態の観察を行い5つの指標により受精卵を選別した。この簡易な受精卵の選別で、新鮮卵移植において61.9%の受胎率を得ることができた。さらに、指標に当てはまらない受精卵の受胎率が低いことも確認され、受胎能力の低い受精卵の選別が可能であることが示された。

以上の結果から、OPU-IVFにより生産した受精卵の選別は形態的品質よりも、発生過程の形態観察によって選別することで受胎能力の高い受精卵を選択することができることが示された。また、体外受精開始から27、31および55時間目に

おける卵割形態の観察による簡易な受精卵の選別は体外受精
卵の受胎率向上に繋がることが示された。

第 5 節 要 約

本研究では、倒立顕微鏡と個別管理培養ディッシュを用いた簡易な受精卵の形態観察の有効性を明らかにするため、5つの指標で受精卵を選別し、新鮮卵移植での受胎率を検討した。実験には OPU 由来の未成熟卵子を用い、発生培養時に個別管理培養ディッシュを用いた。受精卵の選別は倒立顕微鏡を用い、指標 1 を体外受精開始後 27 時間目に、指標 2 から 4 を体外受精開始後 31 時間目に、指標 5 を体外受精開始後 55 時間目に行なった。指標 1: 2 細胞期の受精卵と 1 細胞期または 3 細胞期以上の受精卵、指標 2: 卵割率が 50% 未満で 31 時間目に 50% 以上となった培養シャーレを対象とし、2 細胞期の受精卵と 1 細胞期または 3 細胞期以上の受精卵、指標 3: 2 細胞期の受精卵と 1 細胞期または 3 細胞期以上の受精卵、指標 4: 2 細胞期の受精卵を対象とし、均等な 2 細胞期の受精卵と不均等な 2 細胞期またはフラグメントを有する 2 細胞期の受精卵、指標 5: 8 細胞期以上の受精卵と、8 細胞期未満の受精卵に、それぞれ分類した。指標 1+3+4+5 で選別した新鮮卵移植の受胎率は、61.9% (13/21) であった。しかし、指標 2+4+5 で選別した新鮮卵移植の受胎率は、47.4% (9/19) で、指標 1+3+4+5 で選別した受精卵に比べ選別の精度が低下した。

このことから、OPU-IVFにより生産した体外受精卵を用いて子牛を生産する場合は第一卵割の早い受精卵を選択して移植に用いるべきであると考えられた。さらに、OPU-IVFにより生産した受精卵の選別は形態的品質よりも、発生過程の形態観察によって選別することで受胎能力の高い受精卵を選択することができることと示された。

第IV章 総括

近年、ウシ受精卵移植において OPU-IVF 技術の普及により、体外受精卵の移植頭数が増加している。しかし、体外受精卵は体内受精卵に比べると受胎率が低いことが知られている。ヒトの体外受精卵では胚盤胞期の形態的品質評価よりも発生過程での形態観察による選別で、受胎能力の高い受精卵の選別が行なわれている。ウシ体外受精卵においても移植に用いる受精卵を選別する際には胚盤胞期の形態的品質評価のみでなく、発生過程の形態観察を行い受精卵の選別をする必要があると考えられる。そこで、本研究では倒立顕微鏡と個別管理培養ディッシュを用い、体外受精開始から 27、31 および 55 時間目に卵割形態の観察を行い、5 つの指標を用いて、胚盤胞発生能力および受胎能力の高い受精卵の選別の有効性について検討した。

ウシ体外受精卵の卵割形態が受精卵の発生に及ぼす影響

本研究では倒立顕微鏡と個別管理培養ディッシュを用いた簡易な受精卵の形態観察の有効性を明らかにするため、5 つの指標で受精卵を選別し、胚盤胞発生率および生産胚率に及

ぼす影響について検討した。実験には OPU 由来の未成熟卵子を用い、発生培養時に個別管理培養ディッシュを用いた。受精卵の選別は倒立顕微鏡を用い、指標 1 を体外受精開始後 27 時間目に、指標 2 から 4 を体外受精開始後 31 時間目に、指標 5 を体外受精開始後 55 時間目に観察して行なった。指標 1: 2 細胞期の受精卵と 1 細胞期または 3 細胞期以上の受精卵、指標 2: 卵割率が 50% 未満で 31 時間目に 50% 以上となった培養シャーレを対象とし、2 細胞期の受精卵と 1 細胞期または 3 細胞期以上の受精卵、指標 3: 2 細胞期の受精卵と 1 細胞期または 3 細胞期以上の受精卵、指標 4: 2 細胞期の受精卵を対象とし、均等な 2 細胞期の受精卵と不均等な 2 細胞期またはフラグメントを有する 2 細胞期の受精卵、指標 5: 8 細胞期以上の受精卵と、8 細胞期未満の受精卵に、それぞれ分類した。体外受精開始から 27 および 31 時間目にフラグメントの無い、均等な 2 細胞期で、55 時間目に 8 細胞期以上である受精卵がその他の受精卵に比べて有意に高い胚盤胞発生率を示した。また、第一卵割が遅れる受精卵については、体外受精開始から 31 時間目に第一卵割の形態を観察し、選別することで胚盤胞発生能の高い受精卵の選別が可能であることが示された。以上の結果から、体外受精開始から 27、31 および 55 時間目

での倒立顕微鏡を用いた受精卵の観察による、胚盤胞発生能の高い良質な受精卵の選別が可能であるということが示された。

ウシ性選別精液が体外受精後の卵割開始時間に与える影響

本研究ではウシ性選別精液が卵割開始時間に与える影響について検討した。実験には食肉処理場由来のウシ卵巢から採取した未成熟卵子を用いた。体外受精にはホルスタイン種雄牛 2 頭の性選別精液（雌精液：種雄牛 A、種雄牛 B）と、1 頭の通常精液（種雄牛 C）を用いた。体外発生培養には個別管理培養ディッシュを用いた。卵割率は体外受精開始から 27、31 および 55 時間目に調べた。また、媒精日を 0 日目として、7 から 9 日目に胚盤胞発生率を調べた。

種雄牛 A、B および C のいずれも体外受精開始から 31 時間目の卵割率が 27 時間目に比べて有意に高く ($p < 0.01$)、27 時間目では卵割率が 50% 未満であったのに対し、31 時間目には 50% 以上であり、性選別精液のみでなく、通常精液においても第一卵割が遅延した。また、体外受精開始から 27 時間目の卵割率は通常精液である種雄牛 C が、性選別精液である種雄

牛 A ($p < 0.01$) と種雄牛 B ($p < 0.05$) に比べ有意に高かった。このことから、性選別精液が通常精液に比べて顕著に第一卵割が遅れるということが確認できた。しかし、体外受精開始から 31 時間目および 55 時間目の卵割率と胚盤胞発生率に種雄牛間で有意な差は認められなかった。

以上のことから、性選別精液を用いた体外受精では、通常精液を用いた場合よりも顕著に第一卵割が遅れることが示された。しかし、本研究においては、体外受精開始から 31 および 55 時間目の卵割率と胚盤胞発生率に種雄牛間で差が無かったため、第一卵割が遅れる受精卵においてもその後の胚発生に影響がないと示された。

ウシ体外受精卵の卵割形態が新鮮卵移植の受胎率に及ぼす影響

本研究では倒立顕微鏡と個別管理培養ディッシュを用いた簡易な受精卵の形態観察の有効性を明らかにするため、5 つの指標で受精卵を選別し、新鮮卵移植での受胎率を検討した。実験には OPU 由来の未成熟卵子を用い、発生培養時に個別管理培養ディッシュを用いた。受精卵の選別は倒立顕微鏡を用

い、指標 1 を体外受精開始後 27 時間目に、指標 2 から 4 を体外受精開始後 31 時間目に、指標 5 を体外受精開始後 55 時間目に行なった。指標 1：2 細胞期の受精卵と 1 細胞期または 3 細胞期以上の受精卵、指標 2：卵割率が 50% 未満で 31 時間目に 50% 以上となった培養シャーレを対象とし、2 細胞期の受精卵と 1 細胞期または 3 細胞期以上の受精卵、指標 3：2 細胞期の受精卵と 1 細胞期または 3 細胞期以上の受精卵、指標 4：2 細胞期の受精卵を対象とし、均等な 2 細胞期の受精卵と不均等な 2 細胞期またはフラグメントを有する 2 細胞期の受精卵、指標 5：8 細胞期以上の受精卵と、8 細胞期未満の受精卵に、それぞれ分類した。指標 1+3+4+5 で選別した新鮮卵移植の受胎率は、61.9% (13/21) であった。しかし、指標 2+4+5 で選別した新鮮卵移植の受胎率は、47.4% (9/19) で、指標 1+3+4+5 で選別した受精卵に比べ選別の精度が低下した。このことから、OPU-IVF により生産した体外受精卵を用いて子牛を生産する場合は第一卵割の早い受精卵を選択して移植に用いるべきであると考えられた。さらに、OPU-IVF により生産した受精卵の選別は形態的品質よりも、発生過程の形態観察によって選別することで受胎能力の高い受精卵を選択することができると示された。

以上のことから、倒立顕微鏡と個別管理培養ディッシュを用いた5つの指標は、胚盤胞発生能および受胎能力の高い受精卵の選別に有効であることが示された。また、本研究において性選別精液を用いた体外受精では、通常精液を用いた場合よりも顕著に第一卵割が遅れることが示された。しかし、第一卵割の遅れは、その後の卵割率と胚盤胞発生率には影響しなかったが、受胎率には影響すると推測された。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導頂きました酪農学園大学大学院酪農学研究科家畜繁殖学 堂地 修教授、動物生殖工学 今井 敬教授、循環農学類 家畜育種学 寺脇良悟教授、獣医学類 森好政晴 准教授、家畜改良学 高橋 茂教授、に心より感謝申し上げます。また、ウシ卵巣の提供にご協力頂きました北海道畜産公社道央事業所早来工場、北海道早来食肉衛生検査所の方々に心より感謝申し上げます。さらに、OPUにご協力頂きました牧場の皆様ならびに酪農学園大学フィールド教育研究センター肉畜生産ステーション元野幌肉牛農場および酪農生産ステーションの職員の方々に心より感謝申し上げます。最後に、本研究にご協力頂きました家畜繁殖学研究室、動物生殖工学研究室、家畜改良学研究室ならびに獣医動物生殖学ユニットのゼミ生各位に心より感謝致します。

引用文献

- 1) Bermejo-Alvarez, P. et al., Developmental kinetics and gene expression in male and female bovine embryos produced in vitro with sex-sorted spermatozoa. *Reprod. fertil. Dev.*, 22(2), 2010. 426-436.
- 2) Blondin, P. et al., Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. *Theriogenology*, 71(1), 2009. 30-38.
- 3) Bolton, V.N. et al., Development of spare human preimplantation embryos in vitro: An analysis of the correlations among gross morphology, cleavage rates, and development to the blastocyst. *J. In Vitro Fert Embryo Transf.*, 6(1), 1989. 30-35.
- 4) Brackett, B.G. et al., Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol. Reprod.*, 27(1), 1982. 147-158.
- 5) Brackett, B.G. & Oliphant, G., Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.*, 12(2), 1975. 260-274.
- 6) Carvalho, J.O. et al., Quality assessment of bovine

- cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in in vitro embryo production. *Theriogenology*, 74(9), 2010. 1521–1530.
- 7)CHANG, M.C., Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*, 168(4277), 1951. 697–698.
- 8)DeJarnette, J.M. et al., Effect of Sex-Sorted Sperm Dosage on Conception Rates in Holstein Heifers and Lactating Cows. *J. Dairy Sci.*, 91(5), 2008. 1778–1785.
- 9)Emiliani, S. et al., Impact of the assessment of early cleavage in a single embryo transfer policy. *Reprod. BioMed Online.*, 13(2), 2006. 255–260.
- 10)Fenwick, J. et al., Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro. *Hum Reprod.*, 17(2), 2002. 407–412.
- 11)ギルヌスジャスミン, 個別培養ディッシュを用いた 実用的なウシ体外受精卵の選別指標の検討. 酪農学園大学 2014.
- 12)Grisart, B., Massip, A. & Dessy, F., Cinematographic

- analysis of bovine embryo development in serum-free oviduct-conditioned medium. *J Reprod Fertil.*, 101(2), 1994. 257–264.
- 13) Hayakawa, H. et al., Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm. *Theriogenology*, 71(1), 2009. 68–73.
- 14) Heape, W., Preliminary Note on the Transplantation and Growth of Mammalian Ova within a Uterine Foster-Mother. *Proc. R. Soc. Lond.*, 48, 1890. 457–458.
- 15) Inaba, Y. et al., Sex-sorting of spermatozoa affects developmental competence of in vitro fertilized oocytes in a bull-dependent manner. *J. Reprod Dev.*, 62(5), 2016. 451–456.
- 16) International Embryo Transfer Society, 2012
STATISTICS OF EMBRYO COLLECTION AND
TRANSFER IN DOMESTIC FARM ANIMALS. 2012.
- 17) International Embryo Transfer Society, 2013
STATISTICS OF EMBRYO COLLECTION AND
TRANSFER IN DOMESTIC FARM ANIMALS. 2013.
- 18) Kruip, T.A.M. & den Daas, J.H.G., In vitro produced

- and cloned embryos: Effects on pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology*, 47(1), 1997. 43–52.
- 19) Liu, X. et al., Comparison of the developmental competence and quality of bovine embryos obtained by in vitro fertilization with sex-sorted and unsorted semen from seven bulls. *Livestock Sci.*, 181. 2015. 263–270.
- 20) Matoba, S. et al., Optimizing production of in vivo-matured oocytes from superstimulated Holstein cows for in vitro production of embryos using X-sorted sperm. *J. Dairy Sci.*, 97(2), 2014. 743–753.
- 21) Maxwell, W.M. et al., Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. *Anim Reprod Sci.*, 82-83, 2004. 79–95.
- 22) Mikkola, M. & Taponen, J., Quality and developmental rate of embryos produced with sex-sorted and conventional semen from superovulated dairy cattle. *Theriogenology*. 87, 2017. 135-140.
- 23) 農林水産省. 牛受精卵移植実施状況. 2014. 農林水産省生産局ホームページ ;

http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l_katiku/pdf/h26_gaiyou.pdf

- 24) 沖津 撰, 良好胚の選択. *J Mamm. Ova Res.*, 25(2), 2008. 90-97.
- 25) Palma, G.A. et al., Effects of Sex-sorted Spermatozoa on the Efficiency of in vitro Fertilization and Ultrastructure of in vitro Produced Bovine Blastocysts. *Anat. Histol. Embryol.* 37. 2007. 67-73
- 26) Rosenkrans, C.F. et al., Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. *Biol. Reprod.*, 49(3), 1993. 459-462.
- 27) Steptoe, P.C. & Edwards, R.G., Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet.* 12;2(8085), 1978. 366.
- 28) Sugimura, S. et al., Promising System for Selecting Healthy In Vitro-Fertilized Embryos in Cattle *PLoS ONE*, 7(5), 2012. e36627.
- 29) Sugimura, S. et al., Time-Lapse Cinematography-Compatible Polystyrene-Based Microwell Culture System: A Novel Tool for Tracking

- the Development of Individual Bovine Embryos. *Biol. Reprod.*, 83(6), 2010. 970–978.
- 30) TAKAHASHI, Y. et al., Development of In Vitro Matured/Fertilized Bovine Embryos in a Chemically Defined Medium: Influence of Oxygen Concentration in the Gas Atmosphere. *J. Vet. Med. Sci.*, 58(9), 1996. 897–902.
- 31) 谷合 萌, 個別培養ディッシュを用いた ウシ体外受精胚の選別方法の検討. 酪農学園大学. 2013.
- 32) WHITTINGHAM, D.G., Survival of Mouse Embryos after Freezing and Thawing. *Nature*, 233(5315), 1971. 125–126.
- 33) WILLETT, E.L. et al., Successful Transplantation of a Fertilized Bovine Ovum. *Science*, 113(2931). 1951. 247.
- 34) Wilmut, I. & Rowson, L.E., Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *The Vet Rec.*, 92(26), 1973. 686–690.
- 35) Xu, K.P. et al., Sex-related differences in developmental rates of bovine embryos produced and cultured in vitro. *Mol. Reprod. Dev.*, 31(4), 1992.

249-252.

36) Ziebe, S. et al., Embryo morphology or cleavage stage:

how to select the best embryos for transfer after

in-vitro fertilization. *Hum Reprod.*, 12(7), 1997.

1545-1549.

Summary

In recent years, the number of *in vitro* fertilization (IVF) embryo transfers has increased worldwide. However, the conception rate for IVF embryos is lower than that for *in vivo*-derived embryos. This study was conducted to determine the efficacy of five factors to predict high developmental competence and conception rate for embryos.

Effect of a kinetics-based selection system on high developmental competence of bovine OPU-IVF embryos.

This study aimed to determine the efficacy of five predicting factors for selecting embryos with a strong ability to develop into blastocysts. Cumulus oocyte complexes (COCs) were collected by ovum pick-up (OPU). The collected COCs were cultured for 22 h. Capacitated sperm (at a final concentration of 5×10^6 spermatozoa/ml) were incubated with the COCs for 6 h. The presumptive zygotes were cultured for 9 days in CR1aa supplemented with 5% CS in a

micro-well culture dish (Dai Nippon Printing, Tokyo, Japan). The kinetics of embryo development was observed at 27, 31, and 55 h post insemination (hpi) by stereomicroscopy. The number of blastocysts (BL) and produced embryos (PE: transferable embryos) was measured at 7, 8, and 9 days post-IVF. The five factors used to select embryos were as follows: (1) The zygotes were divided 3 groups (2cell, 3cell or more and no cleavage) at 27 hpi; (2) In case cleavage rate was less than 50% at 27 hpi and more than 50% at 31 hpi in each culture dish, divided 3 groups (2cell, 3cell or more and no cleavage) at 31 hpi; (3) The zygotes were divided 3 groups (2cell, 3cell or more and no cleavage) at 31 hpi; (4) The embryos at the 2cell stage at 31 hpi were divided into 2 groups: 2cell with normal cleavage and 2cell with abnormal cleavage (unequal cleavage, 2 cells with fragments); (5) The embryos were divided 2 groups (8cell or more and less than 8cell) at 55 hpi. The results showed that embryos with high development competence had 2 cells with normal cleavage at 27 and 31 hpi and 8 cells or more at 55 hpi. In addition,

observation at 31 hpi was effective for selecting embryos with high development competence in the case of embryos with slow first cleavage.

*Effect of sex-sorted sperm on the timing of first cleavage
in bovine IVF embryos*

This study examined the effect of the sex-sorted of sperms on the timing of the first cleavage. COCs were collected from bovine ovaries from a local slaughterhouse. We performed IVF using sex-sorted sperms from 2 Holstein bulls (female sperm: bull A, bull B) and non-sorted sperms from another Holstein bull (bull C). The presumptive zygotes were cultured for 9 days in a micro-well culture dish. The cleavage rate was analyzed at 27, 31, and 55 hpi. The blastocyst rate was analyzed at 7, 8, and 9 days post-IVF. The cleavage rate of embryos from bull A, B, and C at 31 hpi was significantly ($P < 0.01$) higher than that at 27 hpi. In addition, the cleavage rate at 27 hpi was less than 50%, but at 31 hpi, it was more than 50%, which

indicated a delay in first cleavage for embryos from not only sex-sorted sperms, but also from non-sorted sperms. Further, the cleavage rate at 27 hpi of bull C was significantly higher than that of bull A ($P < 0.01$) and bull B ($P < 0.05$). Thus, this study confirmed that the timing of first cleavage in embryos from sex-sorted sperms was significantly later than that of embryos from non-sorted sperms. However, the cleavage rates at 31 and 55 hpi and the BL rates of bulls A, B, and C were not significantly different. These results demonstrated that late first cleavage did not affect the development of the blastocyst.

Impact of a kinetics-based selection system on conception rate of fresh embryo transfer from bovine OPU-IVF

This study aimed to determine the efficacy of five factors for selecting embryos with high conception rate from fresh embryo transfer. Bovine COCs were collected by OPU and cultured for 22 h. The presumptive zygotes were cultured for 9 days in a micro-well culture dish. The kinetics of

embryo development was observed at 27, 31, and 55 hpi by stereomicroscopy. The factors used to select the embryos were the same as the ones used in the previous experiment. The conception rate of fresh embryo transfer selected using factors 1+3+4+5 was 61.9% (13/21), while that selected using factors 2+4+5 was 47.4% (9/19). Thus, embryos with early first cleavage should be selected when OPU-IVF is used. These results demonstrated the applicability and efficiency of the five factors for selecting embryos with high competence for conception.

In conclusion, these results demonstrated the applicability and efficiency of the five factors for selecting highly competent embryos, verified using stereomicroscopy and a micro-well culture dish. In addition, this study confirmed that the timing of first cleavage of sex-sorted sperm was significantly slower than that of non-sorted sperm. Although the slow first cleavage did not affect the cleavage and BL rates, the conception rate was affected.