

生体吸引卵子による初期胚作出技術の確立（第2報）

菅原 徹^{※1}・渡辺晃行・戸塚 豊・戸谷孝治^{※2}

要 約

生体吸引卵子による初期胚作出技術の確立するために、体外受精後の発生培養培地について、と畜場由来の卵巣から吸引した卵子を用いて、TCM199とRPMI1640の2つの培地を比較検討した。胚盤胞までの発生率では、TCM199とRPMI1640はそれぞれ36.9%、31.7%で差はなかった。一方培地の調整など操作の面では、TCM199の方が簡便であり、操作による汚染が少ない。したがって発生培養培地としてはTCM199の方が適していると考えられた。

キーワード：体外受精，生体吸引卵子

緒 言

ウシの胚移植技術は乳用牛や肉用牛の育種改良に利用されており、農家段階にも普及してきているが、さらに普及定着化するためには、移植に使う胚の効率的な生産技術の確立と低コスト化が求められている。その1つの方法として体外受精による胚生産技術が開発された。しかしながらこの方法ではと畜場の雌牛卵巣を使用しているため、母牛の血統が特定できず生産された子牛の登録が出来ないという問題があった。

そのため生体の卵巣から直接卵子を吸引し、体外受精によって胚を生産する技術(生体吸引卵子，OPU)が考案された。この方法で吸引した卵子は卵子提供牛(母牛)が特定できるので、体外受精によって血統登録が可能な胚を生産できる。

またこの方法が確立できればホルモン処理の必要がなく、しかも同一牛からの卵子の連続採取も可能であることから、胚生産の効率化、低コスト化がはかれる。

そこで本試験では生体吸引卵子による初期胚作出技術を確立し、胚移植技術をさらに普及定着化を図る。

今年度はと畜場由来の卵巣から吸引した卵子を用いて、体外受精後の発生培養培地について検討した。

材料及び方法

1. 材料

卵巣はと畜場より採取した品種不明の雌牛113頭から採取された226個の卵巣を使用した。体外受精には黒毛和種の凍結精液を使用した。

2. 方法

1) 卵子の吸引

卵子は、卵巣の表面に存在する直径5mm以下の卵胞から吸引した。吸引には長さ38mm直径1.2mmの注射針を使用し、吸引器(280mmHg)または注射器を用いて、卵子回収液OCM(機能性ペプチド研究所)を入れた容器に回収した。

2) 卵子の培養

卵子回収液OCM中に回収した卵子を、牛胎児血清(FSC, SEBAK)を10%添加したTCM199(GIBCO)およびRPMI1640(GIBCO)に2回洗浄後投入し、38.5℃、5%CO₂、95%airの条件で20-22時間成熟培養した。

3) 体外受精

媒精液にIVF100(機能性ペプチド研究所)を使用し、黒毛和種精液で6時間培養した。

4) 受精胚の発生培養

体外受精処理後、卵子を2種類の発生培養液に移して、38.5℃、5%CO₂、95%airの条件下で培養した。

※1 現 茨城県農林水産部畜産課

※2 現 茨城県農業総合センター農業大学校

使用した発生培養液は、10%牛胎児血清を添加したTCM199と、10%牛胎児血清と100 μ molの β メルカプトエタノールを添加したRPMI1640である。

受精の確認は、培養開始後の発生の有無で行った。さらに培養開始後192時間までに、胚盤胞に発育した胚を正常発育胚とした。

結果および考察

卵巣からの卵子の採取状況を表1に示した。

226個の卵巣から1,540個(1卵巣あたり6.8個)の卵子が採取できた。このうちAランク胚は1,328個(1卵巣あたり5.9個)で、回収した卵子の86.2%であった。

表1 吸引卵子数

卵巣数 (頭数)	吸引 卵子数	1卵巣 あたり	Aランク 卵子数	1卵巣 あたり
個(頭)	個	個	個	個
226(113)	1540	6.8	1328	5.9

このAランク胚を用いて、体外受精後の発生培養に用いる培養液の検討を行った。培養液別の胚の発生成績を表2に示した。

受精率では培養液間に差は認められなかった。また前報¹⁾における黒毛和種精液の受精率(79.1%)とほぼ同じであった。

胚盤胞までの発生率は、TCM199の方がRPMI1640より若干高かったが、有意差は認められなかった。しかし前報¹⁾で報告したCR1aaを培養液に用いた場合の胚盤胞までの発生率(24.9~31.5%)に比べ、高い傾向がみられた。

表2 発生培養液別の胚の発生成績

培養液	Aランク 卵子数	受精数(率)	胚盤胞数 (率)
	個	個(率)	個(率)
TCM199	1062	849(79.9)	313(36.9)
RPMI1640	266	208(78.2)	66(31.7)

一方、培地の調整など操作の面では、TCM199の方が簡便であり、操作による汚染が少ないため、発生培養用の培地としてはTCM199の方が適していると考えられた。以上のことから、本センターでは体外受精卵の培養液として、10%牛胎児血清を添加したTCM199を用いることとした。

茨城県内の酪農家は牛群改良の手段として高能力牛からの過剰排卵処理による胚採取や、海外からの輸入受精卵の移植を行っているところが多い。しかし牛によっては過剰排卵処理に使用するホルモン剤に対する感受性が低い個体や、ホルモン処理によるものと思われる繁殖障害を起こす個体がいる。そのため期待したほどの受精卵数が採取できないとか、同一個体からの連続採卵ができなくなる、また大事な雌牛が繁殖障害になる危険性があるなどの問題点がある。このためこれらの問題点を解決し、県内の牛の改良増殖に貢献できる新たな手段として、生体から卵子を吸引し、体外受精によって移植可能な胚を生産する技術を確立することは、たいへん有効であると思われる。

今後はこれまでの成果をもとに、黒毛和種の供卵牛(生体)の卵巣から卵子を吸引採取し、体外受精後効率的に胚盤胞まで発生させるために、供卵牛の選定と採卵時の卵子吸引条件について検討する。また体外受精胚の発生条件についても引き続き検討を行う。

謝 辞

本試験をおこなうにあたり、卵巣材料提供に御協力いただいた茨城県中央食肉公社ならびに茨城県県北食肉衛生検査所職員諸氏に深謝します。

引用文献

- 1) 菅原 徹・太田士美・宇田三男。生体吸引卵子による初期胚作出技術の確立(第1報)。茨城県畜産試験場研究報告, 30, 53-54, 2000。