

## 生体吸引卵子による初期胚作出技術の確立（第5報）

渡辺晃行・根本聡実・山口大輔・足立憲隆

Cattle inVitro Embryo Production Using Oocytes collected by ovum pick-up

Satomi NEMOTO, Akiyuki WATANABE, Daisuke YAMAGUCHI, Noritaka ADACHI.

### 要 約

当センター繁殖の黒毛和種およびホルスタイン種雌牛を用いて、生体卵子吸引を行った。生体卵子吸引は、延べ65頭実施し、643個（1頭平均9.9個）の卵子を吸引した。そのうち正常卵子は451個（正常卵率70.1%）であった。吸引した正常卵子のうち374個をIVFに使用したところ、65個（17.4%）が胚盤胞まで発生し、これらのうち17個を17頭に移植した結果、5頭が受胎した（受胎率29.4%）。また、採卵成績の悪い供卵牛6頭から週1回連続でOPUを行なった結果、連続13週間卵子を回収でき胚を生産することが出来た。

キーワード：体外受精，生体吸引卵子，IVD101、連続OPU

### 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（生体卵子吸引、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、低コスト化が図られる。

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、胚移植技術のさらなる普及定着化を図る。

今年度は、採取した卵子を体外受精し、胚盤胞にまで発生した胚を受胎牛に移植した。

### 材料および方法

#### 1. 材料

供試牛は、当センター繁殖の黒毛和種およびホルスタイン種雌牛を用いた。体外受精には黒毛和種およびホルスタイン種の凍結精液を使用した。

#### 2. 方法

##### 1) 生体卵子吸引

卵子吸引には超音波診断装置（アロカ SSD-900SE）に、採卵針ガイドを装着した同機専用の経膈プローブ（7.5MHz）を接続したものを、および採卵針（ミサワ医科工業製 ディスポーザブル採卵針）に吸引ポンプ（富士平工業製）を接続したものをを用いた。吸引圧は100mmHgに設定した。

供試牛を保定し、尾椎硬膜外麻酔を行い、外陰部を洗浄消毒後、膈内に採卵針ガイドを装着したプローブを挿入し、直腸内に挿入した手で卵巣をプローブの先端付近に誘導し、超音波診断装置の画面に卵巣を映し出した。

直径2mm以上の卵胞数を確認し、採卵針をガイドに装入し画像上で確認できるすべての卵胞液を吸引するように努めた。

還流液は10IU/mlのノボヘパリンを添加した1%非働化牛胎児血清（FBS, SIGMA）加修正ダル

ベッコ PBS (D-PBS) を使用した。

チューブ内での血液の凝固を防止するために約3分間ごとに還流液で採卵針およびチューブ内の洗浄を行なった。

回収液を Emcon フィルターに通した後、卵子を検索し、卵丘細胞が十分に付着した卵丘卵子複合体を正常卵子とし、体外受精に用いた。

連続採卵では週一回の間隔で8週間、12週間および13週間連続で行なった。

## 2) 未成熟卵子の培養

回収した卵子を、FBS を 10% 添加した TCM199 (GIBCO) 中で3回洗浄後培養器に移し、38.5℃、5%CO<sub>2</sub>、95%空気の気相条件で22-24時間成熟培養した。

## 3) 体外受精

凍結精液を37℃の温水中で融解後、保温しておいた媒精液 (IVF100, 機能性ペプチド研究所) 中に懸濁し、2000回転、5分遠心を2回行い、精子の洗浄を行った。精子の最終濃度を  $1.0 \times 10^7$  個/ml に調整し、38.5℃、5%CO<sub>2</sub>、95%空気の気相条件で6時間体外受精培養を行った。

## 4) 受精胚の発生培養

体外受精処理後、0.1%ヒアルロニダーゼ中でピペティングにより卵子を裸化し、発生培養液 (I VD101, 機能性ペプチド研究所) 50 $\mu$ l のドロップに移し、38.5℃、5%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>の気相条件下で培養した。

媒精日を Day0 として、Day8 までに胚盤胞に発育した胚を正常発育胚とした。

## 5) 正常発育胚の移植

正常発育胚を発情後7~8日目の受胎牛へ移植した。

## 結果および考察

生体卵子吸引の結果を表1に示した。延べ65頭実施し、643個の卵子を吸引した。1頭あたり平均は9.9個で、前報<sup>1)</sup>で報告した1頭平均7.0個に比べ技術の向上がみられた。吸引卵子のうち正常卵子は451個で正常卵率は70.1%であった。前報<sup>1)</sup>で報告した正常卵率85.7%より若干低下しているがこれは、卵子吸引の技術が向上した結果、より多くの卵子を吸引することが可能になった反面体外受精に適さない卵子も多く回収する結果になったためと思われる。

正常卵子のうち374個を体外受精に供したところ、65個が胚盤胞まで発生した (胚盤胞率17.4%)。このうち17頭に移植した結果5頭が受胎した (表2)。

表1 生体卵巣からの卵子吸引成績

頭数	吸引 卵子数	1頭 あたり	正常 卵子数	正常 卵率
頭	個	個	個	%
65	643	9.9	451	70.1

表2 生体吸引卵子を用いた体外受精  
および移植成績

体外受精 供試卵数	胚盤胞数 (率)	移植 頭数	受胎数 (率)
個	個 (%)	頭	頭 (%)
374	65 (17.4)	17	5 (29.4)

採卵成績の悪かった6頭について連続してOPUを行なった。OPU前の採卵成績では6頭全て正常卵を採取することが出来なかった。これら6頭について、週1回の間隔で連続OPUを実施した。成績は表3に示した。連続OPUの実施期間に差はあるもののそれぞれ毎回正常卵を採取することが出来た。1回あたりの平均卵子回収個数では5.7個から16.3個と個体によりばらつきが見られた。正常卵率では65.1%から76.4%と70%前後の割合だった。移植が可能な胚である胚盤胞まで成長した胚は連続OPUの合計で3個から31個と牛によりかなりばらつきがみられた。

これらの成績から、採卵成績の悪い供卵牛でも、OPUを利用して胚を生産することが可能であることが示唆された。さらに採卵と組み合わせ、より効率的に胚を生産することも可能であると思われる。

今後はさらに生体の卵巣から卵子を吸引採取する頭数を増やし、回収卵子数の向上などさらなる技術の向上を図るとともに農家への普及に向けての技術開発を行なっていく必要がある。

## 引用文献

1) 渡辺ら (2003). 生体吸引卵子による初期胚作出技術の確立 (第4報). 茨城畜セ研報, 35: 67-68

表3 連続OPU成績

	回収卵子数	1回当たり	正常卵子数	正常卵率	IVF卵子数	胚盤胞数	備考
	個	個	個	%	個	個(%)	
A	212	16.3	162	76.4	127	31(24.4)	13週
B	74	5.7	53	71.6	36	5(13.9)	13週
C	106	8.8	69	65.1	53	5(9.4)	12週
D	78	9.8	58	74.4	57	6(10.5)	8週
E	83	10.4	60	72.3	56	11(19.6)	8週
F	50	6.3	37	74.0	33	3(9.1)	8週