

生体吸引卵子による初期胚作出技術の確立

渡辺晃行・根本聡実¹・山口大輔・足立憲隆

Cattle inVitro Embryo Production Using Oocytes Collected by Ovum pick-up

Akiyuki WATANABE, Satomi NEMOTO¹, Daisuke YAMAGUCHI, Noritaka ADACHI.

要 約

と畜場由来の卵巣を利用する体外受精では生まれた子牛の登録ができない。このため個体識別可能な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。本試験ではこの生体卵子吸引技術を利用した胚生産技術の確立を目的とした。吸引卵子の発生培地について検討を行なった結果，20%CS 加 TCM199, CR1aa, IVD101, IVMD, PRMI で発生率は IVMD の除くすべての区で有意に高かった。このため調製が簡便で培養液による誤差が少ない IVD101 を使用した。生体卵子吸引は当センター繋養の黒毛和種およびホルスタイン種雌牛を用いて行った。生体卵子吸引は、延べ 152 頭実施し、1263 個（1 卵巣平均 4.6 個）の卵子を吸引した。そのうち正常卵子は 967 個（正常卵率 76.6%）であった。吸引した正常卵子のうち 746 個を体外受精に使用したところ、152 個（20.4%）が胚盤胞まで発生した。これらを 27 頭に移植した結果、7 頭が受胎した（受胎率 25.9%）。また、採卵成績の悪い供卵牛 6 頭から週 1 回 OPU を行なった結果、13 週間連続して卵子の回収が可能であった。以上のことから胚生産の一つの選択肢として十分に利用することが出来る技術として確立できた。

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。その一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。また、血統が半明していてもこの卵巣は 1 回しか利用できず胚が作出されなければ、その母牛の後代はそこで途絶えてしまう。

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¹⁾²⁾。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、この方法が確立するとホルモン処理の必

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³⁾⁴⁾、胚生産の効率化と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。

1 現茨城県県北家畜保健衛生所

材料および方法

1 材料

供試牛は、当センター繋養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、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) を接続したものを用了。吸引圧は 100mmHg に設定した⁵⁾⁶⁾。

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、膣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成熟培養後、体外受精に用いた。成熟培地は FBS10% 添加した TCM199 (GIBCO) を用いて 38.5°C, 5%CO₂, 95% 空気の気相条件で 20 時間から 24 時間で行なった。

連続採卵では週一回の間隔で 8 週間、12 週間および 13 週間連続で卵子吸引を行なった。

2) と畜場由来卵巣からの卵子吸引

と畜場で回収した卵巣は抗生物質の入った生理食塩水で 4-5 回洗浄し、卵巣表面に存在する直径 5mm 程度の卵胞から長さ 60mm のショート針を使用して卵胞液ごと卵子を吸引した。このときシリンジ内にはあらかじめ卵子回収液 OCM (機能性ペプチド研) を 1ml 程度吸引した。回収液中の卵子を検索し、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成熟培養後、体外受精に用いた。成熟培地は FBS10% 添加した TCM199 を用いて 38.5°C, 5%CO₂, 95% 空気の気相条件で 20 時間から 24 時間で行なった。

3) 胚の発生培養

体外受精を行なった卵子を、卵子の成熟培養などに用いられる FBS10% 添加した TCM199 および発生培養に用いられる CR1aa, 調整済みの IVD101 (機能性ペプチド研), 共培養が必要な IVMD (機能性ペプチド研) および伸長期胚盤胞の培養などに用いられる PRMI の 5 種類の培養液を使用しそれぞれで 3 回洗浄後培養器に移し、38.5°C, 5%CO₂, 5%O₂, 90%N₂ の気相条件で 7 日間培養した。

4) 体外受精

凍結精液を 37°C 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 × 10⁷ 個/ml に調整し、38.5°C, 5%CO₂, 95% 空気の気相条件で 6 時間体外受精培養を行った。

5) 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 (IVD101) 50 μl のドロップに移し、38.5°C, 5%CO₂, 5%O₂ 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。

6) 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

発生培養液別の胚盤胞発生率の比較を表 1 に示した。IVMD 以外の培溶液で胚盤胞発生率は 30% 以上で有意差はなかった。IVMD での発生が有意に低かったのは、共培養に必要な卵丘細胞の培養がうまくできなかったことによるものと思われた。生体吸引による卵子の発生培地には調製が簡便で培養液による誤差が少ない IVD101 を使用することにした。と畜場由来吸引卵子および生体卵子吸引の結果を表 2 に示した。と畜場由来卵巣 392 個から吸引した卵子数は 2945 個、1 卵巣あたりの吸引数は 7.5 個、A ランク卵子数は 2530 個、卵巣あたりの A ランク数は 6.5 個、受精に供した卵子数は 1706 個で胚盤胞数は 541 個であった (胚盤胞率 31.7%)。生体吸引では吸引卵巣数は 304 個、延べ 152 頭実施し、1263 個の卵子を吸引した。1 頭あたり平均は 4.6 個で、A ランク卵子は 967 個、卵巣あたりの A ランク数は 3.2 個で受精に供した卵子数は 746 個、胚盤胞数は 152 個であった (胚盤胞率 20.4%)。超音波による画像での卵子吸引でも、と畜場由来卵巣から卵子を吸引した場合の 61% 程度の良好な結果が得られた。年度別による卵子吸引数の変化を表 3 に示した。平成 13 年度では 1 頭あたりの吸引卵子数が 4.0 個、14 年度では 7.0 個、15 年度では 9.9 個、16 年度では 10.8 個と年々回収個数が増加していった。A ランク卵子の割合は平成 13 年度では 87.0%、14 年度では 85.7%、15 年度では 70.1%、16 年度では 78.1% であった。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したためと思われる。

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できていない。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 4 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できた。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% 前後の割合であった。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ものと思われた。

OPU-IVF により胚盤胞まで発生した 27 個について移植を行なった結果 7 頭で受胎した (受胎率 25.9%)。

生体卵子吸引ではホルモン処理や性周期に関係なく胚を作出することができ、過剰排卵処理に反応しない個体や老齢牛、繁殖障害牛からでも胚

を生産することが可能であり、胚生産の一つの選択肢として十分に利用することが可能である。今後の課題として体外受精胚の普及定着に向けて凍結保存胚の受胎率の向上が求められる。

引用文献

- 1) Callesen.H.,Greve.T,and Christensen.F,(1987)Theriogenology.27;217
- 2) Pieters MC et al. (1991). Theriogenology. 35;19- 24
- 3) 今井敬・堂地修・後藤裕司・小林修司・宮澤彰・高橋博人,(1996)第 11 回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会講演要旨 42-43
- 4) 今井敬・小西一之・岡田真人・後藤裕司・小林修司・宮澤彰・小島敏之・堂地修・高橋博人,(1997)第 12 回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会講演要旨 26-27
- 5) 小林修司・今井敬・堂地修・高橋博人・小島敏之,(1996)第 11 回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会講演要旨.40-41
- 6) 小林修司・今井敬・新納正之・後藤裕司・辻野堂士・小島敏之,(1997)第 4 回日本胚移植研究会大分大会講演要旨集.30

表 1 体外発生培養における培養液の比較

培養液	分割卵子数	胚盤胞数	胚盤胞発生率
20%CS+TCM199	1115	385	34.5%
CR1aa	134	40	29.9%
IVD101	106	41	38.7%
IVMD	143	9	6.3%*
PRMI	208	66	31.7%

※P<0.05

表 2 と畜場由来卵巣と生体内卵巣との吸引成績の比較

卵子の種類	吸引卵子数 (頭数)	吸引数	卵巣あたりの 吸引数	A ランク 卵子数	卵巣あたりの A ランク数	受精に供し た卵子数	胚盤胞率 (率)
と畜場由来	392	2945	7.5	2530	6.5	1706	541 (31.7)
生体吸引	304 (152)	1263	4.6	967	3.2	746	152 (20.4)

表 3 卵子吸引成績の年度毎の変化

年度	頭	卵子数	1 頭あたりの卵子数	A ランク卵子数	A ランク卵子率
13	21	84	4.0	73	87.0%
14	46	321	7.0	275	85.7%
15	65	643	9.9	451	70.1%
16	20	215	10.8	168	78.1%

表 4 連続吸引が採卵と体外受精成績に及ぼす影響

	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	
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
合計	603	9.73	439	72.8	362	61(16.9%)	