

学 術

宮城県における牛受精卵移植技術の変遷 (過剰排卵処理及び体外受精技術による胚生産)

沼 邊 孝

宮城県畜産試験場

I. はじめに

宮城県では、牛の効率的な改良及び優良牛の増産手法として昭和58年度から、受精卵移植（総称：以下ETと略す）技術の開発に取り組むとともに農家への普及を推進してきた。ETは多くの複合技術であり、現在も常に新しい技術の開発も行われ、より安定的で効率的かつ簡便な方法について検討されている。

今回は、宮城県畜産試験場における牛ET技術の変遷と取り組んできた技術開発の中で、胚生産技術について紹介する。

II. 宮城県における牛ET技術の変遷

これまでの経過を表1に示した。

表1 宮城県における牛受精卵移植技術の経過

年	経 過
1983年 4月	畜産試験場ET技術開発着手
1984年 6月	新鮮胚移植により子牛生産
1986年 1月	凍結胚移植により双子生産
1986年 2月	第1回受精卵移植師養成(15名)
1986年 4月	畜産試験場に受精卵研究科設置
1987年12月	分割胚移植により子牛生産
1988年 5月	分割胚移植により双子生産
1988年11月	性別別胚移植により双子生産
1988年12月	凍結体外受精胚移植により双子生産
1989年 4月	NOSAI宮城・ET事業開始
1990年11月	第2回受精卵移植師養成(15名)
1992年 2月	宮城県家畜受精卵移植研究会設立
1993年 2月	体細胞クローン子牛生産
1995年 7月	第3回受精卵移植師養成(15名)
1998年 8月	OPU-IVF胚移植による子牛生産
1998年10月	ICSI-IVF胚移植による子牛生産
2000年11月	第4回受精卵移植師養成(15名)
2005年11月	第5回受精卵移植師養成(15名)
2006年 9月	体細胞クローン検定
2012年11月	第6回受精卵移植師養成(6名)

ET技術は、過剰排卵処理、卵処理（培養）、凍結保存、胚移植（受胚牛の選定）が主な技術であり、技術開発のテーマである。また、胚の分割・性別別、体外受精（IVF）、クローン技術、経膈採卵（OPU）や顕微授精（ICSI）技術等も開発の対象であり、それぞれの技術について波及的に取り組んでいる。

当場では、昭和58年度から国の補助事業（牛受精卵移植技術利用事業）に参加し、基礎的な技術開発（過剰排卵処理法、凍結技術、分割技術、性別別等技術高度化、過剰排卵処理の効率的・簡易化技術、胚品質向上）を中心に行い、現在も継続している。その間に開発した技術により、表-1に示す成果を上げてきた。1984年にはETにより初めての子牛が得られ、1986年には凍結胚移植による子牛生産、翌年には分割胚移植、1988年に性別別胚移植による子牛が誕生している。また、関連技術として、1988年にIVF産子や1993年には体細胞クローン産子、1998年OPU由来産子及びICSI由来産子（凍結由来産子は世界初）が得られている。

当場は技術開発とともに、県内のメインセンターとして位置付け、農家でのET普及のためNOSAI宮城の家畜診療センターや開業獣医師とともに推進している。また、家畜受精卵移植師（家畜人工授精師対象）の養成のため、これまでに講習会を6回開催しており81名が受講し、農家での移植を行っている¹⁾。

図-1に年度別採卵成績の推移を示した。左縦軸には回収卵数及び正常胚数、右縦軸に回収頭数を示した。当場において受精卵移植技術に取り組んだ昭

和58年度から平成25年度までの過剰排卵処理し採卵した頭数は延べ2,442頭であり、回収卵数は21,388個（平均8.8個）、正常胚数は12,161（平均5.0個）で、正常胚率56.9%であった。図-2に年度別生体回収胚移植成績の推移を示した。事業開始から平成25年度まで、移植頭数6,496頭、受胎頭数3,330頭で受胎率51.3%であった。図-3に体外受精由来胚移植成績を示した。昭和62年度から平成25年度まで、移植頭数4,211頭、受胎頭数1,647頭で受胎率は39.1%と生体由来回収胚移植と比べ10%程度低い結果となっている。

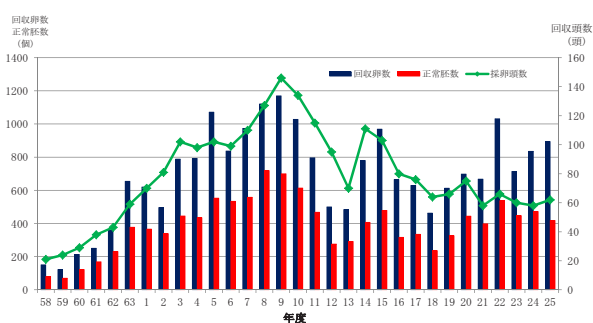


図1 年度別採卵成績の推移

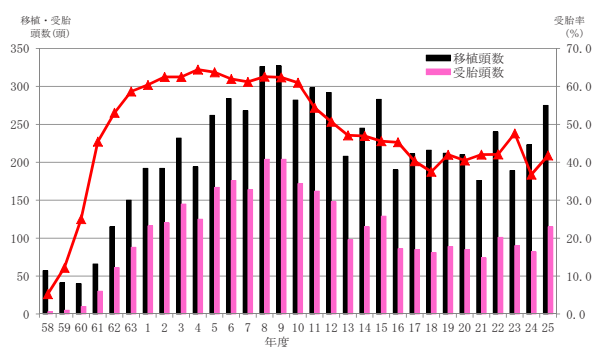


図2 生体回収胚移植成績の推移

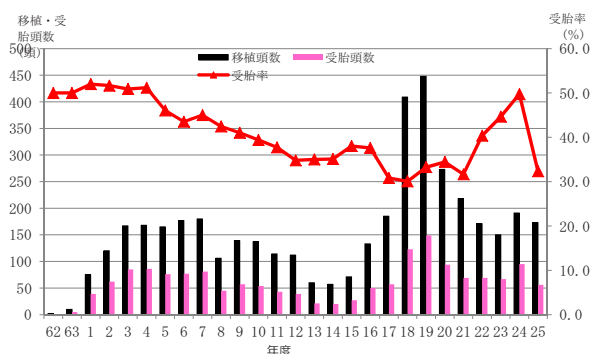


図3 体外受精胚移植の成績の推移

Ⅲ. 胚生産技術

牛のET技術において、安定的に良質な胚を得ることは最も重要である。現在、胚を得る方法には大きく2つの方法がある。それは、従来からの過剰排卵処理による生体内胚回収によるものとIVF技術（体外成熟・体外受精・発生培養）により胚を得る方法である。

1. 生体内胚生産技術（過剰排卵処理法）

生体内胚を得る方法は、牛に性腺刺激ホルモン製剤の投与による過剰排卵処理を行い、人工授精し7日後に胚を回収する方法により行われる。この技術は一般的には2ヶ月間隔で反復処理が可能であり、改良の速度を早め優良牛の増頭等に利用される。その過剰排卵処理において、外因性のホルモン製剤投与による卵巢反応は個体による差が認められる¹³⁾。その要因として、牛の品種、使用する性腺刺激ホルモン製剤の種類やロット差、投与量、使用する精液（種雄牛）、体重や年齢、季節、産歴や経過日数、栄養管理等が挙げられ、それらが複雑に関連しているためと考えられ、未だ解決すべき課題として現在も研究が行われている。

(1) 過剰排卵処理法の簡易化

過剰排卵処理は発情確認後9～14日目に開始する^{2～5)}。一般的には卵胞刺激ホルモン（FSH）総量20AU～30AUを1日朝夕2回3～4日間連続して投与する漸減法^{6～7)}が用いられる。当場では農家段階での普及性等から投与回数が少ない過剰排卵誘起方法について検討している。

過剰排卵処理が1回投与で可能な方法として妊馬血清性性腺刺激ホルモン（PMSG=eCG）法を検討した。PMSGの投与量（1,500IU～3,800IU）、プロスタグランジンF_{2α}（PG）の投与時期（48～72時間後）、排卵促進のため性腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）の投与量（200～400μl）・回数（1～2）を検討した。その結果、PMSG2,000IUとし72時間後PG投与、発情確認時GnRH200・400μlを併用する処理法（図-4）によりFSHと同等の成績が

得られことを明らかにし、農家段階で応用可能な技術とした^{8~10)}。表－2にFSHとPMSG投与による過剰排卵処理成績を示した。FSH漸減投与法及びPMSG投与法による平均回収卵数と平均正常胚数は、それぞれ8.7個と8.6個、正常胚数は5.1個と4.6個であり差は認められなかった¹¹⁾。

表 2 FSH漸減投与とPMSG投与による過剰排卵処理成績

処理法	頭数	回収卵数/頭*	正常胚数/頭*	正常胚率(%)
FSH漸減	158	8.7 ± 7.8	5.1 ± 5.8	48.2
PMSG	61	8.6 ± 7.7	4.6 ± 4.9	45.9

*:平均±標準偏差

大久ら¹⁴⁾ 改変

また、徐放作用を持つポリビニールピロリドン (PVP-K30) を蒸留水で溶解後、30%溶液としてFSH (20AU) を溶かし、筋肉内に1回投与する方法を検討した。その結果、FSHの減量法と同等の成績が得られた^{12,13)}。しかし、PVP-K30を溶液として使用することが認可されなかったことから普及技術とはならなかった。

一方、生理食塩水50mlでFSH20AUを溶かし、牛の頸部皮下に1回投与する方法（生理食塩水1回投与法）について共同試験（他の公設試験研究機関）を行い、FSH減量法と同等の成績が得られることを明らかにし、野外での利用を可能とした¹⁴⁾。この過剰排卵処理方法は、発情日を除く任意の日に牛用腔内挿入プロジェステロン・安息香酸エストラジオール配合剤 (PRID) を挿入し、挿入日を0日として、挿入後4日目から過剰排卵処理（生理食塩水50mlでFSH20AU溶解し頸部皮下1回投与）を開始した。過剰排卵処理開始時にPGを筋肉内に1回投与し、開始48時間目にPRIDを除去、除去後31時間目にGnRHを投与する方法とした（図－4）。FSH漸減法と生理食塩水1回投与法の処理成績を表－3・4に示した。表－3ではFSHの量及び生理食塩水の量について検討し、FSH20AUを50mlの生理食塩水に混和し頸部皮下に注射する方法により、FSH漸減法と同等の成績が得られた¹⁵⁾。表－4にはH23年度から25年度まで当場において、FSH漸減法により処理した成績と生理食塩

水1回投与法による成績を示した。回収卵数と正常胚数はそれぞれ14.6個と14.0個、正常胚率は8.4個と8.2個、正常胚率は57.5%と58.8%であった（未発表）。

表 3 FSH漸減投与及び生食溶解FSH 1回投与による過剰排卵処理成績

処理法	頭数	回収卵数/頭*	正常胚数/頭*	正常胚率(%)
FSH30AU-50ml	6	12.0 ± 16.5	5.3 ± 8.4	44.2%
FSH30AU-10ml	6	26.0 ± 10.4 b	4.6 ± 0.6 a	17.7% a
FSH20AU-50ml	6	12.3 ± 4.7	9.0 ± 2.0 b	73.2% b
FSH20AU-10ml	6	5.6 ± 2.3 a	3.3 ± 2.5 a	58.9%
FSH漸減	6	17.7 ± 8.3 b	10.3 ± 11.1	58.2%

*:平均±標準偏差 異符号間で有意差ありP<0.05 及川ら¹⁰⁾ 改変

表 4 FSH漸減投与及び生食溶解FSH 1回投与による過剰排卵処理成績

処理法	頭数	回収卵数/頭*	正常胚数/頭*	正常胚率(%)
FSH20AU-50ml	23	14.6 ± 10.7	8.4 ± 8.5	57.5%
FSH漸減	117	14.0 ± 9.9	8.2 ± 7.6	58.8%

*:平均±標準偏差 H23～H25年度集計 未発表

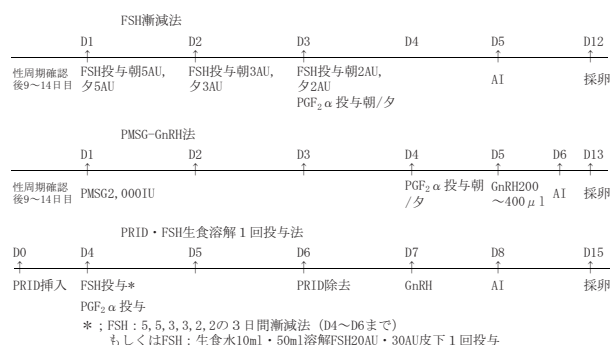


図 4 過剰排卵処理法について

(2) 過剰排卵処理法の効率化

過剰排卵処理を連続して行う場合は、概ね60日間隔で行う。処理後には通常の繁殖に戻すことが多いことから、一定期間に複数回行える方法も必要となる。そこで期間を短縮する方法について検討した。

発情誘起・発情同期化のために開発された牛腔内留置型黄体ホルモン製剤 (CIDR) を応用し、発情周期に関係なく過剰排卵処理を連続して行う方法を検討した。CIDRを挿入し、挿入日を0日として10日間留置後にFSH漸減投与法等の過剰排卵処理を行い、48時間後に留置を除去するとともにPGを投与し発情を誘起した。

発情後人工授精を行い7日目に採卵を行った。過剰排卵処理は35日間隔で実施し2回連続的に処理を行った(1クール)。さらに63日間隔でその連続処理を2反復した(図-5)。処理成績を表-5に示した。1~3クール間において採卵成績に差がないことを明らかにした¹⁶⁾。このことからCIDRを用いることで発情周期に関係なく、計画的に連続的過剰排卵処理が可能となった^{16~19)}。

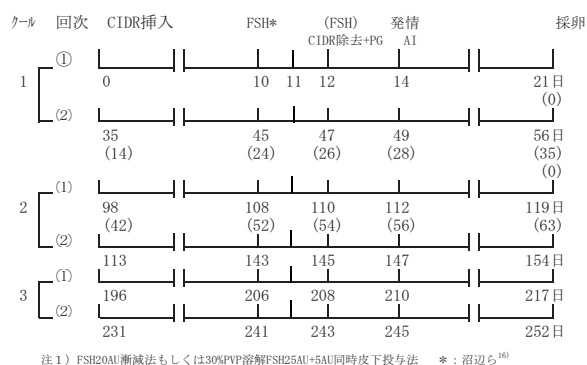


図5 CIDR利用による計画的連続過剰排卵処理法

表5 CIDRを用いた牛の過剰排卵処理成績

クール	頭数	回収卵数/頭*	正常胚数/頭*	正常胚率(%)
1	18	8.2 ± 1.4	6.0 ± 1.2	73.1
2	18	8.7 ± 1.3	5.8 ± 1.3	66.7
3	18	11.0 ± 1.9	8.2 ± 1.7	74.5

*: 平均±標準誤差

沼辺ら¹⁶⁾ 改変

また、より高品質胚を安定的に確保することを目的にCIDRと安息香酸エストラジオール(EB)の筋肉内投与を併用する方法を検討した。この方法は卵胞ウエーブを人為的に制御する方法であり、CIDR挿入日を0日として7日目にEB1.0mgを投与し、10日目からFSHによる過剰排卵処理を行う方法である(図-6)²⁰⁾。表-6に成績を示した。FSH漸減法とFSH漸減+EB法における回収卵数と正常胚数はそれぞれ9.0個と10.6個、5.4個と5.3個であり差は認められなかった。FSH20AU漸減投与法と比べ、漸減+EB法は大卵胞数が抑制され過剰排卵処理成績が改善され、特に過剰排卵処理成績の悪い牛群に効果があることを明らかにした^{20~22)}。

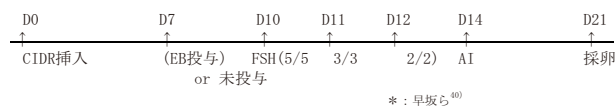


図6 過剰排卵処理法(CIDR及び安息香酸エストラジオール法)

表6 FSH漸減投与法におけるEB投与が過剰排卵処理成績に及ぼす影響

処理法	頭数	回収卵数/頭*	正常胚数/頭*	正常胚率(%)
FSH漸減	96	9 ± 7.7	5.4 ± 5.3	48.2
FSH漸減+EB	96	10.6 ± 7.6	5.3 ± 5.1	45.9

*: 平均±標準偏差

早坂ら²⁰⁾ 改変

(3) 過剰排卵処理法のまとめ

牛の過剰排卵処理は、性周期を1~2回確認し発情後9~14日目に処理を開始するのが一般的であり、概ね60日間隔で処理を行う。これまでの技術開発により、頻回投与が必要なFSH漸減投与と同等の成績が得られるPMSG処理法やFSHを生理食塩水50mlに溶解し頸部皮下に1回投与する方法を開発した。一方、CIDRやPRIDを応用することで、性周期に関係なく過剰排卵処理が可能であるとともに28日及び35日間隔で連続的に処理を行う方法、CIDRを活用しエストラジオールと性腺刺激ホルモンとの併用処理する方法により低採卵牛においても良質胚の生産が可能となる処理法を開発した。

これらの処理法が開発されたことで、利用目的や供胚牛の状況、管理状況等により処理法を選択することができるようになった。しかし、いずれの方法においても正常胚が得られない場合が10~20%程度認められることや低採卵牛に対する処理法にはまだ改善が必要である。今後はより安定した良質胚の生産のため繁殖に関する遺伝的な能力解析を含め新たな処理法の開発が必要と考えられる。

2. IVF技術による胚生産

1985年に花田ら²³⁾が食肉処理場(と場)由来の卵巣内未成熟卵子を用いて、IVF技術により胚を作出し、子牛の生産に成功した。その後、卵巣内未成熟卵子を採取し胚盤胞期胚まですべて研究室内で作出することが可能となった^{24,25)}。当场でも

1987年からと場で採取した卵巣内の未成熟卵子を使ったIVF技術確立に向けて試験を開始し、1988年には初めての産子が得られた³⁶⁾。その後、OPU技術により得られた生体内の卵子を使ったIVF技術について検討を行っている。

(1) と場で採取した卵巣内の卵子による体外受精 胚生産

1) 卵巣・卵子採取

と場で採取した卵巣内の卵子は、18G注射針付き10mlの注射筒を用いて卵胞液とともに卵子を吸引し、シャーレにひろげ実体顕微鏡下で検索した。ピペットにより卵子を収集し、2～5%子牛血清 (CS) 及び抗生物質 (ペニシリン100IU/ml、ストレプトマイシン100μg/ml) を添加したPBS中に保存する方法を確立し、より安定して卵子の確保ができるようになった^{26～28)}。

と場において採取される卵巣 (卵子) を輸送する場合の保存温度と保存時間の影響について多くの報告がある^{29～31)}。当場では卵巣を20℃～25℃の保温容器で保存時間6時間まではその後の卵割率と胚盤胞率には差がないこと、卵子 (20～30個) を採取し成熟培養 (5%CS加TCM199) を兼ねた輸送保存器をクライオチューブ (0.25mlストローと2mlクライオチューブの比較) とし、37℃～40℃の保存温度が良好な成績となることを明らかにした³²⁾。

2) 成熟培養

成熟培地は25mMHepes緩衝TCM199に5～10%血清、FSH0.01AU/ml及びエストラジオール17β 1 μg/mlを添加した。その際の成熟培養条件は、38.5℃、5%CO₂、95%空気の気相下で20～24時間行った^{27,33,34,35)}。使用する血清は非働化したCS、胎児血清 (FCS)、発情期血清やフリーマーチン血清について、それぞれロットチェックを行い胚発育が良好なものを使用した^{26,36,37)}。

一方、良質なIVF胚生産のため、体外成熟培地 (5%CS、50ng/ml-EGF、0.01AU/ml-FSH、0.2mMピルビン酸Na添加M199培地) にジブ

チル環状AMP (dbcAMP) を10μM、100μM添加し胚発生への影響を検討した。その場合、22時間成熟培養し、発生培地としてmSOF (BSA 6 mg/ml、10μl/ml ITS(インスリン-トランスフェリン-亜セレン酸ナトリウム) 添加) により培養を行った。胚盤胞への発生成績から成熟培地に10μg/ml-dbcAMP添加が受胎性の高い胚の生産に有効であることを明らかにした³⁸⁾。

3) 体外受精

体外受精は、ヘパリン^{27,34,39,40)}やペントキシフェリン⁴¹⁾等を用い受精能獲得処理を行うが、種雄牛により至適濃度及び処理時間が異なることを報告した⁴²⁾。具体的な方法は凍結精液を融解後、修正タイロート液 (BO液)⁴³⁾にカフェインを5～10mM加えた液 (Caf-BO液) で希釈し、400gで遠沈し2回洗浄を行った。その後、精子濃度をCaf-BO液で2.0×10⁷精子/mlに調整し、BSA20mg/mlに修正したBO液 (BSA-BO液) にヘパリン5～10IU/mlを加えた溶液 (Hep-BSA-BO) で等倍希釈した。この精子浮遊液を100μlの小滴として流動パラフィンで覆い、CO₂インキュベーターで15分間前培養した。体外成熟卵をHep-BSA-BO液で2回洗浄し、精子浮遊液に約50個ずつを導入し6時間媒精した。種雄牛によりヘパリンをペントキシフェリンに変更することで受精率が改善することも確認しており、種雄牛ごとで処理する薬剤や濃度を検討することが必要であることを明らかにした (表-7)。

表7 牛体外受精における精子処理法の検討

種雄牛	回数	ヘパリン ¹⁾		カフェイン+ヘパリン ¹⁾		ペントキシフェリン+ヘパリン ¹⁾	
		分割数	胚盤胞数	分割数	胚盤胞数	分割数	胚盤胞数
A	4	93/200 (47) ^a	45/200 (23) ^{ab}	128/200 (64) ^a	52/200 (26) ^{ab}	119/200 (60) ^{ab}	48/200 (24) ^{ab}
B	4	108/299 (54) ^a	46/200 (23) ^{ab}	137/200 (69) ^a	48/200 (24) ^{ab}	160/200 (80) ^a	58/200 (29) ^{ab}
C	4	116/299 (58) ^{ab}	59/200 (30) ^{ab}	134/299 (67) ^a	63/200 (32) ^{ab}	150/299 (75) ^{ab}	56/200 (28) ^{ab}
D	4	65/200 (47) ^a	18/200 (9) ^b	70/200 (35) ^b	21/200 (11) ^b	122/200 (61) ^a	44/200 (22) ^a

1) 10IU/mlヘパリン, 5mMカフェイン, 5mMペントキシフェリン

2) 異符号間に有意差あり (P<0.05)

細田ら⁴⁰⁾

一方、性判別精液による体外受精時の受精率および胚発生成績に及ぼす影響を検討した。ホルスタイン種種雄牛4頭について性判別精液と非選別精液について比較した結果、最適精子濃度を決定すれば種雄牛の違い及び性選

別の有無が受精率には影響しないが、胚発生能は種雄牛により異なることを明らかにした⁴⁴⁾。

4) 発生培養

体外受精後に卵子のみを体外で培養すると8～16細胞期で発生が停止する⁴⁵⁾が、卵丘細胞との共培養により胚盤胞まで发育する^{26,28,34,35)}。具体的な方法は、得られた卵子を卵丘細胞が付着した状態で成熟培養し、発生培養も継続して同じ条件で培養を行った。媒精後48～72時間後に卵丘細胞から卵子を取り外し、8日間培養を継続した。培養条件は25mMヘPes緩衝TCM199に非動化CS10%を加え、直径30mmのプラスチックシャーレに4ml分注し、流動パラフィンで覆い、50～100個の卵子を導入し、5% CO₂、5% O₂、39℃の条件で培養を行った。表8に8～16細胞期胚を卵丘細胞層と接触あるいは接触させないで培養した場合の胚盤胞期胚への発生率を示した。接触区、非接触区及び非共培養区への胚盤胞への発生率は、32.9～36.9%、25.7～44.1%及び7.4～9.2%と非共培養区で有意に低い結果であった³⁴⁾。

表8 8～16細胞期胚の卵丘細胞との共培養が胚盤胞への发育に及ぼす影響

種雄牛	回数	胚盤胞胚数 (%)		
		卵丘細胞との共培養		非共培養
		接触区*	非接触区**	
A	5	24/65 (36.9) ^a	30/68 (44.1) ^a	6/65 (9.2) ^b
B	4	23/70 (32.9) ^a	18/70 (25.7) ^a	5/68 (7.4) ^b

* ; 8～16細胞期胚を卵丘細胞が単層状に发育したシャーレに入れて培養

** ; 底面が0.4μmの71μmの円筒形を胚に入れて卵丘細胞が単層状に发育したシャーレに入れて培養
異符号間に有意差あり (P<0.01) 高田ら³⁴⁾

発生培養において、卵丘細胞等との共培養では、25mMヘPes緩衝TCM199に非動化CS10%、5% CO₂、5% O₂、39℃の条件で胚盤胞期胚まで发育するが非共培養条件（媒精直後）では、単純合成培地（HECM）に5% CS添加、38.5℃、2%CO₂、7%O₂、in Airの気相下で20～24時間行うことで共培養法と同等の胚発生成績が得られることを明らかにした⁴⁶⁾。

表9 単純合成培地(HECM)における共培養・非共培養及び培養条件が胚盤胞への发育に及ぼす影響

培養条件		供試 卵子数	発生成績	
気相条件	培養時細胞の有無		>2cell(%)	胚盤胞数(%)
7%O ₂	共培養	105	65 (62)	0 (0) ^a
in air	非共培養	102	75 (74)	21 (21) ^b
20%O ₂	共培養	120	72 (60)	18 (15) ^b
in air	非共培養	113	75 (66)	13 (12) ^b

* ; 気相条件別共培養と非共培養で異符号間に有意差あり (P<0.05 佐藤ら⁴⁷⁾)

また、発生培養液としてCR1aaやm-SOF、さらにリノール酸アルブミン (0.25mg/ml)、IGF1等の添加により発生成績が改善することも明らかにした^{44,46,47,48,49)}。図-7に現在当場において検討している非共培養IVFシステムの模式図を示した。体外成熟、体外受精及び体外培養（発生培養）の手法の基本的な部分はほぼ同様であるが、より効率的な胚生産技術について検討を行っている。

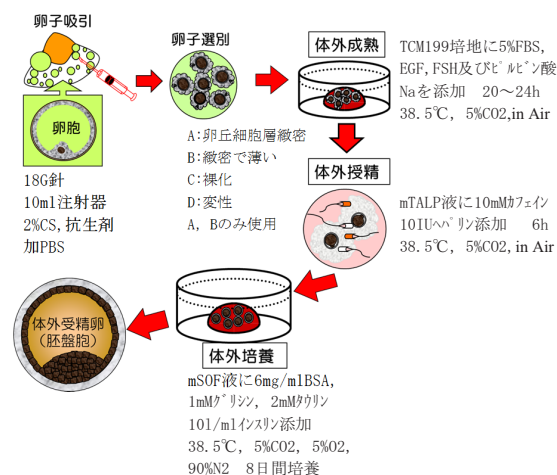


図7 IVF模式図（非共培養：mSOF）2014

(2) OPU利用生体内卵子による体外受精胚生産

OPU技術は、牛のIVF技術による胚生産を前提にし、生体卵巢内卵子を採取する技術であり反復性に優れ、その後の胚生産に有効な技術である。過剰排卵誘起処理が安定しない要因は種々あるが、OPUは超音波診断装置で確認しながら卵子を採取するため、IVF技術が安定していれば胚を多く生産できる。

当場では、1997年から技術開発に取り組み1998年には子牛生産を行っている。特定のドナーから1週間に1回程度卵子を得ることがで

き、IVF技術を応用することで胚生産が可能で、子牛登録も可能なことから、IVF技術を活用し改良に利用できる技術である。

1) OPUの条件

OPUは超音波画像診断装置 (SSD-1200) に7.5MHzのコンベックス型探触子 (UST-M15-2361-1) を装着し、17Gの吸引針 (COVA Needle) をポリプロピレン製の50ml遠心管を介して吸引ポンプに接続し、卵胞の吸引は吸引圧110mmHgで実施した⁵⁰⁾。なお、OPUの手技の詳細は家畜改良センター技術マニュアル19⁵¹⁾を参考にすることを推奨する。

2) 対象牛

OPU技術を活用した場合、改良にも利用可能である。このことから育成牛や能力の高い老齢牛についても応用できるかについて検討が必要となる。

そこで黒毛和種の生後8ヶ月齢育成牛及び生後11～12ヶ月齢のホルスタイン種についてOPU-IVFによる胚生産を検討した。生後8ヶ月齢の黒毛和種4頭に対し延べ32回OPUを行い、卵子採取率は55.4% (卵胞数486に対し268個の卵子を採取) で、1頭につき1回当たり8.4個の卵子が得られた。そのうち培養可能な卵子数は6.7個 (214個) で、胚盤胞率は14.0%であった。なお、OPU時のフラッシング液はBSA添加PBSに10 IU/mlヘパリンを添加して使用した。また、発生培養条件はCR1aa培地を使用し、38.5℃、5% CO₂、7% O₂、88% N₂の条件で培養を行った⁵²⁾。表-10には11～12ヶ月齢のホルスタイン種育成牛5頭について述べ59回OPUを実施した成績を示した。OPU1回あたり10.0個採取しそのうち7.3個の卵子を培養し、2.0個の胚盤胞期胚が得られた。全体の胚盤胞率は27.1%であった⁵³⁾。このことから育成期においてもOPU技術により卵子を得て、胚を生産することが可能であることが明らかになった。

表10 ホルスタイン種育成牛に対するOPUによる胚生産成績

頭数	回数	採取 卵胞数	培養 卵胞数	分割率 (%)	胚盤胞数 (%)
5	59	10.0±3.8	7.3±3.3	4.4±2.7 (60.2)	2.0±1.7 (27.1)
	総計	591	432	260	117

1) 平均±標準偏差

植田ら⁵⁴⁾

また、能力の高い老齢な黒毛和種経産牛2頭 (H1年生まれ・H5年生まれ) について、それぞれ119回と65回 (13～19歳及び11～13歳時) のOPUを実施した。1頭目は培養卵子数延べ829個を採取しそのうち663個を培養し、胚盤胞数214個 (胚盤胞率32.4%) で、2頭目は同様に244個採取しそのうち199個培養し、胚盤胞数77個 (胚盤胞率38.7%) と胚生産は可能であった⁵⁴⁾。

3) OPUの前処理

OPUにより得られた卵子の品質は卵胞の発育ステージとの関連が強く、発育型卵胞から得られる卵子は品質及びその後の発生能が高いことが報告されている⁵⁵⁾。これらのことから卵胞の発育を制御し、その後の卵胞発育を同期化し卵子の発育ステージを調整することが可能か検討する必要がある。そこでOPUを行う前処理としてホルモン剤の種類、投与量及び開始時期による胚発生率について検討した。

黒毛和種経産牛4頭について、7日間隔で6回のOPU (試験区: OPU6日前にEB1mgを1回筋肉内投与と無処置の3反復) を行った。この際の培養条件はmSOF培地に5% FCS添加、38.5℃、5% CO₂、90% O₂の条件で培養を行った。その結果、分割率は同等であったが胚盤胞率はEB投与区で有意に増加した⁵⁶⁾。また、OPU48時間前 (2日前) 投与区 (2日前朝夕各FSH3AU、1日前朝夕各FSH1AU総量8AU)、FSH40時間前投与区 (40時間前FSH3AU、24時間前FSH3AU、16時間前2AUの総計8AU)、24時間前投与区 (24時間前FSH4AU) で比較すると40時間前が最適投与開始時期であることを明らかにした⁵⁶⁾。

表11 黒毛和種経産牛におけるFSH投与開始時間の違いによる胚発生成績

FSH投与 開始時期	頭数	回数	採取 卵子数	分割数 (%)	d8胚盤胞数 (%)
48時間区	4	2	19.75±6.02	12.75±4.43 (64.6)	9.50±1.91 (48.1)
40時間区	4	2	21.25±8.50	15.25±6.45 (71.8)	12.25±5.12 (57.6)
24時間区	4	2	19.50±5.07	13.00±5.89 (66.7)	10.25±4.03 (52.6)
			平均±標準偏差		及川ら ⁵⁶⁾

今後、さらに胚生産効率を高めるため、卵子の品質を良くする手法や発育ステージの同調等についても検討が必要である。

(3) IVF技術による胚生産のまとめ

IVF技術による胚生産は、利用する卵子の由来により2つの方法がある。それはと場由来の卵巢内未成熟卵子と生体内卵巢へのOPUによる卵子である。前者は多くの卵巢から多数の卵子を得ることができ、低コストに胚生産が可能である。後者は優良な雌牛から継続的に卵子を得ることができ、改良への応用も可能な技術である。

IVF技術の検討は、卵巢の輸送方法、卵子採取方法、体外成熟、体外受精、体外培養と多岐にわたる。1個の卵巢から10個程度の卵子が得られ、IVF技術により作出される胚盤胞期胚数は2～3個（胚盤胞率25%程度）である。IVFにより作出した胚移植による受胎率は生体回収胚移植による受胎率よりも10%程度低い。このことから体外成熟、体外受精及び体外培養のそれぞれについて現在も改良が加えられており、今後もそれぞれにおいてより効率的かつ良質な胚生産技術が検討されるものと考えられる。

OPUによる卵子確保は、個体により差があり（1頭あたり10～20個）、その後のIVF技術による胚生産においても胚盤胞率は15～50%と個体による差が大きい。このことから、安定的な胚生産のため、OPUにより良質な多くの卵子を確保するためのホルモン製剤による前処理法及び卵子の発育ステージの同期化に係る技術開発が主な項目となる。

IVF技術、特にOPU技術による胚生産は、希望の牛（高能力牛）から多くの胚を継続的に作出できることから、より受胎性の高い胚生産技術となるよう研究が進められると考えられる。

IV. おわりに

今回取り上げた胚の生産技術開発は、それぞれの成果が得られた段階で、現場普及を進めており、普及度の高い技術と考えている。今後も農家段階で利用可能な技術開発を推進し普及を図る考えである。

今回は畜産試験場において技術開発及び検討を加えて得られた成果をまとめたものであり、関係職員及び協力頂いた関係機関の職員に対し謝意を表します。

引用文献

- 1) 佐竹仁郎 (1988). 宮城県における牛受精卵移植のあゆみ. 宮獣会報. 41巻4号, 165-173.
- 2) Adams GP, Matteri RI, Kastelic JP, et al. (1992). Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifer, J Reprod Fertil ; 94 : 177-188.
- 3) Hasler JF, Mccauley AD, Schermerhorn EC, et al. (1983). Superovulation responses of Holstein cows. Theriogenology ; 19 : 83-99.
- 4) Rieger D, Desaulnier D, Goffa K. (1988). Ovulatory response and embryo yield in superovulated Holstein heifers given a priming dose of FSH-P at day 2 of the estrous cycle. Theriogenology ; 30 : 695-699.
- 5) Lussier JG, Carruthers TD. (1989). Endocrine and superovulatory responses in heifers pretreated with FSH or bovine follicular fluid. Theriogenology ; 31 : 779-794.
- 6) Subramanian A, Devarajan KP, Mohanan M. (1991). Repeat flushing and embryo recovery (RFER) in cross-bred donor cows. Theriogenology ; 35 : abstract 277.
- 7) Boland MP, Goulding D, Roche JF. (1991). Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. Theriogenology ; 35 : 5-17.
- 8) 堀内俊孝, 沼辺孝, 古山元彦他. (1984). 黒毛和種の過剰排卵誘起法について ; PMSG-PG法へのLH-RH投与の検討. 日本畜産学会 ; 第75回大会講演要旨 ; 96.
- 9) 堀内俊孝, 沼辺孝. (1987). 黒毛和種のPMSGによる過剰排卵誘起法へのLH-RHの投与効果について. J Mamm Ova Res. 4巻2号 : 278-283.
- 10) 堀内俊孝, 沼辺孝. (1987). PMSGを用いた過剰排卵誘起法へのコンセラル（合成LH-RH酢酸フェルチレリン）の応用について. 獣医界10号 ; 129 : 101-106.
- 11) 大久範幸, 高田直和, 沼辺孝他. (1992). 卵胞刺激ホルモンと妊馬血清性腺刺激ホルモンによる牛の過剰排卵誘起. 日本獣医師会雑誌. 7巻45号 ; 471. (1987). 475.
- 12) 奥地弘明, 小野寺邦男, 沼辺孝他. (1995). ウシにおける過剰排卵処理の簡易化技術・黒毛和種におけるPVP溶解FSH投与法の検討. 畜産技術1号 ; 476 : 22-26.
- 13) Satoh H, Numabe T, Takada N. et al. (1996). Superovulation in Japanese Beef cows using polyvinylpyrrolidone (PVP) as the vehicle for porcine FSH (pFSH). Theriogenology ; 40 : abstract 332.
- 14) 及川俊徳, 平泉真吾, 西宮弘他. (2013). 黒毛和種過剰排卵処理の簡易化に向けた共同試験の取り組み. 日本胚移植学誌. 35 : No2. 84 : 585-591.
- 15) 及川俊徳, 板橋知子, 阿部玲佳. (2012). 牛の受精卵移植技術の実証. 宮城県畜産試験場試験成績書. 23-1 ; 52-54.

- 16) 沼辺孝, 及川俊徳, 菊地武他. (1997). 腔内留置型黄体ホルモン製剤 (CIDR-B) を用いた黒毛和種における連続過剰排卵処置. *J Rep Dev.* 43 ; 6 : J27-32.
- 17) Oikawa T, Numabe T, Kikuchi T, et al. (1998). Repeated induction program of superovulation in cattle throughout one year using a progesterone device and porcine (p)FSH. *Theriogenology.* 53 ; 382.
- 18) 沼辺孝, 佐藤秀俊, 及川俊徳他. (1996). 黄体ホルモン製剤利用による黒毛和種の過剰排卵処理. *J Mamm Ova Res.* 4巻 ; 13 : S-24.
- 19) 沼辺孝, 及川俊徳, 菊地武他. (1997). 黄体ホルモン製剤を用いた計画的な過剰排卵処理法の検討. *日本胚移植学雑誌.* 19 ; 1 : 72.
- 20) 早坂駿哉, 高田直和, 石山治他. (2006). ウシ過剰排卵処理における安息香酸エストラジオールの効果. *日本胚移植学雑誌.* 26 ; 3 : 99-106.
- 21) 早坂駿哉, 高田直和, 石山治他. (2003). ウシ過剰排卵処理における安息香酸エストラジオールの効果. *日本胚移植学雑誌.* 20 ; 3 : 99-105.
- 22) 早坂駿哉, 高田直和, 千葉和義他. (2005). 黄体ホルモン製剤と発情ホルモン製剤を併用した過剰排卵処理. 第20回東日本家畜受精卵移植研究会要旨 : 1-2.
- 23) 花田章. (1985). 家畜繁殖誌, 哺乳動物における体外受精の諸問題 31 ; 5 : 56-61.
- 24) Kajihara Y, Goto K, Kusaka S. et al. (1987). In vitro fertilization of bovine follicular oocytes and their development up to hatched blastocysts in vitro. *Jpn J Anim Reprod.* 33 ; 173-180.
- 25) Fukuda Y, Ichikawa M, Kubo K. et al. (1987). Development to the blastocysts of bovine oocytes that matured and fertilized in vitro. *Proc 79th Ann Meet. Jpn Soc Zootech Sci* pp 18 (Abstr) (in Japanese).
- 26) 堀内俊孝, 高田直和, 沼辺孝他. (1988). 卵丘細胞層との共培養による牛体外成熟・体外受精卵の体外発生と受胎例について. *哺乳卵研誌.* 5 ; 2 : 134-135.
- 27) 高田直和, 塚本章夫, 黒川洋介他. (1989). 卵丘細胞の接触の有無がウシ体外受精卵の発育に及ぼす影響. 第82回日本畜産学会大会講演要旨. 24.
- 28) Numabe T, Oikawa T, Kikuchi T. et al. (2000). Birth weight and birth rate of heavy calves conceived by transfer of in vitro or in vivo produced bovine embryos. *Animal Reproduction Science.* 64 ; 13-20.
- 29) 安部茂樹, 塩谷康生. (1993). 牛卵巣の輸送温度が体外成熟・体外受精卵の胚発生へ及ぼす影響. *日本畜産学会報.* 64 ; 32-37.
- 30) 塩谷康生, 桑山正成, 上田修二他. (1988). 屠場で吸引採取したウシ未成熟卵の体外受精後の発生能. *家畜繁殖誌.* 34 ; 39-44.
- 31) Yang NS, Lu KH, Gordon I. (1990). In vitro fertilization (IVF) and culture (IVC) of bovine oocytes from stored ovaries. *Theriogenology.* 33 ; 352 (Abstr).
- 32) 佐藤秀俊, 高田直和, 劉積鳳他. (1995). ウシ未成熟卵の輸送方法の検討. *東北畜産学会誌.* 45 ; 3 : 98-102.
- 33) Takada N, Ohisa N, Numabe T. et al. (1990). Conception rate after transfer of Japanese Black cattle embryos produced in vitro. *The Veterinary Record.* June ; 126 : 581-582.
- 34) 高田直和, 塚本章夫, 黒川洋介他. (1991). 牛体外受精卵の発育に及ぼす卵丘細胞の影響. *家畜繁殖誌.* 37 ; 1 : 9-13.
- 35) Takada N, Ohisa N, Numabe T. et al. (1991). Production of twin calves by transfer of embryos produced in vitro. *The Veterinary Record.* March ; 128 : 307.
- 36) 佐藤秀俊, 大久範幸, 高田直和他. (1992). ウシ体外受精卵の発生に及ぼす発生培地に添加された血清の影響. 第114日本獣医学会講演要旨 ; 256.
- 37) 高田直和, 大久範幸, 沼辺孝他. (1990). 宮城県における牛体外受精の取り組みについて. *家畜人工授精.* 99 ; 140 : 25-32.
- 38) 板橋知子, 及川俊徳, 阿部玲佳他. (2012). 効率的な黒毛和種種雄牛造成とその活用法に関する研究. *宮城県畜産試験場試験成績書.* 23-1 ; 34-38.
- 39) Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First NL. (1985). Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm in vitro. *Theriogenology.* 24 ; 537-549.
- 40) Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML. et al. (1986). Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology.* 25 ; 591-600.
- 41) Pang CS, Chan JP, Lu A. (1993). Effect of pentoxifylline on sperm motility and hyperactivation in normozoospermic and normokinetic semen. *Fertil Steril.* 60 ; 336-343.
- 42) Numabe T, Oikawa T, Kikuchi T. et al. (2001). Pentoxifylline improves in vitro fertilization and subsequent development of bovine oocytes. *Theriogenology.* 56 ; 225-233.
- 43) Brackett BG, Oliphant G. (1975). Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol Reprod.* 12 : 260-274.
- 44) 阿部玲佳, 稲葉泰志, Somjai T他. (2012). 種雄牛の違いが性判別精液を用いた体外受精における受精率及び胚発生成績に及ぼす影響. 第27回東日本受精卵移植技術研究大会講演要旨. 24-25.
- 45) Eystone WH, First NL. (1986). A study of the 8- to 16-cell developmental block in bovine embryos cultured in vitro. *Theriogenology.* 25 : 152 (Abstr).
- 46) 佐藤秀俊, 高田直和, 沼辺孝他. (1994). 成長因子がウシ体外受精卵の体外培養に与える影響. 第88回日本畜産学会講演要旨. 190.
- 47) 佐藤秀俊, 高田直和, 及川俊徳他. (1996). 単純合成培地において培養条件がウシ体外受精由来胚の発生に与える影響. *J Mamm Ova Res.* 4 ; 13 : 52-57.
- 48) 佐藤秀俊, 及川俊徳, 沼辺孝他. (1994). 非共培養系 (HECM-1) におけるウシ胚の発育 (血清・成長因子の添加時期の検討). *J Mamm Ova Rec.* 11 : 54.
- 49) 吉村格, 佐藤秀俊, 高田直和他. (1994). 培養液の違いがウシ体外受精由来胚の発生率に及ぼす影響. 第118回日本獣医学会講演要旨. 42.
- 50) 早坂駿哉, 千葉和義, 高田直和他. (2006). Estradiol-Benzozate製剤による卵胞発育制御がウシの生体内卵子吸引成績およびその後の胚発生成績に及ぼす影響. *日本胚移植学雑誌.* 28 ; 3 : 94-109.
- 51) 家畜改良センター. (2007). ウシ生体卵子吸引・体外受精技術マニュアル. 技術マニュアル19.
- 52) 及川俊徳, 沼辺孝, 菊地武 (1999). 改良型経膈プローブを用いた黒毛和種育成牛 (8ヶ月齢) からの成体卵子吸引 (経膈採卵) の検討. 第95回日本畜産学会大会講演要旨. 82.
- 53) 植田郁恵, 阿部玲佳, 早坂駿哉他. (2009). 黒毛和種高齢雌牛における生体内卵子吸引 (OPU) の多数回処理が胚生産と卵巣へ及ぼす影響. *東北畜産学会報.* 59-2 : 29.
- 54) 植田郁恵, 阿部玲佳, 早坂駿哉他. (2011). 乳用育成牛の生体卵子吸引 (OPU) による高能力雌子牛生産の検討. 第26回東日本家畜受精卵移植研究会. 27 ; 16-17.
- 55) Machatkowva M, Jokessova E, Horky F. et al. (2000). Utilization of the growth phase of the first follicular wave for bovine oocyte collection improves blastocyst production. *Theriogenology.* 54 ; 543-550.
- 56) 及川俊徳, 阿部玲佳, 板橋知子他. (2011). FSH投与量及び投与開始時間の違いがOPU-IVF成績に与える影響. 第26回東日本家畜受精卵移植研究会27 ; 36-37.

著者略歴

沼辺 孝 (農学博士)

昭和52年 3月 北里大学 畜産学部 獣医学科
卒業
昭和52年 4月 雪印乳業株式会社 入社
昭和56年 4月 宮城県 入庁
平成27年 4月 宮城県農業振興公社に入社
現在に至る

牛の受精卵移植技術の開発普及を中心に家畜
改良事業に従事