

研 究

生体内卵子吸引 (OPU) 技術によるウシ胚生産に関する研究

及 川 俊 徳

宮城県畜産試験場

I. はじめに

ウシから胚を得る方法として、外因性のホルモン製剤（性腺刺激ホルモン）を投与することで卵巣に多数の排卵可能な卵胞を発育させ（superovulation、SOV）、発情を誘起し人工授精後7日目に胚を得る方法で実施されている。この方法では様々な要因により採胚成績が左右され、採胚成績が不良な牛、いわゆる低胚生産牛の処理方法については解決策が見いだせていない現状がある。

そのほかにウシの胚を得る方法として体外受精技術がある。ウシ体外受精技術は食肉処理場由来卵巣を利用することで急速に発展してきた。食肉処理場と畜された雌牛の卵巣は利用されることなく廃棄されていたが、と畜後数時間であれば卵巣内卵子は生存していることから体外受精による胚生産が可能である。また、大量に採取可能なため多くの機関で研究が実施されてきた。しかし、大量の卵子はまとめて処理されることから卵子側の遺伝情報は不明になってしまう。

もう一つの方法として、ウシ生体から超音波診断装置でモニターしながら卵胞内卵子を採取する生体内卵子吸引（Ovum Pick Up、OPU）技術がある。OPUの適応として、繁殖障害牛¹⁾、妊娠牛²⁾、若い育成牛²⁾からも卵子の採取が可能である。OPUのメリットとしては、短期間の間隔で連続して実施可能なことであり、OPUで作出した胚はSOVと同様に卵子側の遺伝情報は明確である。現在、OPUはSOVに代わる胚生産技術として注目されており、最近ではフィールドでも実施されるようになってきた。実際

に畜産現場での実施には様々な場面が想定されるため多様な研究が必要である。

そこで本研究では、いわゆるSOVの低胚生産牛にOPUを実施することで胚生産性が改善可能か、若い育成牛でOPUを実施することで移植可能胚を得ることができるか検討した。

II. 材料と方法

1. 過剰排卵処理

発情周期の任意の時期に膈内留置型黄体ホルモン製剤（CIDR）を膈内に挿入し、挿入日を0として10日目からFSH製剤（アントリン、共立製薬）を3日間筋肉内投与し、FSH製剤投与3日目にPGF2 α 製剤の筋肉内投与と同時にCIDRを除去し、発情を誘起した。人工授精は発情期に1～2回実施した。胚の回収は人工授精後7日目に定法に従い実施した。

2. 生体内卵子吸引 (OPU)

生体内卵子吸引 (OPU) にはステンレス製の採卵針ガイドを装着した7.5MHzのコンベックス型プローブを接続した超音波診断装置（アロカ、SSD-1200）を使用した。採卵針は17G 60cm採卵針（ミサワ医科工業）を使用し、50mlのコニカルチューブに接続し吸引圧を100mmHgに設定した。コニカルチューブは保温機にて30℃に保持した。フラッシング液はゲンタマイシン（Sigma-Aldrich）添加PBSに10IU/mlヘパリン（Novo Nordisk A/S）を添加し使用した。供試牛を柵場に保定し尾椎硬膜外麻酔を実施し2mm以上の全ての卵胞を穿刺し卵胞液と共

に卵子を吸引採取した。採取卵子は、エムコンフィルターに移し、フラッシング液でよく洗浄し血液を洗い流した。洗浄した卵子をシャーレに移し、実体顕微鏡を用いて卵子を培養液中に集めた。OPUは発情周期の任意の日に1週間以上の間隔で実施した。

3. 体外成熟

OPUにて採取した卵丘細胞卵子複合体 (COCs) の成熟培養は、4 mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma-Aldrich) 添加M199をベースに0.1AU/ml FSH (アントリン、共立製薬)、50ng/ml組み替え型ヒト上皮増殖因子 (EGF, Upstate Biotechnology)、ピルビン酸 (Nacalai Tesque) を添加し、38.5°C、5% CO₂、95%空気の気相下の条件で22時間培養を実施した。

4. 体外受精 (IVF)

精液は當場繋用の黒毛和種雄牛1頭の凍結精液を用いた。凍結精液を38.5°Cの温湯中で融解しスピッツ管に移した。そこに20mMカフェイン添加mTALP液を添加し500g×5分間、2回洗浄した³⁾。精子ペレットは2×10⁷精子/mlとなるように10mMカフェイン添加mTALP液で懸濁し精子浮遊液を作成した⁴⁾。3 mg/ml BSAおよび20IUヘパリン (Novo Nordisk A/S) 添加mTALP液で等量希釈した。体外成熟卵子は100μlの10mMカフェインおよび10IUヘパリン (Novo Nordisk A/S) 添加mTALP液 (1×10⁷精子/ml) ドロップに導入し38.5°C、5%CO₂、95%空気中で6時間培養した。その後ピペッティングにより卵丘細胞を除去し発生培地に移した。

5. 胚培養

修正合成卵管液 (mSOF) に20μl/mlの必須アミノ酸液 (×50, Gibco BRL)、10μl/ml非必須アミノ酸 (×100, Gibco BRL)、1 mMグリシン、2 mM タウリン、ITS supplement (最終濃度5 μg/ml インスリン、5 μg/ml トランスフェリン、5 ng/ml セレン、Sigma-Aldrich)、6 mg/ml fatty acid-free BSA (Sigma-Aldrich) を添加した培地を用いた。50μlドロップのmSOFに10-15個の卵子を導入し38.5°C、5%O₂、90% N₂の条件で培養した。胚の観察は、体外受精

後3日目の卵割および8日目の胚盤胞数について観察した。

6. 受精卵移植

発情後7日目のホルスタイン種受胎牛に常法に従い受精卵移植を実施し、妊娠診断は発情後60日程度で胎膜触診法または超音波診断装置により実施した。

7. 実験計画

(1) 実験Ⅰ：低胚生産牛を用いたOPU-IVP成績の検討

供試牛は4頭 (A~D) を用いた。調査期間については、それぞれ連続した5回の過剰排卵処理成績、ドナーAは994日、ドナーBは1193日、ドナーCは378日、ドナーDは308日であった。

(2) 実験Ⅱ：黒毛和種8ヶ月齢からのOPU-IVP成績の検討

供試牛は8ヶ月齢の黒毛和種育成雌牛を用い4頭 (No.1~4) を用いた。経膈プローブは育成牛用に本体を細く改良したものを用いた。

生産された胚を受胎牛に移植し受胎性を調査した。

8. 統計処理

SOVのデータは一元配置分散分析による実施し、平均値はTukeyの多重検定により実施した。SOVとOPU-IVFのデータはt-検定を実施した。卵割率および胚発生率はカイ二乗検定およびFisher's exact probability testで解析した⁵⁾。統計的有意差判定に用いたP値は5%水準 (P<0.05) とした。

Ⅲ. 結果

1. 実験Ⅰ：低胚生産牛を用いたOPU-IVP成績の検討

表-1には4頭の黒毛和種ドナーのSOVによる採卵成績を示した。平均移植可能胚数は、ドナーA (0.2±0.2) およびドナーB (1.4×0.2) は、ドナーD (9.6×2.9、P<0.05) と比較し有意に低い成績であった。ドナーB (18.9%) の移植可能胚率は、ドナーC (43.8%) およびドナーD (60.0%、

$P < 0.05$) よりも有意に低い成績であった。

表-1 過剰排卵処理成績

ドナー	実験回数	回収総数	移植可能胚数	変性胚数	未受精卵数	正常胚率
A	5	0.6±0.2 ^a	0.2±0.2 ^a	0.0±0.0	0.4±0.2	33.3 ^{ab}
B	5	7.4±1.0 ^{ab}	1.4±0.2 ^a	2.6±0.8	1.6±0.9	18.9 ^a
C	5	9.6±2.2 ^{ab}	4.2±1.7 ^{ab}	1.4±0.5	4.0±2.8	43.8 ^b
D	5	16.0±5.1 ^b	9.6±2.9 ^b	3.2±2.0	3.0±1.4	60.0 ^b

異符号間で有意差あり ($P < 0.05$)
正常胚を移植可能胚とした

2頭の低胚生産牛（ドナー A および B）を選抜し、SOVと比較しOPU-IVFで胚生産性が改善可能か比較検討した。5回の連続した試験において（試験期間は、ドナー A；SOV：1193日、OPU-IVF：70日、ドナー B；SOV：994日、OPU-IVF：84日）、移植可能胚数はOPU-IVFがSOVよりも有意に高い成績であった（ドナー A：0.2 vs.7.3、ドナー B：1.4 vs.4.8、 $P < 0.05$ ）（表-2）。

表-2 SOVおよびOPU-IVF成績の比較

ドナー	方法	実験回数	実験期間	回収総数	採取卵子数	移植可能胚数 (SOV) / 胚盤胞数 (OPU-IVF)
A	SOV	5	1193	0.6±0.2	—	0.2±0.2 ^a
	OPU-IVF	5	70	—	19.3±2.0	7.3±0.9 ^b
B	SOV	5	994	7.4±1.0	—	1.4±0.2 ^a
	OPU-IVF	5	84	—	10.8±1.1	4.8±1.2 ^b

異符号間で有意差あり ($P < 0.05$)
正常胚を移植可能胚とした

2. 実験Ⅱ：黒毛和種8ヶ月齢からのOPU-IVF成績の検討

OPU-IVF成績を表-3に示した。体外受精後8日目に生産された胚盤胞は2～11個であり、胚盤胞率は9.4～28.6%であった。

生産された胚のうち13個を13頭の受胎牛に移植したところ5頭が受胎した。

表-3 8ヶ月齢の黒毛和種育成ウシによるOPU-IVFの胚発生成績

ドナー	実験回数	供試卵子数	卵割胚数 (%)	胚盤胞数 (%)
No.1	4	53	19 (35.8)	2 (9.4)
No.2	4	27	11 (40.7)	2 (11.1)
No.3	4	21	9 (42.9)	5 (28.6)
No.4	4	107	46 (43.0)	11 (15.0)

IV. まとめおよび考察

実験Ⅰでは、4頭の黒毛和種繁殖牛を用い、5回連続のSOV成績について比較したところ、個体により採卵成績が異なることがわかった。4頭のうちドナー A および B を低胚生産牛としてOPU技術を用いることにより胚生産性が改善可能か比較検討した。OPU-IVFはSOVと比較して平均移植可能胚数は2頭とも有意に多い成績であり、これは採卵成績の低いドナーでも卵巣内に卵胞が多数存在すればOPU技術を用いることで胚生産が可能であり、胚生産成績を改善できることを示している。ウシのSOVでは成績が安定せず、受精卵が得られないこともある。外因性のホルモン製剤に対する卵巣反応には個体差があることが知られている。その要因として、性腺刺激ホルモン製剤の種類、ロット、投与方法、投与量、使用する精液、体重や年齢、季節、酸歴や経過日数、栄養管理等が複雑に関連しているためと考えられている^{6~8)}。この方法による採卵成績が不良な牛、いわゆる低胚生産牛の処理方法について解決策が見いだせていない現状があるが、OPU技術を用いることで上記のような問題を解決する一つの方法であると思われた。

また、SOVの場合、次ぎの処理までに60日間のインターバルを必要とするが、OPU-IVFは1週間間隔で実施が可能となる。本研究において、SOVおよびOPU-IVFどちらも5回の試験回数で比較したところ、試験期間はそれぞれ、SOVは2～3年、OPU-IVFは2～3ヶ月であり、OPU-IVFは胚生産効率が高くなることを示唆しており、短期間でより多くの移植可能胚が得られることが明らかになった。

実験Ⅱでは8ヶ月齢の育成雌牛から卵子を採取し体外受精により胚生産可能か検討したところ4頭全てで移植可能胚が得られた。それらの胚を受胎牛に移植したところ受胎が得られたことから、本技術を用いることにより家畜改良の期間短縮によるスピードアップが可能であることが示唆された。また、体系的に未成熟であっても卵巣内卵子は受精する能力を保持していることが明らかとなった。

以上より、OPU技術は胚生産性が低下した牛や育成牛からも胚生産が可能であることから胚生産性の

向上および家畜改良期間の短縮につながる技術であることがわかった。現在、超音波診断装置は持ち運び可能な機器も販売されていることから今後さらにフィールドでも実施される場面が多くなると予想され、本技術による子牛の増頭が期待される。

引用文献

- 1) Looney CR, Lindsey BR, Gonthal CL, et al. (1994) Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows, *Theriogenology*, 41, 67-72.
- 2) Imai K, Tagawa M, Yoshioka H, et al. (2006) The efficiency of embryo production by ovum pick-up and in vitro fertilization in cattle, *J Reprod Dev.*, 52, S19-S29.
- 3) Perreault SD, Barbee RR, Slot VL. (1988) Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes, *Development Biology*, 125, 181-186.
- 4) Numabe T, Oikawa T, Kikuchi T. (2001) Pentoxifylline improves in vitro fertilization and subsequent development of bovine oocytes. *Theriogenology*, 56, 225-233.
- 5) Steel RGD, Torrie JH. (1980) *Principles and Procedures of Statistics*, McGraw-Hill, New York.
- 6) Breuel KF, Baker RD, Butcher RL. (1991) Dailey RA, Lerner SP. Effect of breed, age of donor and dosage of follicle stimulating hormone on the superovulatory response of beef cows, *Theriogenology*, 36, 241-255.
- 7) Kafi M, McGowan MR. (2001) Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle, *Anim Reprod Sci.*, 48, 137-157.
- 8) Mapletoft RJ, Steward KB, Adams GP. (2001) Recent advances in the superovulation in cattle, *Reprod Nutr Dev.*, 42, 601-611.

平成30年度 第70回定時社員総会

日時：平成30年6月1日（金）14時00分～
場所：宮城県獣医師会館 3階大会議室