

ガス発生剤を用いたウシ体外受精の検討

矢島りさ^{1,2)}, 及川俊徳²⁾

1) 宮城県農政部畜産課 2) 宮城県畜産試験場

経膈採卵 (OPU) 技術の普及でウシ体外受精胚の作成が現場で実施される機会が増えている。胚の安定的作出には温度・ガス制御が必須だが、機器の初期投資や維持費がかかる。そこでガス発生剤を用いたガス制御によるウシ胚生産について検討した。体外成熟 (IVM), 体外受精 (IVF) はアネロパックCO₂, 体外発生 (IVC) はアネロパック微好気を使用した。試験区はアネロパック (AP区), ガス制御なし (AIR区), インキュベーター (対照区) の3区とした。実験1はIVM, 実験2はIVF, 実験3はIVCで上記3区を検討した。実験1～3でAP区と対照区の胚発生成績に有意な差はなかった。実験3におけるAIR区では卵割も胚発生も認めなかった。以上よりガス発生剤利用によるガス制御においてウシIVF胚生産が可能であることが明らかになった。

キーワード: ウシ体外受精, ガス発生剤

ウシ体外受精 (IVF) による胚の安定的作出には、インキュベーターによる温度およびガス制御が必須であるが、ガス制御のための窒素ガスや炭酸ガス、CO₂/O₂インキュベーターなど機器の初期投資と維持費が必要となる。また、経膈採卵 (OPU) 技術の普及により現場でもIVFの実施機会は増えているが、IVFは処理工程が多いため専用の施設でのみ実施されており、現場で広く実施可能な技術とはなっていない。そこで、移植可能なIVF胚の生産を現状よりも簡易に実施することを目的として、ガス発生剤を用いたガス制御によるウシIVF胚の作出について検討した。

材料及び方法

(1) 体外受精

食肉処理場で卵巣を採材し洗浄後、2～8 mmの卵胞から未成熟卵子を卵胞液と共に吸引採取した。採取した卵胞液から実体顕微鏡下で卵細胞質が均一で卵丘細胞が付着している卵子を選別し、5%牛胎子血清 (FBS), 50ng/ml 上皮成長因子 (EGF),

0.01AU/ml 卵胞刺激ホルモン (FSH), 0.2mM ピルビン酸ナトリウムを添加したM199培地 (成熟培地) 500 μ lを入れた4 well multi dishに50個ずつ導入して、38.5℃, 5%CO₂条件下で22時間体外成熟培養 (IVM) を行った。

体外受精に用いる精子は、凍結精液を融解しカプフェイン添加TALP液を加え、1,300rpm, 5分間遠心分離後に上清の吸引を2回実施し、精子数2,000万/mlに調整した。卵子はヘパリン添加TALP液の50 μ lドロップへ移し、調整した精液を50 μ l加え、最終精子濃度1,000万/mlとし、38.5℃, 5%CO₂条件下で体外受精を実施した。

体外受精後に卵丘細胞を除去し、6 mg/ml 牛血清アルブミン (BSA) 加修正卵管合成液 (mSOF) を用いて38.5℃, 5%CO₂および5%O₂で体外受精後8日目まで発生培養を行った。

(2) 体外成熟および受精検査

IVM約22時間後に成熟検査、媒精から約17時間後に受精検査を実施した。成熟検査は0.1%ウシ精巢由来ヒアルロニダーゼを用いて卵子周囲の卵丘細胞を完全に剥離した後、25%酢酸エタノールにて固定、

1%アセトオルセインで染色，アセトグリセロールで封入し，位相差顕微鏡で観察した．成熟検査では核相を，受精検査では前核形成を確認した．

(3) 胚の細胞数検査

IVF後8日目に得られた胚盤胞を0.1%Prodium Iodideと25 μ g/ml Hoechst33342を用いて内細胞塊(ICM)と栄養膜細胞(TE)に分離染色を行い，蛍光顕微鏡で観察し，ICMおよびTEの細胞数を計測した．

(4) 試験区

実験はIVM，IVF，体外発生培養(IVC)の各工程をガス制御の異なる3つの試験区に分け，試験区1はアネロパックを入れた専用容器内(AP区)，試験区2は大気条件下(AIR区：ガス制御なし，温度制御のみ)，対照区はCO₂インキュベーターで5%CO₂を設定した．それ以外の工程では3区ともインキュベーターを用いた．AP区におけるガス制御は，実験1のIVMと実験2のIVFはインキュベーターでは5%CO₂条件のためアネロパックCO₂を使用し，実験3のIVCはインキュベーターでは5%CO₂および5%O₂条件のためアネロパック微好気を使用した．

各実験で胚発生成績(卵割率および胚盤胞発生率)と胚盤胞の細胞数を調べた．さらに実験1では体外成熟率，実験2では受精率を調べた．

(5) 統計解析

胚発生成績のパーセンテージのデータは χ^2 乗検

定またはFisherの正確確率検定，細胞数是一元配置分散分析後にTukey-Kramer法により多重検定を行った．統計的な有意差判定に用いたP値は5%未満を有意差ありとした．

成績

実験1はIVMにおけるガス制御について検討した．各区で胚発生成績に有意な差はなかった．胚のTEの細胞数はAIR区68.3 $\pm$ 6.3，対照区84.4 $\pm$ 5.2であり，AIR区では対照区と比べて有意に少ない成績であった(図1)．体外成熟率は各区に有意な差はなかった．

実験2はIVFにおけるガス制御について検討した．卵割率はAIR区56.6%，対照区72.7%であり，AIR区では対照区と比べて有意に低い成績であったが，受精率に有意な差はなかった(図2)．

実験3はIVCにおけるガス制御について検討した．AP区と対照区では胚発生成績や胚の細胞数に有意な差は認めなかったが，AIR区では卵割も胚発生も認められなかった(図3)．

考察

ウシ体外受精胚の作出を現場で広く実施可能とするため，ガス発生剤としてアネロパックを用いたガ

【胚発生成績】

【体外成熟率(MII期卵子数)】

【胚盤胞の細胞数】

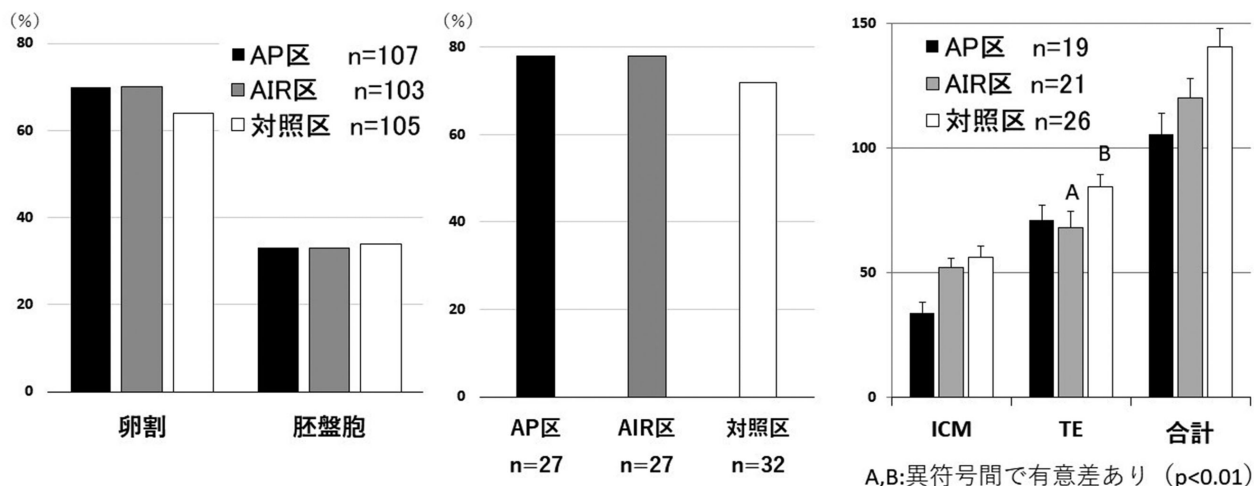
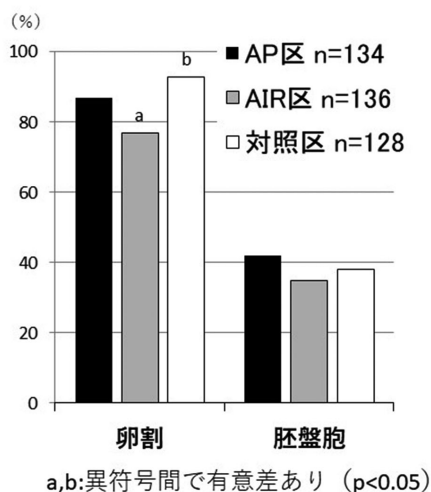
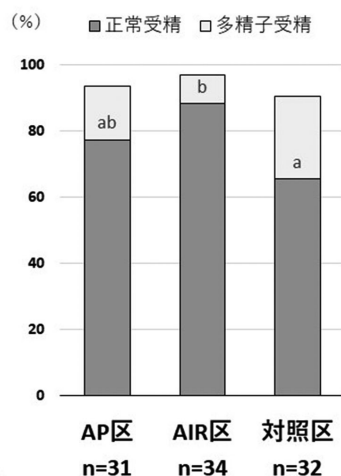


図1 実験1(体外成熟(IVM))における胚発生成績，体外成熟率，胚盤胞の細胞数

【胚発生成績】



【体外受精率】



【胚盤胞の細胞数】

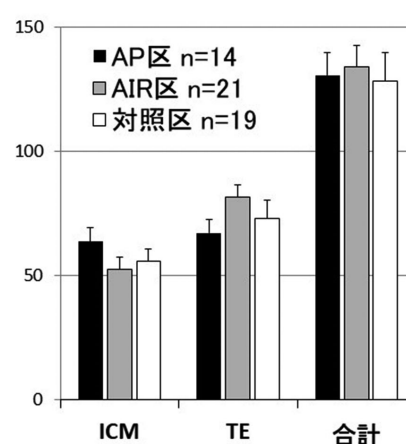
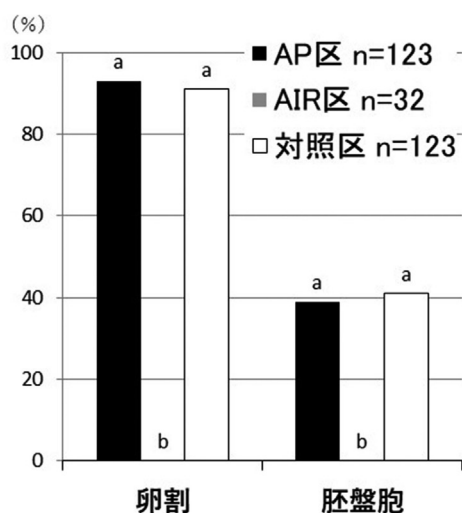


図2 実験2 (体外受精 (IVF)) における胚発生成績, 受精率, 胚盤胞の細胞数

【胚発生成績】



【胚盤胞の細胞数】

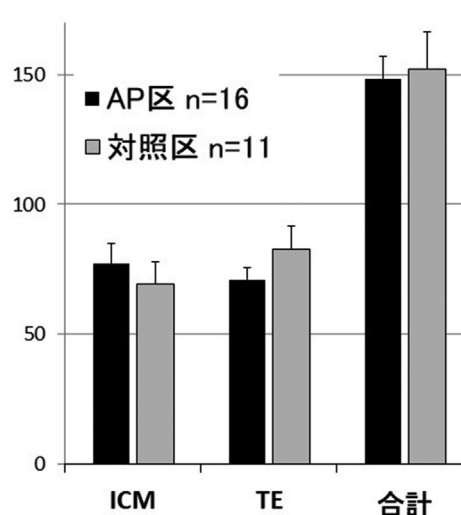


図3 実験3 (体外発生 (IVC)) における胚発生成績, 胚盤胞の細胞数

ス制御について検討した。現在、インキュベーターではIVMとIVFは5%CO₂、IVCは5%CO₂・5%O₂の気相条件で実施していることから、IVMとIVFにはアネロパックCO₂、IVCにはアネロパック微好気を使用した。その結果、IVM・IVF・IVCそれぞれにおいて胚発生成績や胚盤胞の細胞数はAP区と対照区に有意な差はなかったことから、アネロパックを用いることでインキュベーターと同等にウシIVF胚の作出が可能であることが明らかとなった。また、

IVMにアネロパックを用いた場合、胚盤胞の栄養膜細胞数はAIR区で対照区（インキュベーター）よりも少ない成績であったが、内細胞塊および総細胞数には差が認められなかった。IVFにアネロパックを用いた場合、AIR区は対照区よりも有意に低い卵割率を示し、受精検査における正常受精率と逆の結果となっている。これは、受精率は体外受精後17時間での観察、卵割率は体外受精後72時間で実施していることから、卵割観察時は受精率観察時よりもAIR

区において高酸素状態であると考えられ活性酸素による胚への損傷で卵割率が低い成績になったと推察されたが、今回は活性酸素の測定をしていないため今後の課題である。

このように部分的に差を認めたもののIVMおよびIVFにおいてガス制御せずに空気のみでIVF胚を作出することが可能であるという新しい知見が得られた。しかしIVCにおいてAIR区では胚が得られなかった。通常、生体内の酸素分圧は8%程度とされ、とくにIVCのように長期にわたって培養する場合は5%CO₂、5%O₂、90%N₂の気相で培養することで胚発生成績を向上させることが知られており¹⁾、その効果は大きい。また、低酸素の利点は活性酸素の抑制に関係しており、酸化的リン酸化の過程においてミトコンドリアの電子伝達系に生じる活性酸素は強い細胞毒性を持つ。酸素呼吸をする生物種では活性酸素の発生から逃れることができないが、この発生を低く抑制するために通常は大気中のO₂濃度（約20%）を5%に低下させて培養を行っている²⁾。実験3（IVC）のAIR区では卵割の段階で全ての卵

子に変性しており、生体内よりも高いO₂濃度のために胚の発育が途中で停止したためと考えられた。

以上の結果からIVF胚作出における気相のコントロールは非常に重要であることがわかった。このように、IVF胚作出におけるガス制御について新たな知見を得ることができた。ガス発生剤を用いたウシIVF胚の作出は、新たにIVFを始める場合に導入する機材の一部を簡易化することができ、現場で広く実施可能な技術であると期待される。

本研究の一部は一般財団法人畜産ニューテック協会の研究助成事業で実施した。

引用文献

- 1) 長尾 慶和・佐伯 和弘・星 雅樹・永井 政信：ウシ初期胚の体外受精, J Reprod, 41, 29-36 (1995).
- 2) Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A, Watanabe T: Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos, Theriogenology, 62, 1186-1197 (2004)