

学 術

ウシ顕微授精技術の現状および活用方法について

及川 俊徳

宮城県畜産試験場

はじめに

顕微授精（ICSI）は直接卵子内に精子を注入することにより1つの精子で受精可能な技術である（図1）。現在、ヒト生殖補助医療技術（ART）において男性不妊症に臨床応用され、不妊クリニックで実施され健康な赤ちゃんが生まれている。家畜でのこの技術の有効性は、遺伝的あるいは経済的に優れた貴重な精子や性選別精液を活用する場合である。牛では貴重な遺伝資源を持った種雄牛の凍結精液が存在しその価値は大きい。ICSIはそのような精子の有効利用に資することが可能であることから胚生産方法について検討されている。ヒト¹⁾ およびマウス²⁾ ではICSIにより正常な産子の生産が報告されているが、ウシにおいては、鹿児島大学³⁾、家畜改良事業団⁴⁾ において子牛生産が報告されたが継続的な研究になっておらず実用的な技術となっていなかった。そこで我々は、平成9年よりウシICSIの技術開発を開始し、基礎的な研究を繰り返し安定的な胚発生成績が得られるようになり、平成11年に最初の子牛の生産に成功した。その後、現在までに約50頭の産子を得ており継続して子牛を生産してきた。そこで、



図1 顕微授精（ガラスピペットで精子を注入）

これまでに実施した研究で得られた知見を示すと共に今後の研究の方向性について整理した。

ウシ顕微授精技術の問題点

(1) 低い胚発生率

ウシICSIでは胚発生率が低く安定的な技術となっていなかった。ヒトおよびマウスと違いウシではICSI後に胚の発生を促進するための活性化処理が必要である⁵⁾。通常、精子が侵入し受精後すぐに低下するはずの卵成熟促進因子（Maturation promoting factor: MPF）が低下しないことが知られておりICSI後の活性化処理に関する研究が多く、各研究機関で様々な方法で行われている。我々は比較的処理方法が簡単なエタノール処理を選択し実施していたが、さらなる胚発生率の向上を目的にICSI後の活性化処理としてイオノマイシン+ 6-dimethylaminopurine (DMAP) 処理について検討した⁶⁾。

食肉処理場由来の卵巢から卵丘卵子複合体（COCs）を吸引採取した。成熟培養は5%子牛血清添加Medium199を用い、1ウェルあたり50個のCOCsを4well-multiplateに導入し38.5℃、5%CO₂、95%空気の気相下で22時間培養した。

凍結精液を38.5℃の温湯中で融解し10mMカフェイン添加mTALP液を加え1,300rpmで5分間遠心分離による洗浄を2回実施し精子浮遊液を作製した。

成熟培養22時間目に0.1%牛精巣由来ヒアルロニダーゼ中でピペティングにより卵子周囲の卵丘細胞を完全に除去し、第一極体放出卵子を選別し実験に供試した。

顕微授精は、ホフマンモジュレーションを搭載し

た倒立顕微鏡とマイクロマニピレーターおよびPIEZOドライブユニットで実施した。

試験区は、対照区として精子注入後4時間目に7%エタノールで5分間処理するエタノール区、精子注入後すぐに5 μ M イオノマイシンに5分間処理するイオノマイシン区、上記同様5 μ M イオノマイシンで5分間処理し、3時間後に1.9mM ジメチルアミノプリン (DMAP) にて3時間培養するイオノマイシン+DMAP区を設定した。

その結果、エタノール区およびイオノマイシン+DMAP区はイオノマイシン区よりも有意に高い胚盤胞率であった(表1)。また、イオノマイシン+DMAP区は有意な差はないもののエタノール区よりも10%程高い胚盤胞率であった。しかし、胚移植

試験ではイオノマイシン+DMAP区よりもエタノール区で受胎率・子牛生産率が有意に高い結果となった(表2)。ICSIにおける活性化方法を比較する場合は、胚移植を実施し実際に子牛への生産率を確認することで胚の正常性を評価することが重要であると思われた。

(2) ウシ精子核の脱凝縮

ウシ精子は他の動物と比較し容易に脱凝縮が起こらないことが知られている⁷⁾。還元剤であるジチオスレイトール (DTT) で精子を処理することで人為的にジスルフィド (S-S) 結合を脆弱化させICSI (ICSI-DTT) することで胚発生率が改善可能か検討した⁸⁾。

まず、DTT処理による精子への影響を調べるため

表1 活性化処理条件の検討

Activation treatment	Sperm injection	Total number of oocytes injected	Development(%)	
			Cleavage	Blastocyst
Ionomycin	+	132	76(57.6) ^b	24(18.2) ^b
	-	46	4(8.7) ^d	0(0.0) ^c
Ionomycin+DMAP	+	137	115(83.9) ^a	55(40.1) ^a
	-	56	30(53.6) ^b	6(10.7) ^b
Ethanol	+	160	121(75.6) ^a	47(29.4) ^{ab}
	-	53	16(30.2) ^c	6(11.3) ^b
None	+	48	23(47.9) ^b	4(8.3) ^b
	-	53	3(5.7) ^d	0(0.0) ^c

(a-c) Within a column, percentages with different superscripts differ significantly; P<0.05.

表2 顕微授精後の活性化処理条件の違いが受精卵移植成績および分娩成績に及ぼす影響

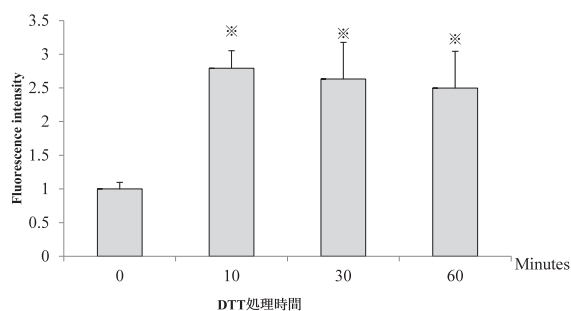
Activation treatment	Single or twin embryo transfer	Number of recipients	Number of embryos transferred	Number (%) of pregnancies			Number (%) of calves
				Total	Delivered	Aborted	
Ionomycin + DMAP	Single	5	5	1	1	0	1*
	Twin	3	6	0	0	0	0*
	Total	8	11	1(12.5) ^a	1(12.5)	0(0)	1(9.2) ^a
Ethanol	Single	15	15	8	1	0	7*
	Twin	2	4	2	0	0	2*
	Total	17	19	10(58.8) ^b	9(52.9)	1(5.9)	9(47.4) ^b

(a,b) Within a column, percentages with different superscripts differ significantly, P<0.05.

*All calves are born as a singleton.

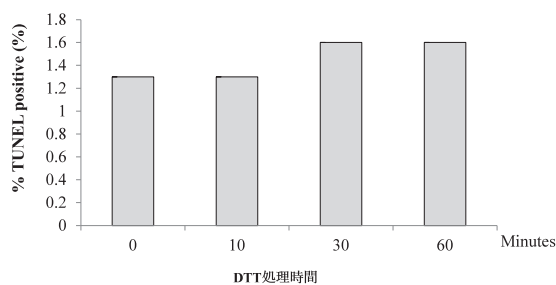
還元型チオールに結合して蛍光を発する monobromobimane (mBB) 染色にてS-S結合切断を調べた。DTT処理後経時的(10, 30, 60分間処理)にmBB染色を実施し蛍光顕微鏡にて観察し、DTT処理しないものと比較検討した。その結果、DTT処理後10分間ですでにS-S結合が切断されていることがわかった(図2)。

次に、精子のアポトーシスについて調べた。In Situ Cell Death Detection Kitを用いterminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assayにより実施した。DTT処理後経時的(10, 30, 60分間処理)にTUNEL assayを実施し蛍光顕微鏡にて観察しDTT処理しないものと比較検討した。精子のアポトーシスはDTT処理時間に影響を及ぼさないことが明らかとなり(図3), mBB染色結果と合わせ、精子のDTT処理時間は10分間で効果が得られることが示された。



ジチオスレイトール (DTT) 処理時間がウシ精子頭におけるジスルフィド結合の評価。精子頭部のジスルフィド結合は monobromobimane(mBB)で染色し蛍光顕微鏡にて蛍光強度を測定した。平均値±SEM で示し ANOVA にて統計解析し Tukey-Kramer にて多重比較を実施した (*: P < 0.05)。

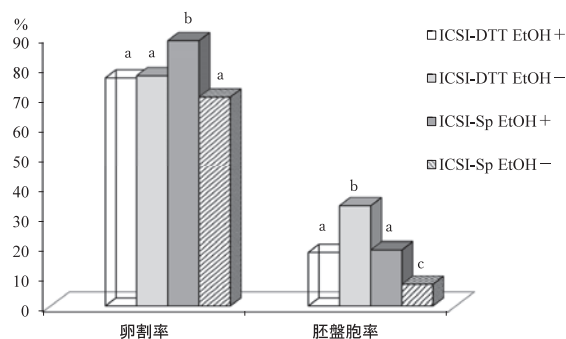
図2 DTT処理時間がウシ精子のジスルフィド結合切断に及ぼす影響



ジチオスレイトール (DTT) 処理時間の違いがウシ精子頭におけるアポトーシスに及ぼす影響を TUNEL 染色し蛍光顕微鏡にて陽性精子数を数え陽性率を算出した。

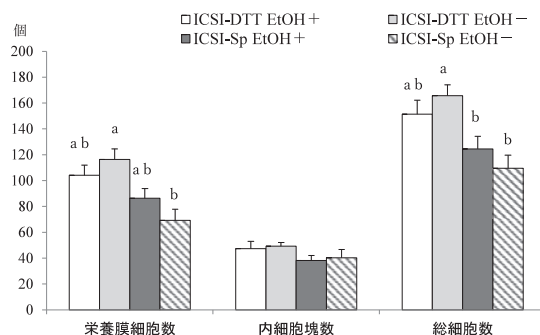
図3 DTT処理時間がウシ精子のアポトーシスに及ぼす影響

食肉処理場由来COCsを用い、DTT処理精子の ICSI後の胚発生成績を検討した。上記試験からDTT処理時間は10分間とした。DTT処理またはDTT処理しない精子をICSIする2区に加えそれぞれエタノール処理する(+)またはしない(-)区を設定し(計4区)その後の胚発生成績について検討した。さらにICSIにより生産された胚盤胞期胚の品質(細胞数が多いものが良質胚)を確認するためICMとTEの分離染色を実施した。その結果、ICSI-DTT-エタノール(-)区で胚発生成績(図4)および胚盤胞の総細胞数と栄養膜細胞数が多い成績であった(図5)。従って、ICSI-DTTにより生産された胚は良質



顕微授精後の胚発生成績を以下の4区にて比較した。
DTT 処理精子を顕微授精しエタノール処理: ICSI-DTT EtOH+
DTT 処理精子を顕微授精しエタノール未処理: ICSI-DTT EtOH-
DTT 未処理精子を顕微授精しエタノール処理: ICSI-Sp EtOH+
DTT 未処理精子を顕微授精しエタノール未処理: ICSI-Sp EtOH-
異符号間で有意差あり (a, b, c: p < 0.05)

図4 精子処理および活性化処理が顕微授精後の胚発生成績に及ぼす影響



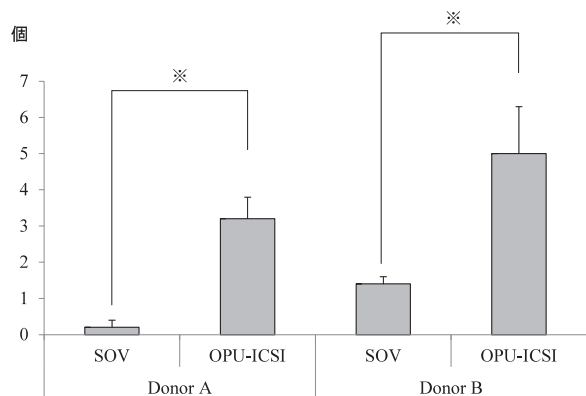
以下の4区にて生産された胚の細胞数を比較した。
DTT 処理精子を顕微授精しエタノール処理: ICSI-DTT EtOH+
DTT 処理精子を顕微授精しエタノール未処理: ICSI-DTT EtOH-
DTT 未処理精子を顕微授精しエタノール処理: ICSI-Sp EtOH+
DTT 未処理精子を顕微授精しエタノール未処理: ICSI-Sp EtOH-
平均値±標準誤差
異符号間で有意差あり (a, b: p < 0.05)

図5 精子処理および活性化処理方法の違いが顕微授精により生産された胚盤胞の細胞数に及ぼす影響

胚であること、DTT処理精子をICSIした場合、活性化処理は必要なが示唆された。

ウシ顕微授精技術の活用方法

ウシICSIの活用方法として胚生産を目的としたドナー牛における胚生産性の改善について検討した。過剰排卵誘起 (SOV) 処理での採胚成績の低いドナー牛において生体内卵子吸引 (OPU) で卵子を採取し、ICSI (OPU-ICSI) 技術を用いることで胚生産性が改善可能か検討した。OPU-ICSIを用いることで胚生産性が改善できることが明らかとなった (図6)。4頭の黒毛和種ドナー牛 (A-D) について連続5回の採胚成績を検討したところ2頭で移植可能胚数が2個以下のドナーがいたことからその2頭を低胚生産牛として選抜しOPU-ICSIに供試した。その結果、2頭ともにOPU-ICSIで移植可能胚は有意に多い成績であった。従って、SOVにおいて採胚成績が低いドナーでは、卵巢内に卵胞が存在すればOPU技術で卵子の採取が可能となり、ICSI技術を応用することで胚生産性が改善されることが示唆された。



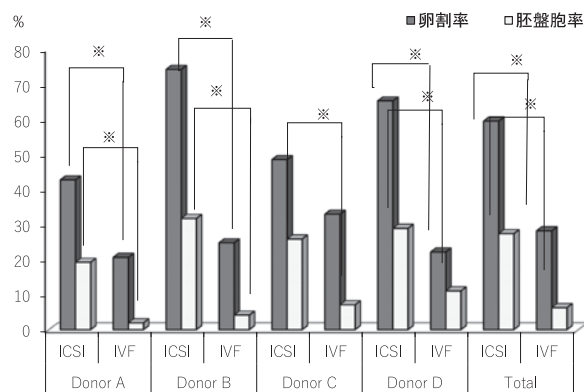
平均値 ± 標準誤差

※有意差あり (p < 0.05)

図6 過剰排卵処理 (SOV) 成績の低い2頭のドナーにおける経膈採卵一顕微授精 (OPU-ICSI) による移植可能胚数の比較

しかし、OPUを用いても胚生産性が低い個体が散見されることから、OPU-IVFにおける低胚生産牛4頭に対してICSI-DTT (OPU-ICSI-DTT) を応用することで胚生産性が改善可能か検討した。その結果、

全てのドナーでOPU-IVFよりもOPU-ICSI-DTTで有意に高い胚盤胞率が得られた (図7)。胚の移植試験を実施したところ、受胎率および子牛生産率は通常のIVFおよびICSIと同程度であり5頭の正常な産子を得ることができた。



※有意差あり (p < 0.05)

図7 経膈採卵での胚発生成績の低い4頭のドナーにおけるDTT処理精子一顕微授精成績の検討

以上のことから、SOVやOPU-IVFで胚生産性の低いドナー牛から胚を生産したい場合には、ICSI技術を用いることで胚発生成績は改善し、その後の胚移植により正常な産子の生産が可能になった。さらに、ICSIのように卵子の活性化および精子の処理条件を検討する試験の場合、実際に生産された胚を移植し産子への生産性を確認することで正確な評価が可能であると考えられた。

新たなウシ精子保存方法の検討

現在、ウシ精子の新たな保存法としてフリーズドライを応用した胚生産および子牛生産を検討している。1952年にイギリスのPolgeとRowsonによる耐凍剤としてのグリセリンの発見を皮切りに、今日では多くの国で“凍結保存”精液を用いた人工授精によって行われている。凍結精液は-196℃の液体窒素が満たされた容器中で保存されているが、凍結状態を維持するためには液体窒素を定期的に補充する必要がある。コストやスペースが恒常的に必要なこと、輸送が容易ではない、取り扱いには人体への安全面に留意が必要なこと、液体窒素生産にかかる環

境負荷が発生する、など様々な欠点がある。また、我が国では近年、地震や温暖化を起因とする気候変動による自然災害が多発しており、液体窒素および電力の供給が絶たれた時には貴重な家畜の遺伝資源が損失する恐れもある。さらに世界に目を向けると、国際連合食糧農業機関 (FAO) は「食料・農業のための世界動物遺伝資源白書第2回報告」(2016)において、世界中で地域の特徴的な家畜品種の遺伝資源が失われていることに警鐘を鳴らしている。特に、液体窒素の供給が十分ではない発展途上国において、環境への適応力と新たな感染症への抵抗力を持つ品種の保全対策は喫緊の課題である。以上のことを背景に、家畜の確実な遺伝資源保護のための新たな保存技術の開発が望まれている。

そこで我々が注目したのが「凍結乾燥 (フリーズドライ) 技術」である。フリーズドライは、インスタントコーヒーに代表される食品や医薬品の安定的保存技術として身近に利用されているが、哺乳動物では主に精子の保存技術として研究されてきた。その結果、これまでにフリーズドライ精子由来の産子が、マウス⁹⁾、ラット¹⁰⁾、ハムスター¹¹⁾、ウサギ¹²⁾などの実験動物で誕生している。近年ではウマ¹³⁾において産子生産に成功しているが、ウシ、ブタ、ヒツジなどのウマ以外の主要な家畜では胚の作出までしか報告されていない^{14~16)}。そこで我々は、これまで世界で成功していないフリーズドライ精子を用いた子牛の生産を目指し、研究を実施した。

フリーズドライされた精子は運動性を失うため、人工授精または体外受精では通常の受精をすることができない。しかし、これまで実験動物およびウマで証明されたように、フリーズドライ後のウシ精子のゲノム自体は保持されている。そこで我々が継続的に研究してきた「顕微授精」技術が適応される。上記で説明したように我々は、フリーズドライ精子を用いる研究に先駆けてウシの顕微授精技術の基礎研究についての検討を重ねており、現在までに安定した胚生産および子牛生産が可能な技術にまで改良を行ってきた。

今回、高知大学農林海洋科学部松川和嗣准教授との共同研究により、ウシ精子のフリーズドライ方法を改良することで高い生産効率の胚生産方法を開発

した。10頭の受胎牛に受精卵移植したところ2頭が受胎し、令和2年4月に世界で初めて産子の生産に成功した (図8)。もう1頭は5月に生まれたが死産だった。



図8 世界で初めて誕生したフリーズドライ精子による子牛 (生後4ヶ月齢)

おわりに

顕微授精技術はヒトやマウスでは精子を注入するだけで胚発生が可能であるがウシの場合それだけでは移植可能な胚の生産が難しい。それを解決するため様々な研究を実施し一つ一つ解決して安定して子牛生産が可能な技術となったが、解決しなければならない問題はまだまだ多く残されているため今後も継続した試験を実施し、一つずつクリアしていきたい。

このようにして明らかにした成果は、貴重な黒毛和種精子を効率的に利用可能とし、家畜改良または優良種畜の増産に貢献できると考えられ、生産性向上あるいは牛の生殖補助医療に寄与できるものと考えられる。

フリーズドライ精子の研究の一部は科学研究費助成事業により実施した。

参考文献

- 1) Tesarik J, Mendoza C. Using male gamete for assisted reproduction: past, present, and future. J Andol, 24, 317-328 (2003)
- 2) Yanagimachi R. Intracytoplasmic sperm injection experiments using the mouse as a model. Hum Reprod, 13 (Suppl.), 87-98

- (1998)
- 3) Goto K, Kinoshita A, Takuma Y, Ogawa K. Fertilization of bovine oocytes by the injection of immobilized, killed sperm. *Vet Rec*, 127, 517-520 (1990)
 - 4) Hamano K, Li X, Funauchi K, Furudate M, Minato Y. Gender preselection in cattle, with intracytoplasmically injected, flow cytometrically sorted sperm heads. *Biol reprod*, 60, 1194-1197 (1990)
 - 5) Fujinami N, Hosoi Y, Kato H, Matsumoto K, Saeki K, Iritani A. Activation with ethanol improves embryo development of ICSI-derived oocytes by regulation of kinetics of MPF activity. *J Reprod Dev*, 50, 171-178 (2004)
 - 6) Oikawa T, Takada N, Kikuchi T, Numabe T, Takenaka M, Horiuchi T. Evaluation of activation treatments for blastocyst production and birth of viable calves following bovine intracytoplasmic sperm injection. *Anim Reprod Sci*, 86, 187-94 (2005)
 - 7) Perreault SD, Barbee RR, Slot VL. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Development Biology*, 125, 181-186 (1988)
 - 8) Oikawa T, Itahashi T, Numabe T. Improved embryo development in Japanese black cattle by in vitro fertilization using ovum pick-up plus intracytoplasmic sperm injection with dithiothreitol. *J. Reprod. Dev*, 62, 11-16 (2016)
 - 9) Wakayama T, Yanagimachi R. Development of normal nuclei from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nat Biotechnol*, 16, 639-641 (1998)
 - 10) Hochi S, Watanabe K, Kato M, Hirabayashi M. Live rates resulting from injection of oocytes with spermatozoa freeze-dried and stored for one year. *Mol Reprod Dev*, 75, 890-894 (2008)
 - 11) Muneto T, Horiuchi T. Full-term development of hamster embryos produced by injection freeze-dried spermatozoa into oocytes. *J Mammal Ova Res* 28, 32-39 (2011)
 - 12) Liu JL, Kusakabe H, Chang CC, Suzuki H, Schmidt DW, Julian M, et al. Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits. *Biol Reprod*, 70, 1776-81 (2004)
 - 13) Choi YH, Varner DD, Love CC, Hartman DL, Hinrichs K. Production of live foals via intracytoplasmic injection of lyophilized sperm and sperm extract in the horse. *Reproduction*, 142(4), 529-38 (2011)
 - 14) Men NT, Kikuchi K, Nakai M, Fukuda A, Tanihara F, Noguchi J, Kaneko H, Linh NV, Nguyen BX, Nagai T, Tajima A. Effect of trehalose on DNA integrity of freeze-dried boar sperm, fertilization, and embryo development after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*, 80(9), 1033-44 (2013)
 - 15) Palazzese L, Gosálvez J, Anzalone DA, Loi P, Saragusty J. DNA fragmentation in epididymal freeze-dried ram spermatozoa impairs embryo development. *J Reprod Dev*, 64(5), 393-400 (2018)
 - 16) Keskinetepe L, Pacholszyk G, Machnicka A, Norris K, CurukMA, Khan I, Brackett BG. Bovine blastocyst development from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Biol Reprod*, 67, 409-415 (2002)

プロフィール

及川 俊徳（獣医学博士）

平成6年3月 北里大学獣医畜産学部獣医学
科卒業

平成6年4月 宮城県庁に入庁（配属先：宮
城県畜産試験場）

平成14年4月 宮城県仙台家畜保健衛生所

平成20年4月 宮城県東部家畜保健衛生所

平成22年4月 宮城県畜産試験場

～ 現在に至る