

野外で実施した優良牛生産のための経膈生体卵子吸引法の検討

谷村英俊・田中 健・笹木教隆

Examination of Ultrasound-Guided Transvaginal Ovum Pick Up (OPU) to succeeding cows production on field

Hidetoshi TANIMURA, Ken TANAKA and Kiyotaka SASAKI

要 約

酪農家の優良雌系統から後継牛を得る手法として、野外で経膈採卵 (Ovum Pick Up : OPU) を実施し、体外受精 (In vitro Fertilization : IVF) により移植可能胚を作出し、野外における OPU-IVF による胚の生産性を検討した。

1 回の OPU 操作で回収できた卵子数は、平均 10.5 個であり、胚盤胞発生率は 27.2% であった。農家で採卵した未成熟卵子を輸送する培地として 5% 子牛血清 (CS) 加 199 培地と無血清培地を用いた場合、および輸送する容器として小試験管と 2 重ストローで封入した場合を比較した結果、無血清培地を用いた場合は、小試験管、2 重ストロー輸送共に移植可能胚 (胚盤胞期胚) を得られなかったが、5% CS 加 199 培地を用いた場合には、小試験管輸送では 1 個、2 重ストロー輸送では 62 個の移植可能胚を得ることができた。

このことから、野外での OPU で得られた未成熟卵子の輸送には、5% CS 加 199 培地と 2 重ストローを組み合わせた方法が、より多くの移植可能胚が作出できると思われた。

I 緒 言

酪農においては、高能力の牛の血統を受け継ぐ雌牛を確保することが経営上非常に重要である。しかし、高泌乳牛は多量の泌乳という代謝上の負荷を背負っているために、生殖器疾患や乳房炎等の疾病により、高能力牛であっても採卵不能あるいは廃用となることが少なくない。

また、乳用牛は、過剰排卵処理によるホルモン剤の反応が個体毎にばらつきがあり、採取できる時期が限定されるなど受精卵の採取卵数には限界がある。^{2, 3)}

そこで、オランダの Pieterse ら¹⁾ により報告された、生体卵巣からの未成熟卵子を採取する

経膈生体卵子吸引法 (OPU) - 体外受精 (IVF) を優良雌系統からの後継牛づくりの手法として、野外においての未成熟卵子の輸送液、輸送方法および輸送時間について胚盤胞期への発生率に及ぼす影響を比較検討した。

II 材料および方法

1 供試牛

農家のホルスタイン種経産牛 6 頭と当場のホルスタイン種経産牛 2 頭を用い、1 週間あるいは 2 週間間隔で、農家では OPU をのべ 34 回、当場では OPU を 5 回実施した。

2 OPU

超音波診断装置に SSD900SE (FHK)、プローブに 7.5MHz のコンベックス型探触子 (FHK)、採卵針に Covaneedle17G500mm (ミサワ医科工業) を用い、100mmHg の吸引圧で卵子を吸引した。

回収液には、子牛血清を 0.5%、回収チューブ内での血液の凝固を防止するために、ヘパリンを 10IU/mL 添加した乳酸加リンゲルを使用した。

吸引した未成熟卵子は、農家庭先で Emcon フィルターに通し、血液等を洗い流した後、90mm シャーレに移し実体顕微鏡下で卵子を検索した。

回収した卵子については、細胞質の色調、顆粒膜細胞の付着密度によって品質を評価し、A ランク (卵母細胞の細胞質の形態、色調ともに良好で、顆粒膜細胞の付着が密) および B ランク (卵母細胞の細胞質の形態、色調ともに良好で、顆粒膜細胞の付着がやや粗：周囲 1/3 以上覆っている) のものを、約 39°C で保温し農家から約 90 分かけて当场まで輸送した。^{2, 3)}

3 体外受精

20 時間の成熟培養後、成熟卵子を IVF100 培地で洗浄した。精液の洗浄には Percoll 分離法を用いた⁴⁾。

38°C に加温しておいた 90% Percoll 液 (GE Healthcare 社) 3 ml に静かに重層し、2,100 回転/10 分遠沈した。上清を吸引除去後、沈渣に IVF100 培地 (機能性ペプチド研) 6 ml を懸濁し、1,800 回転/5 分で再度洗浄した。上清を除去し、沈渣 10 μ l を 3% NaCl 990 μ l に添加し、精子数を数え、精子濃度を 600 万/ml に調整した後 38.5°C、5% CO₂、5% O₂、90% air で 5 時間媒精した。

4 試験方法

(1) 輸送液と輸送方法の違い

輸送液に 5% CS 加 199 培地と無血清培地 (I VMD101 培地) を用い、輸送方法に小試験管と 2 重ストロー (図 1) を用い、当场で 38.5°C、5% CO₂、5% O₂、90% air で 20 時間成熟培養し、5 時間の媒精後、5% CS 加 199 培地で輸送した未成熟卵子は 1% CS 加 CR 1 a a 培地で、I VMD101 培地で輸

送した未成熟卵子は無血清培地 (I V D101 培地：機能性ペプチド研) で 9 日目まで発生培養し、発生率を比較した。

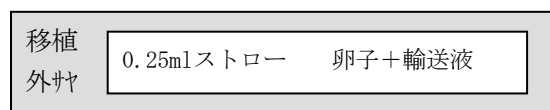


図 1 2 重ストローの模式図

(2) 輸送時間の違い

当场で実施した OPU を輸送時間 0 とし、その他条件は農家 OPU と同様にし、発生率を比較した。

(3) IVF に使用した精液の違い

農家 OPU には、希望する輸入精液 9 種類を用いて胚盤胞期までの発生数を比較した。

III 結果

1 試験 1 :

農家で 34 回の OPU を行い、総回収卵子数は 356 個で 1 回あたりの平均回収卵子数は 10.5 個であった。そのうち培養に供試した A、B ランクのもの 255 個 (71.6%) であった。

卵割数 (率)、胚盤胞発生数 (率) とともに、5% CS 加 199 培地の 2 重ストロー輸送でそれぞれ 147 個 (70.0%)、62 個 (29.5%) が他の方法に比べ高かった。また、試験管輸送では、卵子の紛失が 8 個あった。(表 1)

2 試験 2 :

輸送液に 5% CS 加 199 培地を用いた場合、当场 (輸送時間 0 分) OPU で、8 個 (15.4%)、農家 (約 90 分) で 62 個 (29.5%) の胚盤胞期胚が得られた。(表 2)

3 試験 3 :

農家が希望する輸入精液 9 種類で、IVF を実施し、8 種類で 63 個 (27.2%) の胚盤胞期胚が得られた。しかし、精液の種類によって、胚盤胞発生率にばらつきがみられ、中には全く分

割しないものがあった。(表 3)

表 1 輸送方法の違いによる胚盤胞期までの発生数

方法	輸送液	培養卵子数	分割卵子数 (%)	胚盤胞発生数 (%)
試験管*	無血清培地	9	5 (55.6)	0
2重ストロー	〃	14	9 (64.3)	0
試験管*	5%CS 加 199 培地	22	13 (59.1)	1 (4.5)
2重ストロー	〃	210	147 (70.0)	62 (29.5)
計		255	174 (68.2)	63 (24.7)

*試験管輸送では、未成熟卵子を 8 個紛失

表 2 輸送時間の違いによる胚盤胞期までの発生数

時間	培養卵子数	分割卵子数 (%)	胚盤胞数 (%)
農家 (90 分)	232	160 (69.0)	62 (29.5)
当場 (0 分)	52	33 (63.5)	8 (15.4)

表 3 輸入精液の違いによる胚盤胞数

精液 No	培養卵子数	分割卵子数 (%)	胚盤胞数 (%)
1	14	8	1
2	14	9	1
3	11	6	1
4	28	22	9
5	9	0	0
6	14	1	7
7	25	18	6
8	45	37	14
9	72	59	24
合計	232	160 (69.0)	63 (27.2)

輸送液: 5%CS 加 199 培地、輸送方法: 2重ストロー

IV 考 察

ホルモン製剤などを利用した過剰排卵処理 (SOV) による採胚の報告は多数認められ、成果をあげているが、近年の消費者による「食の安全・安心」志向の高まりや動物用医薬品などへの「ポジティブリスト制度」の導入により、ホルモン製剤を含む各種薬剤の使用には、従来以上の慎重さが求められている。特に乳牛においては、過剰排卵を行う時期が泌乳期にあたる

ため、生乳の出荷が制限され、農家の経済的負担も大きい。

また、大坪らによると、SOV 処理した繁殖障害牛の体内受精卵は、未受精卵が多いと報告している⁵⁾。

そこで今回、高能力でありながら、種々の要因で採卵が不可能な牛や乳房炎等により廃用予定であった牛に対して、OPU-IVF を反復して実施したところ、63 個の移植可能胚を作出することができた。

このことは、OPU-IVF が廃用予定牛からの受精卵作出に有効であることを実証するとともに、後継牛をあきらめていた農家の要望にも応えることができた。

今回、農家で OPU を実施し未成熟卵子を輸送する場合、輸送液には 5%CS 加 199 培地、輸送容器は 2重ストローとする方法が、卵子の紛失や顆粒膜細胞の剥離も少なく、無血清培地で試験管輸送するよりも発生率が良かった。

このことは、輸送の振動等により、試験管輸送では、卵子が管壁等に接触し、それが紛失や顆粒膜細胞の剥離につながって、発生しなかったのではないかと推察される。また、無血清培地による輸送においても胚盤胞まで発生している報告もあり^{6, 7)}、今後例数を増やしていくこ

とが必要であると思われる。

小渕らによると、5種類の輸入精液で胚盤胞を得られていたが⁸⁾、今回、農家の希望する輸入精液でIVFを実施したところ、種類によっては全く卵割を認めないものがあった。

これは、輸入精液の凍結媒液添加物質が多種類におよび、その影響も考えられるため、精液の洗浄方法等の検討が必要であると思われる⁹⁾。また、回収された未成熟卵子数が少ないと、その後の発生率も低くなり、農家が本来希望する優良雌胚の確保が難しいため、少数であっても効率的に胚を作出する培養方法、培養液を検討している。

現在、作出した胚で受胎が6頭確認されたが、今後も新鮮卵同様、保存胚の移植も実施する予定である。

今回のOPUを実施するなかで、発情が弱く、数回の人工授精でも受胎しなかった未経産牛に、数回のOPUを3回実施し、その後の人工授精により受胎が確認された例があった。

また、黒毛和種で、分娩後10日目からOPUを実施し、胚盤胞まで発生している報告もあることから^{10)、11)}、今後のOPU活用法として、分娩後約30日頃から1週間間隔で3回程度OPUを実施した後に、人工授精することで、さらに効率よく胚の確保が期待できるのではないかと考えられる^{6)、9)}

6) 梅木英伸. 経膈採卵一体外受精によるウシ胚生産の取り組み. 日本胚移植学雑誌, 28:36-43. 2004.

7) 轟木淳一ら. 経膈採卵 (OPU) 技術の現場への定着に向けての検討 (講演要旨). 日本胚移植学会誌, 26:45. 2004.

8) 小渕裕子. 乳牛のIVF生産. ETニューズレター, 29:13-17. 2004.

9) 峰 尚美ら. 体外成熟・体外受精・体外発生に伴うウシ卵透明帯の硬度変化について. 第103回日畜大会講演要旨, 109. 2004.

10) 平田統一ら. 人工授精後のウシにおける連続経膈生体卵子吸引法適用の影響. 東北畜産学会報、大会号, 54:37. 2004.

11) 作田直之ら. 産褥期供胚牛からのOPUによる効率的な胚生産. 東日本ET研究会, 22:24-25. 2007.

参考文献

- 1) Pieters, M.C. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. Theriogenology, 30:751-762. 1988.
- 2) 今井敬. ウシの超音波ガイド・経膈生体卵子吸引法と体外受精による胚生産. ETニューズレター, 29:1-7. 2004.
- 3) 今井敬. OPU-IVFによるウシ胚の作出、その効率と汎用性. 日本胚移植学雑誌, 28:29-35. 2004.
- 4) 塩谷康生. 体外受精 (媒精). 家畜人工授精講習会テキスト (家畜体外受精卵移植編), 3版:96-107. 2001.
- 5) 大坪利豪ら. 牛受精卵の農家実証及び関連新技術の実用化試験 (第8報)