

牛の体外受精に関する研究(1)

誌名	島根県立畜産試験場研究報告
ISSN	09146296
著者名	安部,茂樹 三代,英俊 川平,実
発行元	島根県立畜産試験場
巻/号	26号
掲載ページ	p. 83-87
発行年月	1991年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



牛の体外受精に関する研究

第 1 報

県内屠殺牛由来の卵巣内未成熟卵子と黒毛和種凍結精子を用いた体外受精胚作出法とその受胎性

安部茂樹 三代英俊* 川平 実

* 島根県農業指導課浜田専技室

要約 本県屠畜雌牛由来の卵巣内未成熟卵子と県撃養黒毛和種種雄牛の凍結精子を用い、完全体外培養による体外受精胚の作出と、その受胎性並びに卵巣摘出後の経過時間差による分割率および胚盤胞への発生率へ及ぼす影響について検討した。

屠殺牛4頭の卵巣8個から、52個の未成熟卵子を採取し体外受精した。分割率は57.9%であったが、2～3細胞胚の割合が63.6%と高率であった。胚盤胞へ発育した胚は3個(13.6%)得られ、この内の2個を発情後7日目の受胎牛に移植し、単仔の受胎を確認した。

卵巣摘出から未成熟卵子採取までの2.5、5および8時間の経過時間差による分割率は、それぞれ62、66および21.9%であり、2.5および5時間の値には有意差は認めなかったが、8時間の分割率は有意に低下した。また、同様に胚盤胞への発生率はそれぞれ19.9、24.7および2.3%で、2.5および5時間の値には有意差は認めなかったが、8時間の値は有意に低下した。

以上のことから、本県屠畜雌牛由来の未成熟卵子と県内種雄牛の凍結精子による、完全体外培養での体外受精胚の受胎性が確認できた。また、未成熟卵子採取までの経過時間は5時間以内であれば体外受精への影響はないことが判明した。

牛の体外受精は、入谷ら¹¹⁾が初めて体外成熟卵子への精子侵入を認めて以来、牛の体外受精技術および体外受精胚の移植に関する試みは多くの研究者により報告されている^{1, 12, 14, 15, 22)}。

Brackettら⁴⁾は、生体から採取した未成熟卵を体外受精させ、その発育した4細胞を外科的に移植し、初めての産子を得ている。

花田ら⁷⁾は、屠殺牛由来の卵巣から未成熟卵子を採取し、体外成熟および体外受精させることに成功し、さらに、それらの初期胚を家兎卵管内で発育させ、非外科的に移植することにより産子が得られたことを報告している。

一方、梶原ら¹³⁾は、体外受精胚の発生培養を初期受精胚の培養に用いたと同一デイッシュ内において卵丘細胞層上で培養することにより、脱出胚盤胞にまで発育させることに成功したとし、さらに、市川ら¹⁰⁾、後藤ら⁶⁾は屠殺牛由来の卵巣内の未成熟卵の体外受精胚を卵丘細胞と共培養(Co-culture)することにより体外培養のみで発育させた胚盤胞を非外科的に移植し産子を得たと報告している。

このように屠殺牛由来の卵巣内未成熟卵子の体外受精胚は、その移植により産子が得られ正常な仔牛になることが証明されているが、体外受精の方法については報告者により一様ではない。

そこで本研究は、梶原ら¹³⁾の体外受精の方法に準拠し、県内屠殺牛由来の未成熟卵子と県内種雄牛の凍結精液を用い、初期胚の培養に関する技術系を確立し、作出した胚の受胎性について検討した。また、大量の卵巣を採取するためには遠隔地の屠場からの輸送が必要であり、未成熟卵採取までの経過時間が分割率および胚盤胞への発生率に及ぼす影響についても検討を試みた。

材料および方法

1. 卵巣内未成熟卵子の採取

屠殺後摘出した卵巣は、硫酸ストレプトマイシン(硫酸ストレプトマイシン明治1g力価;明治製薬)0.2g/1、ペニシリンGカリウム(結晶ペニシリンGカリウム明治100万単位;明治製薬)20万IU/1を添加した37℃の生理食塩水を満たした魔法瓶に収容し輸送した。

未成熟卵子の採取は、あらかじめ0.5ml修正PBSを吸入した、18Gの針を付けた5ml容量の注射筒で、5

mm以下の小卵胞から吸引した。

供試未成熟卵子には、採取後の形態検査で卵丘細胞層の緊密なものを選別し用いた。

また、供試未成熟卵子は卵巣摘出からの経過時間により、2.5(Ⅰ区)、5(Ⅱ区)および8時間(Ⅲ区)の3区に区分した。

2. 未成熟卵子の成熟培養

吸引採取から媒精までの体外成熟培養液は、25 mM HEPES緩衝TCM-199 (Earle塩:GIBCO社)に、仔牛血清(CS:GIBCO社)を10%、ストレプトマイシン0.1mg/ml、ペニシリン100 IU/mlを加えたものを用いた。未成熟卵子の成熟培養は、流動パラフィン(Mineraloil:SQUIBB)で覆った培養液中に入れ、39℃、5%炭酸ガス、95%空気の条件下で20~24時間培養した。

3. 精子処理

媒精には、県繫養種雄牛の凍結精液を用いた。37℃の瓶温湯中で融解後、精子は牛アルブミン無添加修正タイロッド液³⁾に10 mMカフェイン(Caffeine-Na-benzoate, C-4144:Sigma社)を添加したもの(Caf-BO液)で2回遠沈(500×g、5分)洗浄した。洗浄精子は、Caf-BO液で $3.5\sim 4.0\times 10^7$ /mlの濃度に調整し、これを精子懸濁液とした。次いで精子懸濁液は牛血清アルブミンを20 mg/mlおよびヘパリン(ノボインダストリーA/S)を20 μg/μl添加した修正タイロッド液(BSA-BO液)で等量希釈した後、流動パラフィン下で100 μl小滴にし、39℃、5%炭酸ガス、95%空気の条件下で1時間培養し、受精培地とした。

4. 媒精および発生培養

媒精は、成熟培養20~24時間後に、卵丘細胞が膨潤化した卵子を10~15個ずつ受精培地に移しかえることにより行なった。媒精卵子は6時間後に発生培養液中に移しかえた。

発生培養液は、成熟培養液と同様なものを用いた。発

生培養は、成熟培養で用いたデイシュで卵丘細胞の付着の認められる部位を用いて、分割検査終了時まで成熟培養液と発生培養液を交換し行なった。

分割検査は、媒精72時間後に卵丘細胞層を除去して行なった。また、媒精18~20時間後に一部の卵子を抜き出し、ホルマウント標本を作成後、酢酸オルセインで染色し、位相差顕微鏡で精子の侵入状況を検査した。雌雄前核および精子の尾部が認められたものを受精卵と判定した。

分割検査以後の発生培養は、成熟培養で用いたデイシュで卵丘細胞の付着の認められる部位を用いて、成熟培養液と発生培養液を48時間間隔で交換し行なった。

5. 受胎性の確認

供試胚の作出は、屠殺雌牛4頭の卵巣8個から、卵巣摘出2.5時間後に採取した52個の未成熟卵子を用い、前述の方法によった。供試胚の移植時期は、媒精後8日目に得られた胚盤胞期とした。移植方法は発情後7日目の受胎牛の双角に1個ずつ2個非外科的に行なった。移植液は、20%仔牛血清加修正PBSを用いた。また、移植胚と同時に胚盤胞まで发育した胚は同一デイシュ内で培養を継続した。

妊娠診断は、移植後50日目に超音波画像診断装置を用い行なった。

6. 統計処理

Ⅰ、ⅡおよびⅢ区のそれぞれの分割率および胚への発生率の有意差の検定は、 χ^2 検定法により行なった。

成 績

1. 胚の作出と受胎成績

受胎性確認のための体外受精胚の作出成績は表1に示した。

成熟卵子の受精確認は、雌性・雄性前核の存在および精子の侵入確認により行なった。(写真1、2)

分割率は42.3%であったが、細胞数の少ない2~3細胞胚の割合は63.6%と高率であった。

表-1 移植胚作出成績

供試卵巣数	供試未成熟 卵子数★	初期胚数(%)			分割率 (%)	胚盤胞数 (%)
		2-3細胞	4-7細胞	8(細胞)		
8	52	14 (63.6)	4 (18.2)	4 (18.2)	42.3	3 (13.6)

★卵巣摘出後の未成熟卵子採取までの経過時間:2.5時間

表-2 未成熟卵子採取までの経過時間と分割率

区分★	試験回数	供試卵子数	初期胚数 (%)			分割率 (%)
			2細胞	3細胞	4-7細胞	
I	9	388	100 ^b (39.1)	98 (38.3)	58 (22.7)	66.0 ^x
II	5	313	65 ^b (33.5)	68 (35.1)	61 (31.4)	62.0 ^x
III	5	192	25 ^a (59.5)	11 (26.2)	6 (14.3)	21.9 ^y

★区分 I, II, III: 未成熟卵子採取までの経過時間 2.5、5、8 時間異符号間に有意差: x, y (P < 0.01)
a, b (P < 0.05)

胚盤胞に発生したものは3個(13.6%)であり、このうちの2個を移植し、単仔の受胎を確認した。(写真3)他の1個は培養を継続し、媒精後9日目に脱出胚盤胞への発育を確認した。(写真4)

胚盤胞への発生率

経過時間差と分割率については表2に示すように、各区の分割率は、I区では66.0%、II区では62.0%そしてIII区では21.9%であった。このうち最低率を示したIII区の値はI区およびII区の値との間に有意差(P<0.01)

2. 未成熟卵子採取までの経過時間差と分割率および

表-3 未成熟卵子採取までの経過時間と胚盤胞への発生率

区分★	試験回数	供試胚数	胚盤胞数	発生率
I	9	256	51	19.9 ^x
II	5	194	48	24.7 ^x
III	5	42	1	2.4 ^y

★区分 I, II, III: 未成熟卵子採取までの経過時間 2.5、5、8 時間異符号間に有意差: x, y (P < 0.01)

が認められた。

また、分割検査でIII区の成績は、分割細胞数の少ない2~3細胞の割合がI区と2区の値より59.5%と高率であったが、分割細胞数8細胞以上では14.3%と低率であった。

胚盤胞への発生率については表3に示した。

胚盤胞への発生率はI区では19.9%、II区では24.7%、III区では2.4%で分割率の場合と同様に、I区とII区の値には有意差は認められなかったが、III区とI区およびII区の値には有意差(P < 0.05)が認められ、胚盤胞への発生率も低率であった。

考 察

従来、牛の完全体外培養による胚の作出は、8細胞胚前後で発生が停止する(2, 4, 8, 19, 20)ことから困難であ

るとされていたが、梶原ら¹³⁾は、卵丘細胞層上で初期胚の発生培養を行えば完全体外培養系で移植可能な胚盤胞が得られることを示した。この梶原らの方法は精子の受精能獲得誘起の処理法を、カフェインを含むBO液で2~3時間前培養を行なうものである。一方、Parrish¹⁷⁾は、ヘパリン処理精子を用いれば前培養を行わず81%の受精率が得られること、また、近松⁵⁾らは、swimup+ヘパリン法を用いて80%以上の受精率が得られることをそれぞれ報告している。

今回の方法は、梶原らとは精子処理方法において受精能獲得誘起にヘパリンを用いた点が異なるが、県内屠畜雌牛由来の卵巣内未成熟卵および県内黒毛和種雄牛の凍結精子を用い、移植可能な胚盤胞を完全体外培養で作出でき、さらに、その胚の受胎性も確認することができた。

卵巣摘出から未成熟卵の採取までの経過時間が卵子の体外受精後の発生能に及ぼす影響について、塩谷ら¹⁸⁾は、採卵を卵巣摘出直後の屠場採卵区と3時間後の実験室採卵区とを比較し、2細胞期以上の発生率は輸送温度の低下および卵巣自体の死後変化の少ない屠場採卵区が優れていたが、胚盤胞への発生率には差が認められなかったと報告している。また、塚本²¹⁾も同様に輸送温度に低下を認めなかった23℃輸送区で6時間の輸送時間をかけても胚盤胞への発生率に差を認めなかったとしている。本試験の成績でも同様に、卵巣摘出から5時間以内のⅠ区とⅡ区との間の分割率および胚盤胞への発生率には有意な差を認めなかった。

未成熟卵子の成熟時間について、塩谷ら¹⁸⁾は、15～20時間までの各時間ごとの成熟分裂の確認から、20時間で第2成熟分裂中期の卵子が67%と順調であったことから、体外成熟時間は22時間あれば充分であると報告している。同様に梶原ら¹³⁾は、成熟時間を20、22および24時間の3区について比較し、2～4細胞期への発生率は22および24時間区が高率であるが、8細胞期から桑実胚以上の発育率は3区とも差がなく、胚盤胞への発育率は20時間区が24時間区に比べ高率であったとし、これは初期胚の発生で8細胞胚のほとんどが桑実胚に発育することによるとしている。本試験のⅠおよびⅡ区の成績でも同様の傾向が認められ、分割検査時に8細胞胚以上の発育を示したものはほとんどのものが胚盤胞に発育した。

一方、卵巣摘出から卵子の成熟培養操作までに8時間を要したⅢ区においては、Ⅰ区およびⅡ区に比べ分割率および胚盤胞への発生率が有意に低率で、さらに、2～4細胞胚への発生率に比べ8細胞胚以上への発生率は極めて低率であった。このことは、均等分割2細胞および4細胞胚には核に異常が多く以後の発育率が低下すること¹⁶⁾および成熟時間が長くなれば2～4細胞胚の出現率が高くなる⁹⁾ことから、卵巣の死後変化による卵細胞卵子の変性および輸送時間を含めた成熟時間が長かったことによるものと思われた。

従って、本試験条件下での屠畜雌牛の卵巣から未成熟卵子の採取までの許容時間は、分割率および胚盤胞への発生率ともに良好な成績を得た、卵巣摘出後5時間まで

は可能と思われた。

引用文献

- 1) 青柳敬人ら、Jap.J.Anim.Reprod.,33:209—211 1987
- 2) Bondioli K.R.,et al.,J.Anim.Sci.,57:1001—1005,1983
- 3) Brackett B.G.,et al.,Biol.Reprod.,12:260—274 1975
- 4) Brackett B.G.,Biol.Reprod.,27:147—158,1982
- 5) 近松典子ら、Jap.J.Anim.Reprod.,35:154—158, 1989
- 6) Goto K.,et al.,Theriogenology,29:251,1988
- 7) 花田 章、計測と制御、24:953—958,1985
- 8) 花田 章、Jap.J.Anim.Reprod.,31:56p—61p, 1985
- 9) 湊 芳明ら、家畜繁殖学会第70回大会講演要旨
- 10) 市川優樹ら、62年度秋季家畜繁殖学会講演要旨
- 11) Iritani A.,et al.,J.Reprod.Fert.,50:119—121, 1977
- 12) Iwasaki S.,et al.,Jap.J.Anim.Reprod.,33:188—192,1987
- 13) 梶原 豊ら、Jap.J.Anim.Reprod.,33:173—180,1987
- 14) 梶原 豊ら、Jap.J.Anim.Reprod.,34:191—198,1988
- 15) 桑山正成ら、Jap.J.Anim.Reprod.,35:1—6, 1989
- 16) 南橋 昭ら、家畜繁殖学会第70回大会講演要旨
- 17) Parrish J.J.,et al.,Theriogenology,24:537—549,1985
- 18) 塩谷康生ら、Jap.J.Anim.Reprod.,34:39—44, 1988
- 19) Sirard M.R.,et al.,J.Reprod.Fert.,75:551—556,1985
- 20) 菅原七郎ら、Jap.J.Anim.Reprod.,31:62p—67p, 1985
- 21) 塚本章夫、岡山和試研究報告、40:14—19,1989
- 22) 上田修二ら、Jap.J.Anim.Reprod.,34:56—60, 1988

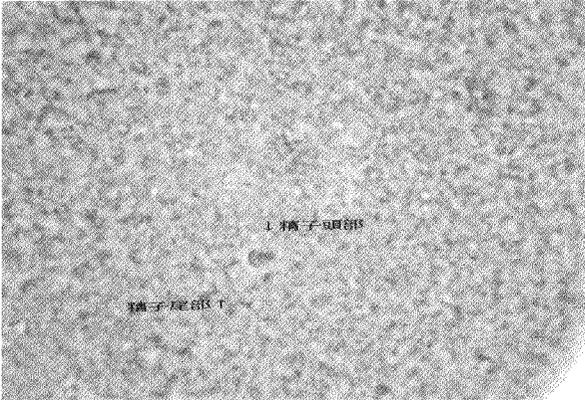


写真1：媒精後8時間経過し卵子内に侵入した精子

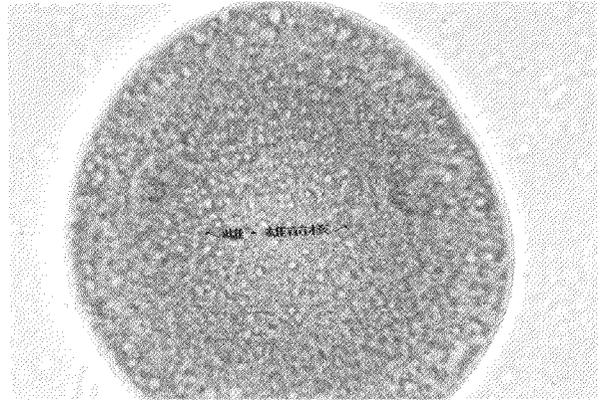


写真2：媒精後18時間経過し雌・雄前核を形成した受精卵

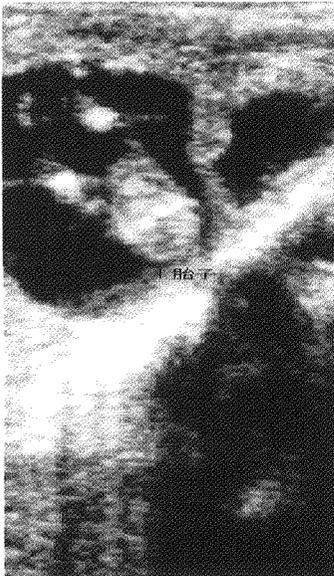


写真3：移植後60日経過し超音波画像診断装置により確認した胎子

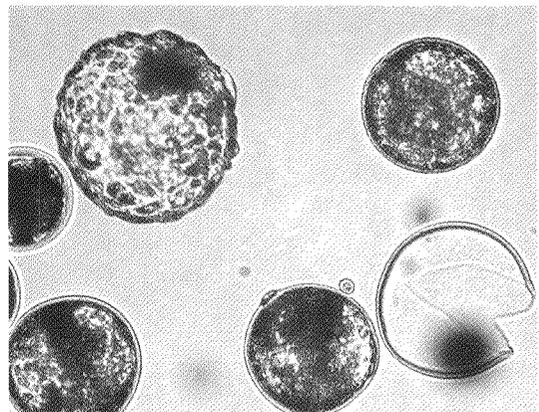


写真4：媒精後発生培養9日目の脱出胚盤胞