

牛の体外受精に関する研究(3)

誌名	島根県立畜産試験場研究報告
ISSN	09146296
著者名	安部,茂樹 長谷川,清寿 川平,実
発行元	島根県立畜産試験場
巻/号	28号
掲載ページ	p. 1-5
発行年月	1993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3報) 牛卵巣の輸送温度が体外成熟・体外受精卵子の胚盤胞発生へ及ぼす影響

安部茂樹・長谷川清寿・川平 実

要約 食肉処理場からの卵巣輸送温度が、完全体外培養系による体外受精での卵割率および胚盤胞への発生率に及ぼす影響について調べた。

卵巣の輸送温度は、4℃区、10℃区および20℃区の3区とし、それぞれの区に38℃の対照区を設定し、生理食塩水を満たした容器で輸送した。輸送した卵巣から卵胞卵子を採取し、緊密に卵丘細胞が付着した卵子のみを選抜し、20～22時間の成熟培養の後、ヘパリン処理精子で媒精した。卵巣採取から卵胞卵子の吸引採取までに要した時間は、2～4時間であった。卵割検査は媒精72時間後に行ない、2～16細胞に分割した初期胚は以後3～7日間発生培養した。

2細胞以上への卵割率は、20℃区(74.3%, 409/550)と対照区(68.7%, 368/536)との間に差はなかったが、4℃区(12.1%, 103/851)および10℃区(16.3%, 69/423)では対照区(66.1%, 530/802)および74.5%, 266/357)に比較し有意に低下した($P < 0.01$)。同様に、媒精後7～11日目の胚盤胞への発生率においても、20℃区(16.2%, 89/550)と対照区(14.5%, 78/536)との間には差はなかったが、4℃区(0.9%, 8/851)および10℃区(2.0%, 8/423)とそれぞれの対照区(15.7%, 126/802)および21.6%, 77/357)の間には有意な差($P < 0.01$)が認められた。

以上のことから、20℃での卵巣輸送は、少なくとも4時間までは胚発生に悪影響を与えないが、10℃および4℃での輸送は、胚発生率を著しく低下させることが明かとなった。

牛の体外受精に用いる卵胞卵子採取は、屠畜後直ちに採取するのが理想的であるが、卵胞卵子採取は、摘出した卵巣を食肉処理場から実験室まで38℃の生理食塩水に入れ輸送した後行うのが一般的である。

しかし、卵巣の輸送条件が卵胞卵子の体外での成熟率および受精後の胚の発生率に及ぼす影響についての報告^{1,2)}は少なく必ずしも明らかにされてはいない。

そこで、今回我々は、4℃、10℃および20℃での卵巣輸送温度が完全体外培養系による体外受精における卵割率および胚盤胞への発生率に及ぼす影響について調べた。

材料および方法

供試卵巣および卵巣輸送温度

供試卵巣はホルスタイン種 339頭から摘出し、摘出時に2群に分け、1群は各設定温度区(4、10および20℃)に、他の1群は対照区とし38℃の抗生物質(ペニシリン100IU/ml、ストレプトマイシン100μg/ml 明治製薬)を加えた生理食塩水を用い、それぞれ輸送した。

供試卵胞卵子は、これらの卵巣から採取した4460個を用いた。

卵胞卵子の採取および体外成熟

卵胞卵子の採取は、小匙による掻き取法および18Gの針を付けた5mlの注射器による吸引法に

より、卵巣表面の5mm以下の小卵胞から、3mg/mlの牛アルブミン、1μl/mlのヘパリンおよび抗生物質を加えた修正磷酸緩衝液中に採取した。

体外成熟培養は既報¹³⁾に従ったが、供試卵胞卵子は、採取後の形態観察により緊密に卵丘細胞が付着している卵子を選抜した。

精子処理と媒精

精子は1頭の黒毛和種の凍結精液を用いた。精子処理および媒精方法は既報¹⁵⁾に準じ、10mMカフェインを添加したBO液⁹⁾で2回洗浄後、精子濃度が 10×10^6 精子/mlに調整し、牛アルブミンおよびヘパリンを含む修正BO液で等倍に希釈し、受精培地とした。媒精は、成熟培養20~22時間後の卵子を30ないし40個ずつ受精培地に導入することにより行なった。

発生培養

発生培養は、媒精6時間後の卵子を発生培養液(25mMHEPS緩衝TCM199に非働化子牛血清10%および抗生物質を添加)を流動パラフィンで覆った100μlの小滴の中に15ないし20個移し替え行

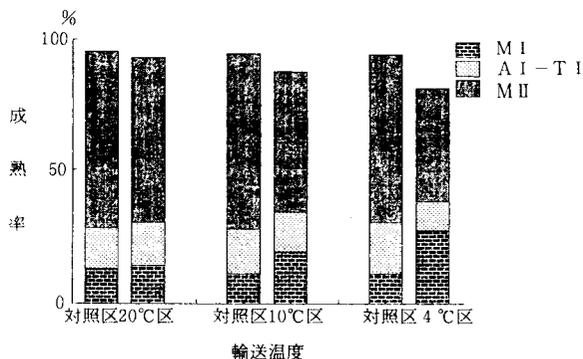


図-1 各温度区の成熟率

なった。

卵子の一部を成熟培養20時間および媒精9-10時間後に抜き取り、ホルマウント標本を作成後、酢酸オルセインで染色し、位相差顕微鏡で成熟分裂および精子の侵入状況を調べた。

卵割検査は、媒精72時間後、胚発生検査は、媒精日を1日とし媒精6~11日後まで24時間間隔で行なった。

統計処理

成熟率、受精率、卵割率および胚発生率の有意

表-1 各温度区の体外成熟卵子を用いた体外受精後の受精率の比較

区 分	供試卵数	受 精 卵 子 数		多精子受精卵子の平均精子数
		単精子受精卵数	多精子受精卵数	
4°C区	81	5 (6.2)	76 ^a (93.8)	5.0±2.9 ^a
対照区 (38°C)	65	21 (32.3)	44 ^b (67.7)	3.8±2.7 ^b
10°C区	25	6 (24.0)	19 (76.0)	5.5±2.7 ^a
対照区 (38°C)	30	14 (46.7)	16 (53.3)	3.1±0.9 ^c
20°C区	46	28 (63.6)	16 (36.4)	3.7±2.9
対照区 (38°C)	48	27 (61.4)	17 (38.6)	3.0±1.5

異符号間に有意差 (a, b P<0.05, a, c P<0.01)

差検定は、 χ^2 検定法により行なった。

成 績

卵巣輸送温度と卵子の成熟率の関係については図1に示した。体外成熟培養20~22時間後の、第1成熟分裂期から第2成熟分裂中期までのステージの割合において、20℃と対照区のMIIへの成熟率は62.8%(27/43)および67.5%(31/46)であり差は認められなかった、しかし、10℃では53.1%(17/32)および4℃では48.7%(38/78)と低温になるに伴い成熟率は低下する傾向が認められたが、対照区の値との間には有意差は認められなかった。

卵巣輸送温度と媒精9~10時間後の受精率については表1に示した。各温度区の受精率は91.7~100%と高率であったが、単精子受精率は、20および10℃区では63.6%(28/46)および24.0%(6/25)であり、対照区61.4%(27/48)、46.7%(14/30)との間に差は認められなかったが、4℃区では6.2%(5/81)で対照区の32.3%(21/65)に比べ著しく低率($P<0.01$)であった。

一方、4℃区の高精子受精は、93.8%(76/81)で対照区の67.7%(44/65)に比べ高率($P<0.01$)であった。

多精子受精卵子1個当たりの侵入精子数は、20℃区では 3.7 ± 2.9 であり、対照区の 3.0 ± 1.5 との間に差は認められなかったが、4℃および10℃区では 5.0 ± 2.9 および 5.5 ± 2.7 で、対照区の 3.8 ± 2.7 および 3.1 ± 0.9 であり、侵入精子数が明らかに増加する($P<0.01$, $P<0.05$)傾向が認められた。

媒精72時間後の2細胞以上への卵割率については図2に示した。

媒精72時間後の2細胞以上への卵割率は、20℃区では74.3%(409/550)で対照区68.7%(368/536)との間に差は認められなかったが、10℃区では16.3%(69/423)、4℃区では12.1%(103/851)であり、それぞれ対照区の値74.5%(266/357)、66.1%(530/802)に比べ著しく低率($P<0.01$)であった。

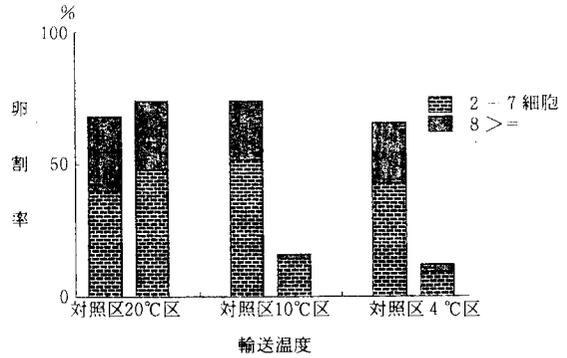


図-2 各温度区の卵割率

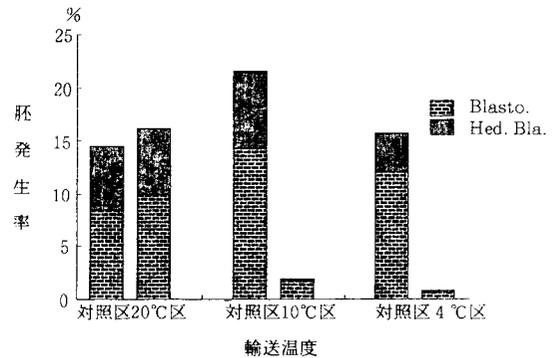


図-3 各温度区の胚盤胞発生率

媒精後7~11日目の期間内の胚盤胞への発生率については図3に示した。

期間内の胚盤胞への発生率は、20℃区では16.2%(89/550)であり、対照区の値14.5%(78/536)との間に差は認められなかったが、10℃区では2.0%(8/423)および4℃区では0.9%(8/851)であり、それぞれ対照区の値21.6%(77/357)、15.7%(126/802)に比べ著しく低率($P<0.01$)であった。

考 察

本試験では、屠畜摘出後の卵巣を生理食塩水中での輸送温度により、38℃を対照区とし4℃区、10℃区および20℃区の3区に分け、各区から採取した卵胞卵子の体外受精における卵割率および胚への発生率について比較した。卵巣の輸送温度が20℃区では、対照区(38℃)に比較し卵割率および胚への発生率には有意な差は認められず、20℃

での卵巣輸送が可能であることが明らかとなった。しかし、4および10°Cの低温区では対照区に比べ卵割率および胚への発生率が著しく低率となることが示された。

Yangら¹⁷⁾は、卵巣摘出後38、24および4°Cの燐酸緩衝液中に保存し、それぞれの保存温度での卵割率および胚への発生率について比較し、24および38°C保存では卵割率および胚への発生率とともに差が認められなかったが、4°C保存では卵割率および胚への発生率はともに著しく低率であったと報告している。本試験も同様な傾向であり、20および38°Cで輸送した卵巣から採取した卵胞卵子の体外受精による卵割率および胚への発生率には差を認めなかったことから、卵巣の輸送温度は、Yangら¹⁷⁾の報告した24°Cよりさらに低温である20°C以上において可能であることが示唆された。

卵巣摘出から卵胞卵子採取までの過程における卵巣の保存温度が卵胞卵子の成熟率に及ぼす影響について、マウス¹⁸⁾などの実験動物、ウシ^{2,5,11)}などの家畜において報告され、卵巣の保存温度は卵子の体外成熟には影響を及ぼさないとされている。今回の成績もこれらの報告と同様であり、各輸送温度での成熟培養後の第2成熟分裂中期への成熟率は対照区との間に差は認められなかった。

しかし、媒精9～10時間後の受精率において、4および10°Cの低温では多精子受精が高率になる傾向が認められた。成熟卵子は、受精中に表層顆粒から放出される物質により透明体反応が誘導され多数の精子の侵入を防御する¹⁹⁾とされているが、体外で成熟した卵子は受精中にこの表層顆粒の異常崩壊が起こり易く⁶⁾、この結果として容易に多精子侵入が認められるとされている⁷⁾。また、低温感作により表層顆粒の配置異常が起こる¹⁰⁾とされている。これらのことから、今回の4°C区において認められた多精子受精率が高率であったことは、通常でも多精子受精が誘起され易いことに加え、低温感作により卵子内の構成成分になんらかの異常が惹起された結果と思われた。

また、媒精72時間後の卵割率および胚への発生率は、低温輸送区では対照区に比べ著しく低率であった。これは、低温感作したマウス³⁸⁾およびヒツジ³⁹⁾の卵胞卵子においては、染色体の凝集および多極紡錘系の形成などの染色体の形成異常、原形質内の小胞の出現などによる卵割異常の発生により、体外受精後の卵割率および胚への発生率が低率になることが報告されている。従って、本試験の低温輸送の卵巣から採取した卵胞卵子においても、卵割検査時に変性した卵子の割合が高率であったことから、同様な染色体の異常および卵子原形質内の異常の存在が示唆された。

以上のことから、20°C以上での卵巣輸送は、卵割率および胚への発生率に影響を与える要因にはならなかったが、10°C以下での輸送は、多精子受精が高率になること並びに卵割率および胚への発生率が低率になる要因となることが明らかであり、10°C以下の低温での卵巣輸送は回避すべきであると思われる。

文 献

- 1) 安部茂樹、長谷川清寿、川平 実、哺乳卵学誌, 8,(2),155-163,(1991).
- 2) 青柳敬人、岩住安晃、和地秀一、古館 誠、藤井勝巳、福井 豊、小野 斉、家畜繁殖誌,32,13 8-142,(1986).
- 3) Baumgartner,A.P.,Chrisman,C.L.,Expl.Cell Res.,132,359-366,(1981).
- 4) Bracket,B.G.,Olipant,G.,Biol.Reprod.,12,260-274,(1975).
- 5) Fukui,Y.,Terawaki,Y.,Ono,Y.,Res.Bull.Obihiro Univ.,14,75-80,(1984).
- 6) Hytell,P.,Xu,K.P.,Smith,S.,Greve,T.,J.Reprod.Fert.,78,615-625(1986).
- 7) Hytell,P.,Xu,K.P.,Greve,T.,:Anat.Embryol., 178,47-52,(1988).
- 8) Karp,L.E.,Smith,W.D.,Gynecol.Invet.,6,337-341,(1975).

- 9) Moor R.M., Crosby, I.M., J. Reprod. Fert., 75, 4
67-473, (1985).
- 10) Santella, L., Monroy, A., J. Exp. Zool., 252, 183-
189, (1989).
- 11) 佐藤英明、入谷 明、西川義正、家畜繁殖誌,
23, 12-17, (1977).
- 12) 塩谷康生、桑山正成、上田修二、齊藤秀一、
太田 均、花田 章、家畜繁殖誌, 34, 39-43, (1988).
- 13) Shioya, Y., Kuwayama, M., Fukushma, M., Iwa-
asaki, S., Hanada, A., Theriogenology, 30, 489-496,
(1988).
- 14) Smith, D.M., Tenney, D. Y., J. Reprod. Fert., 54,
401-403, (1978).
- 15) 高田 直和、塚本章夫、黒川洋介、塩谷康生、
家畜繁殖誌, 37, 9-13, (1991).
- 16) Wolf, P.P.: In fertilization and Embryonic
Development in Vitro, pp.183-197. Eds L. Mastr
oianni, Jr & J.D. Biggers. Plenum Press, New
York. (1981).
- 17) Yang, N.S., Lu, K.H., Gordon, I., Theriogenolo-
gy, 33, 352, (1990).