# 超音波断層装置を利用した経膣採卵および採取卵子の体外受精・体外培養に関する試験


| | |
|---|---|
| 誌名 | 山口県畜産試験場研究報告 |
| ISSN | 02871262 |
| 著者名 | 井上,愛子<br>市野,清博<br>石井,俊昭<br>竹下,和久<br>松崎,伸生 |
| 発行元 | 山口県畜産試験場 |
| 巻/号 | 16号 |
| 掲載ページ | p. 151-156 |
| 発行年月 | 2000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

AgriKnowledge

# 超音波断層装置を利用した経膣採卵および採取卵子の体外受精・体外培養に関する試験

井上愛子・市野清博・石井俊昭・
竹下和久・松崎伸生

## 要　　旨

超音波断層装置を利用した経膣採卵と採取卵子の体外受精・体外培養の検討を行い、以下の成績を得た。

食肉処理場で採取した卵巣を用いて、当場で経膣採卵に使用する機器に適した卵子吸引圧を調べた結果、140mmHgの吸引圧が適当と考えられた。

この結果を受けて、黒毛和種の雌経産牛9頭から、延べ57回の経膣採卵を実施したところ、総採卵数191個、1回当たり平均3.4個で、このうち体外受精に利用可能と思われた卵子は1回当たり平均2.9個であった。

2頭の供試牛を用いて7日間隔で4回連続経膣採卵を行い小卵胞数の変化を調べたところ、いずれも採卵回数が進むにつれて小卵胞数の増加が認められた。

一方、別の2頭に対し卵胞発育誘起処理を行い、処理後24および48時間後に経膣採卵したところ、処理後24時間目の採卵で平均11.5個の卵子を得、無処理の場合の平均1.8個に比べて採取卵子数の増加が認められたが、処理後48時間目では逆に採取卵子数は平均1.5個と、無処理の場合の平均以下であった。

経膣採卵で得られた卵子の内、123個の卵子を用いて体外受精・体外培養を試みたところ、60個が分割し、内9個が胚盤胞まで発育した。

胚盤胞まで発育した胚の内、2胚を新鮮および凍結胚として受胚牛2頭に移植したところ、新鮮胚を移植した1頭が受胎し、正常雌産子が得られた。

以上のことから、経膣採卵による採取卵子の体外受精・体外培養により移植可能胚が得られ、経膣採卵による胚供給の可能性が示唆された。

## 目　　次

Ⅰ　緒　　言 …… 151
Ⅱ　材料および方法 …… 152
1．試験期間 …… 152
2．試験材料 …… 152
1）卵子採取用卵巣 …… 152
2）供試牛 …… 152
3）経膣採卵使用機材 …… 152
4）体外培養用培地および培養容器 …… 152
3．試験方法 …… 152
1）卵子吸引圧の検討 …… 152
2）経膣採卵法の検討 …… 152
(1)　経膣採卵の手法 …… 152
(2)　供試牛の条件 …… 152
3）経膣採卵採取卵子の体外受精・体外培養 … 152
4．調査項目 …… 153
Ⅲ　結果および考察 …… 153
1．卵子吸引圧の検討 …… 153
2．経膣採卵法の検討 …… 154
1）経膣採卵の手法 …… 154
2）供試牛の条件 …… 154
3．経膣採卵採取卵子の体外受精・体外培養 … 155
Ⅳ　要　　約 …… 155
参考文献 …… 155

## Ⅰ　緒　　言

一般に実施されている過剰排卵処理・人工授精によるウシ胚の生産技術においては、過剰排卵処理に対するウシの反応が、産次、分娩後日数、栄養状態、遺伝的要因、投与する卵胞刺激ホルモン(Follicle

Stimulating Hormone:FSHと略）の量、生殖器の状態等によって異なり、結果的に採取胚数や胚の品質にバラツキを生じることが問題となっている[5,7]。

一方、近年、超音波断層装置に卵子吸引装置を付けて生体から卵子を反復採取する方法、いわゆる経膣採卵法が試みられ、繁殖障害や老齢で繁殖不適と診断された牛や妊娠牛などからの採卵の可能性が報告[13]されている。

そこで、この経膣採卵技術と採取卵子の体外受精・体外培養技術を組み合わせることにより、過剰排卵処理・人工授精に依らないウシ胚生産の可能性を検討した。

## Ⅱ　材料および方法

**1．試験期間**

1997年6月から1998年12月。

**2．試験材料**

1）卵子採取用卵巣

食肉処理場においてと殺後に採取した黒毛和種の卵巣を、抗生物質（硫酸カナマイシン100mg／ml）を添加し30℃に加温した生理食塩水中に保存し、3時間以内に実験室に持ち帰り試験に供した。

2）供試牛

経膣採卵対象牛として当場繋養の黒毛和種の経産牛9頭（5～7歳）を、受胚牛として交雑種（黒毛和種×ホルスタイン種）の雌経産牛2頭（4～5歳）をそれぞれ用いた。なお黒毛和種雌経産牛9頭は、当場で供胚牛として供用していたものの内、採胚成績の比較的不良のものを用いた。

供試牛の飼養管理は年間を通じて運動場を併設した解放式追い込み牛舎で10～12頭の群飼育とした。給与飼料は乾草、サイレージ及び濃厚飼料とし、日本飼養標準の100～110％を給与した。

3）経膣採卵使用機材

電子走査型超音波断層装置（日立メディコ：ECHO PAL、周波数7.5MHz。以下、超音波断層装置と略）と卵子吸引装置（富士平工業：VACUUM PUMP MODEL 4）を用いた。卵巣穿刺針（富士平工業：18G×60cm）は内径1㎜×150cm長のシリコンチューブを付け、超音波断層装置に付属のプローブに装着して使用した。

4）体外培養使用培地および培養容器

卵子の成熟培養には、5％供卵牛血清加TCM-199（GIBCO）を、発生培養には、5％子牛血清加CR1aa[12]を用いた。容器は、媒精には35㎜径プラスチック・シャーレ（Nunc）を、成熟培養・発生培養には4 Well Multidish（Nunc）を用いた。

**3．試験方法**

1）卵子吸引圧の検討

使用機器に適した卵子吸引圧を調べるため、卵子吸引装置と卵巣穿刺針を使用して、食肉処理場から持ち帰った卵巣表面の可視卵胞から、90,100,110,120,140,160㎜Hgの6段階の吸引圧で卵子を吸引し、卵胞数、採取卵子数、採取率を調べ、さらに効率的と思われた卵子吸引圧付近（120,140,160㎜Hg）での採取卵子の状態を、卵丘細胞の付着状況により愛知県畜産総合センターの「牛の受精卵移植技術マニュアル」の分類[1]に従ってA～Cにランク分けした。

2）経膣採卵法の検討

(1)　経膣採卵の手法

供試牛を枠場に保定し、キシラジン（セラクタール2％注射液：バイエル）1mlを頸部筋肉内に投与して牛を鎮静化し、さらに、塩酸リドカイン（キシロカイン2％注射液：藤沢薬品）5mlで尾椎硬膜外麻酔を施し直腸の蠕動運動を停止させた後、卵巣穿刺針をセットしたプローブを膣内に挿入して、直腸を介して卵巣を超音波断層装置の断層像画面上に誘導した。超音波断層装置のモニター上で卵胞を確認しながら穿刺針を膣壁経由で卵巣内に刺入し、卵胞液を吸引することにより卵子を回収した。

供試した卵巣穿刺針およびこれにつながるシリコンチューブは、37℃に保温し、1％の割にヘパリンを添加した胚回収用灌流液（エンブリオテック：日本全薬）を灌流液として満たしておき、卵子はチューブを経て同液に回収した。

供試牛からの採卵間隔は1～2週に1回とした。

(2)　供試牛の条件

供試牛の内2頭（牛No.1、No.2）について、7日間隔で4週間連続して経膣採卵を実施し、連続採卵による卵巣内の直径5㎜以下の小卵胞数の変化を超音波断層装置により調べた。

一方、供試牛の内他の2頭（牛No.3，4）を用いて、発情後10日目から、当場で常用している過剰排卵処理法[9]に準じた卵胞発育誘起処理が経膣採卵成績

に与える影響を調べた。即ち、FSH（アントリン:デンカ製薬）総量20AU（3日間朝夕2回各5，5，3，3，2，2AU）を筋肉内投与し、投与終了日の朝にクロプロステノールを750μg（プロスタグランジンF2α類縁体、エストラメイト：住友製薬）筋肉内投与し、その後24時間目に経膣採卵を行った。約1ヶ月後、同牛2頭を同様に卵胞発育誘起処理し、クロプロステノールを投与後48時間目に経膣採卵を行い、これら各2頭の採卵成績と、同じ供試牛で卵胞発育誘起処理以前の無処理の場合の経膣採卵成績（牛No.3，4各2回、計4回）の平均値と比較した。

以上の条件設定については、〔表1〕に示した。

**表1**　供試牛の条件と供試延べ頭数　　：頭

| 供試牛No. | 卵胞発育誘起処理の有無 | | |
|---|---|---|---|
| | なし | あり | |
| | | 24[注1)] | 48 |
| 1 | 4[注2)] | − | − |
| 2 | 4 | − | − |
| 3 | 2 | 1 | 1 |
| 4 | 2 | 1 | 1 |

注1）処理後採卵までの時間を示す
注2）表中の数字は供試延べ回数を示す

3）経膣採卵採取卵子の体外受精・体外培養

経膣採卵で得られた利用可能卵子の内ランダムに123個を選んで、体外受精・体外培養を実施した。

卵子は採取後22時間、成熟培養した後、体外受精に供した。

体外受精は梶原らの方法[5]に準じて実施した。即ち、黒毛和種の凍結精液を37℃の温湯で溶解し、20mMテオフィリン（Sigma）及び1U／mlヘパリン（ノボヘパリン注、ノボノルデイスクA／S）を添加した修正タイロード液（以下、BO液）で2回洗浄（1,800rpm,5分間）後、1U／mlヘパリンおよび6mg／mlに牛血清アルブミン（和光純薬）を添加したBO液で希釈し、精子濃度を500万個／mlに調整した。この精子浮遊液を、シャーレに105μlのドロップとして置き、流動パラフィンで覆い、30分～1時間前培養した。媒精は1ドロップにつき20個以下の卵子を精子浮遊液に導入して行い、4～5時間媒精後に精子を除去し、卵子を発生培地に移した。

発生培養では卵丘細胞と共培養した。培養条件は、成熟培養、発生培養共、流動パラフィンを重層し、気相は$CO_2$5%・空気95%・湿度100%とし、培養温度は38.5℃とした。

媒精後、発生培養時間48～72時間目に分割状況を、7～9日目に胚盤胞の発生状況をそれぞれ観察した。

なお、胚盤胞まで発生した2胚をツーステップストロー法による凍結保存胚、および新鮮胚として各1胚ずつを、2頭の移植適期（発情後7日目）の受胚牛に移植し、受胎の有無等を調べた。

**4．調査項目**

1）卵子吸引圧の検討

卵子吸引圧(mmHg)、採取卵子数、卵胞数、採取率、採取卵子の卵丘細胞の付着状況

2）経膣採卵法の検討

(1)　経膣採卵の手法

実施回数、採取卵子数、採取卵子の卵丘細胞の付着状況、直径5mm以下の小卵胞数

(2)　供試牛の条件

採取卵子数

3）経膣採卵卵子の体外受精・体外培養

供試卵子数、分割数、分割率、胚盤胞数、胚盤胞率、受胚牛の受胎性

## Ⅲ　結果および考察

**1．卵子吸引圧の検討**

永井ら[11]は、経膣採卵用卵子吸引装置における卵子吸引圧を100mmHg程度として実施し、採取卵子の卵丘細胞の付着が悪い時にはさらに流量を調節する、と報告している。

そこで我々は、まず吸引圧90～160mmHgの範囲で卵巣の可視卵胞から卵子を吸引し、卵子の採取状況を調べたところ、140mmHgの吸引圧において、74.4%と、最も高い卵子採取率が得られた〔表2〕。

当初、経膣採卵用卵子吸引装置における卵子吸引圧は、前述の報告にある100mmHg程度の吸引圧が適当

**表2**　食肉処理場由来卵巣を用いた卵子吸引圧と卵子採取状況　　：mmHg,個，%

| 卵子吸引圧 | 採取卵子数／卵胞数 | 採取率 |
|---|---|---|
| 90 | 10／41 | 24.4 |
| 100 | 19／55 | 34.6 |
| 110 | 16／28 | 57.1 |
| 120 | 25／47 | 53.2 |
| 140 | 29／39 | 74.4 |
| 160 | 22／37 | 59.5 |

ではないかと予測したが、我々の試験では90～100mmHgの吸引圧では吸引力が弱く、還流液が詰まるなど採卵効率は思わしくなかった。

この結果から、さらに、我々の試験で卵子採取効率の最も良いと思われた吸引圧140mmHgを中心に、120、140、160mmHgの各吸引圧で採取した卵子の卵丘細胞の付着状況を調べたところ、いずれの吸引圧に於いても卵丘細胞層の完全付着した卵子が採取され、採取卵子数に対するAランク卵子の割合はそれぞれ72.0、65.5、77.3%であった〔表3〕。

**表3**　卵子吸引圧別にみた採取卵子の卵丘細胞付着状況　　：mmHg, 個, %

| 卵子吸引圧 | 卵丘細胞付着状況 | 採取卵子数 | Aランク卵子の割合 |
|---|---|---|---|
| 120 | A | 18 | 72.0 |
| | B | 4 | |
| | C | 3 | |
| 140 | A | 19 | 65.5 |
| | B | 1 | |
| | C | 9 | |
| 160 | A | 17 | 77.3 |
| | B | 1 | |
| | C | 3 | |

注)A:卵丘細胞層完全付着
B:卵丘細胞一部剥離
C:裸化卵子

今回の試験では、採取卵子の卵丘細胞の付着状態から吸引圧140mmHgが最も効率良く卵子が採取可能と思われる結果であったため、以降の試験では吸引圧を140mmHgに設定して経膣採卵を行った。

**2．経膣採卵法の検討**

1）経膣採卵の手法

延べ57回の卵子採取成績を〔表4〕に示した。総採取卵子数は191個、1回当たりでは0～16個、平均3.4個であった。このうち卵丘細胞の付着がBランク以上、即ち卵丘細胞層の付着が卵子全周の1／3以上あり、細胞質にも変性が認められず、体外受精・体外培養に利用可能と判断される卵子（以下、利用可能卵子と略）は、1回当たり平均2.9個であった。

**表4**　採卵成績　　：頭, 個

| | |
|---|---|
| 延採卵実施頭数 | 57 |
| 回収卵子総数 | 191 |
| 平均回収卵子数 | 3.4 |
| 利用可能卵子数 | 165 |
| 平均利用可能卵子数 | 2.9 |

今回の成績では、経膣採卵における回収卵子数が1回平均3.4個と、ホルスタイン種における約1,000回の経膣採卵で採取卵子が1回平均4.9個とするHaslerらの報告[4]や、黒毛和種において1回平均7.4個とする小林らの報告[7]に比べてやや少なかった。この要因は、供試牛が、当場で供胚牛として供用していたものの内、採胚成績が比較的不良の個体であったことから、牛の個体差などが推測された。

2）供試牛の条件

2頭の牛について7日間隔で4回連続採卵を行い小卵胞数の変化を調べた結果、1回目と比べて4回目では牛No.1では20個から25個、牛No.2では18個から53個と、いずれも小卵胞数の増加が認められた〔表5〕。

**表5**　連続採卵時における小卵胞数　　：個

| 採卵回次 | 牛No.1 | 牛No.2 |
|---|---|---|
| 1回目 | 20 | 18 |
| 2回目 | 20 | 12 |
| 3回目 | 21 | 29 |
| 4回目 | 25 | 53 |

注)数値は5mm以下の小卵胞数を示す。

これは、採卵回数が進むにつれ小卵胞数が増加する傾向を示しており、このことから7日間間隔での経膣採卵は有効と思われた。しかし一方では、3～4日間隔でも採取が可能とする報告[13]もあり、採卵間隔の検討は今後、さらに必要と思われた。

また、採卵成績には年齢・採卵行為の難易など供卵牛の条件が関与し、個体差が生じるとする報告[3,13]もある。我々の試験実施中、牛によっては採卵を複数回反復すると、卵巣への穿刺針の刺入が若干困難になる個体も認められたが、これは膣壁の肥厚、卵巣の結合織の増生等によるものではないかと推察された。

一方、卵胞発育誘起処理が経膣採卵成績に与える影響を調べた結果、処理後24時間目の採卵数が1回平均11.5個と、卵胞発育誘起処理を行わず経膣採卵を実施した4回と比べ採卵数が増加した〔表6〕。しかし処理後48時間後では逆に採卵数が1回平均1.5個と対照区の平均以下となった。

**表6** 卵胞発育誘起処理による採卵成績 ：個

| 処理終了から採卵までの時間 | 回数 | 総回収卵子数 | 平均回収卵子数 |
|---|---|---|---|
| 24時間 | 2 | 23 | 11.5 |
| 48時間 | 2 | 3 | 1.5 |
| 無処理 | 4 | 8 | 2.0 |

注）回数は2頭の採卵延べ回数を、平均回収卵子数は1回1頭当たりの平均回収卵子数を示す

Bolsら[2]は、FSH・LH合剤（Stimufol,Rhone Merieux）を用いて4日間卵胞発育誘起処理を行い、処理終了翌日に経膣採卵を行ったところ、無処理の同一個体に比べて卵胞数、回収卵子数が有意に増加したと報告している。我々の卵胞発育誘起処理法はBolsらとはやや異なるが、処理後24時間目の採卵において採取卵子数が同様に増加したことから、何らかの卵胞発育誘起処理法を実施することは経膣採卵の採取卵子数の増加に有効であるものと考えられた。

### 3．経膣採取卵子の体外受精・体外培養

経膣採卵で得られた利用可能卵子165個の内123個について体外受精・体外培養を実施した成績を〔表7〕に示した。

分割した卵数は60個（分割率48.8%）、さらに胚盤胞まで発生した胚数は、9個（胚盤胞率7.3%）であった。

**表7** 体外受精・体外培養成績 ：個、%

| | |
|---|---|
| 供試卵子数 | 123 |
| 分割数卵子数 | 60 |
| 分割率 | 48.8 |
| 胚盤胞数 | 9 |
| 胚盤胞率 | 7.3 |

この分割率、胚盤胞率は、食肉処理場由来卵巣の卵子を用いた松岡ら[10]の成績（子牛血清使用下で分割率75.2%、胚盤胞率20.4%）に比較するとかなり低く、坂口ら[13]および藤谷ら[3]の経膣採卵由来卵子の体外受精成績の報告に近似していた。

経膣採取卵子の体外受精・体外培養により胚盤胞まで発育した2胚を、新鮮および凍結胚として受胚牛2頭に移植したところ、新鮮胚を移植した1頭が受胎し、在胎日数290日で体重28.5kgの正常雌産子が得られた。

## Ⅳ 要　約

超音波断層装置による経膣採卵および採取卵子の体外受精・体外培養を行い、以下の成績を得た。

1 食肉処理場で採取した卵巣を用い、当場で経膣採卵に使用する機器に適した卵子吸引圧を調べた結果、140mmHgの吸引圧が経膣採卵に適当と考えられた。

2 黒毛和種の雌経産牛9頭を用いて延べ57回の経膣採卵を行ったところ、総採卵数は、191個、1回当たり平均3.4個の採卵成績を得、このうち体外受精に利用可能と思われた卵子は1回当たり平均2.9個であった。

3 供試牛の内、2頭を用いて7日間隔で4回連続経膣採卵を行い小卵胞数の変化を調べたところ、いずれも採卵回数が進むにつれて小卵胞数の増加が認められた。

4 供試牛の内、他の2頭に対し卵胞発育誘起処理を行い処理後24および48時間後に経膣採卵を行ったところ、処理後24時間目の採卵で平均11.5個の卵子を得、無処理の場合の平均1.8個に比べて採取卵子数の増加が認められたが、48時間目では逆に採取卵子数は平均1.5個と無処理の場合の平均以下となった。

5 経膣採卵で得られた卵子の内、123個の卵子を用いて体外受精・体外培養を試みたところ、60個が分割し、内9個が胚盤胞まで発育した。

6 胚盤胞まで発育した2胚を新鮮および凍結胚として受胚牛2頭に移植したところ、新鮮胚を移植した1頭が受胎し正常雌子牛が得られた。

## 参考文献

1）愛知県総合畜産センター：牛の受精卵移植技術マニュアル，改訂第三版．70（1997）

2）Bols, P.E.J., Van Soom,A., Vanroose,G., de Krif,A. Transvaginal oocyte pick-up in infertile Belgian Blue donor cows. Theriogenology:Vol. 45,359（1996）

3）藤谷保裕：新技術の連携活用による牛の改良増殖の新展開，家畜人工授精，165号 27-37（1994）

4）Hasler, J.F. et al. Production,Freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. Theriogenology:Vol.43, 141-152（1995）

5）梶原豊・後藤和文・小西昭三・中西嘉彦・小川清

彦：牛卵胞卵子の体外受精及び体外培養によるふ化，家畜繁殖学雑誌，33号173-180（1987）

6）小林直彦・井口光国・松野弘・木谷隆：過剰排卵処理開始時の卵巣状態が採卵成績に及ぼす影響，岐阜県肉用牛試験場研究報告，第34号　6 - 9（1996）

7）小林直彦・林尚徳・松野弘・平尾一平・山田雅保：超音波診断装置による経膣採卵成績と採取した未成熟卵子の体外発生成績，岐阜県肉用牛試験場研究報告，第37号　1 - 4（1999）

8）小西一之・鈴木一男・菊池工：黒毛和種におけるFSHによる過剰排卵処理牛の採卵成績の検討，種畜牧場調査実験成績報告書，第３号 69-80（1990）

9）松岡一仁・阪田昭次・藤山繁・樫原孝正・水原孝之：性腺刺激ホルモン投与による黒毛和種雌牛の過剰排卵反応と血液性状，山口県畜産試験場研究報告，第10号　23-31（1995）

10）松岡一仁・阪田昭次・市野清博・嶋屋佳子・樫原孝正・水原孝之・鈴木達行：ウシ卵子の体外成熟および発生培地への過剰排卵処理牛採胚時血清添加が胚盤胞の発生に及ぼす効果，山口県畜産試験場研究報告，第11号　11-20（1995）

11）永井　卓：牛卵胞卵の経膣反復採取と体外受精，日本胚移植学雑誌，第17巻　第１号　34-37（1995）

12）Rosenkrans, C.F.Jr., First,N.L. Culture of bovine zygotes to the blastcyst stage:Effect of amino acids and vitamines. Theriogenology:Vol. 35, 266（1991）

13）坂口慎一・井口光国・小林直彦・三溝成樹・内海恭三：超音波診断装置を利用した繁殖不適牛からの連続経膣採卵，日本胚移植学雑誌，第17巻　第２号　94- 100（1995）