

経膈採卵と体外受精による牛胚の生産

秋山清・坂上信忠・仲澤慶紀¹（¹神奈川県畜産課）

Production of Bovine Embryos by Ovum Pick-up and In Vitro Fertilization

Kiyoshi AKIYAMA, Nobutada SAKAGAMI and Yoshinori NAKAZAWA

過剰排卵処理による採卵が困難な種々の状況の供卵牛に経膈採卵を実施し、体外受精後に胚盤胞の発生状況を調査した。

ホルスタイン種経産牛では平均8.7個の卵子が採取され、胚盤胞率は16.9%であった。供試牛38頭中20頭から1頭あたり1.6個の胚盤胞が得られた。黒毛和種経産牛では平均10.4個の卵子が採取され、胚盤胞率は14.4%であった。供試牛41頭中25頭から1頭あたり1.7個の胚盤胞が得られた。

ホルスタイン種では供卵牛の年齢による胚生産成績に差は認められなかったが、空胎期間が12ヶ月以上の供卵牛において12ヶ月未満の供卵牛に比べて採取卵数や胚盤胞率が優れており、胚盤胞率に有意差が認められた。黒毛和種では経膈採卵前日のFSH投与の有無により採取卵数や胚盤胞発生率に差は認められなかった。また、7～15日間隔で反復して経膈採卵を5～6回実施した3頭から、1回あたり0.0～4.3個の胚盤胞が得られたが、供卵牛個体間の胚盤胞率には有意差が認められた。最も多く胚盤胞の得られた個体では、58日間に6回の経膈採卵により17個の胚盤胞が得られた。

これらのことから、経膈採卵の利用により過剰排卵処理による胚生産が困難な供卵牛からの胚生産が可能なが示された。

キーワード：ホルスタイン種・黒毛和種・経膈採卵・体外受精・胚盤胞率

胚移植に用いる牛胚は、過剰排卵処理及び人工授精後に子宮灌流で採取する方法や、と畜卵巣から得た卵子を体外受精する方法により生産されている。

過剰排卵処理による胚採取は、供卵牛が正常な発情周期を繰り返すことを確認した後に、卵胞刺激ホルモン製剤の投与により過剰排卵処理を行い人工授精後7～8日目に行われる。しかしながら、採取される胚の数は供卵牛個体毎に変動が大きいことが知られている¹⁾²⁾。また、ホルモン剤に対する反応性が低いことや正常胚数が少ないことから、高齢牛、繁殖障害牛、乳房炎や蹄疾患等を持つ牛は過剰排卵処理には不向きとされている。

一方、体外受精による胚生産は、と畜由来卵巣を用いて大量の胚生産を可能にする技術として発展し、肥育素牛の生産技術として普及が進

んできた³⁾。

さらに、超音波画像診断装置と経膈用探触子を利用することにより、生体の卵巣から採取した卵子を体外受精し移植可能胚を生産する経膈採卵技術が開発された⁴⁾⁵⁾。

この技術は、高齢、繁殖障害、外科的疾患等の様々な理由で過剰排卵処理による胚採取や後継牛生産が困難となった供卵牛の卵巣から、経膈的に卵子を採取し体外受精により移植可能胚の生産が可能であり、従来の過剰排卵処理による胚採取の補完または代替技術としての利用が期待される⁵⁾⁶⁾⁷⁾。

そこで、種々の状況の供卵牛に対して経膈採卵を実施し、体外受精後の移植可能胚の生産状況を調査した。

材料及び方法

1. 供試材料

センター及び県内農家で飼養し、採卵成績不良、長期空胎、繁殖障害等の理由で過剰排卵処理による胚採取が困難と判断されたホルスタイン種経産牛延べ38頭、センター内で過去1～8年間、過剰排卵処理に供してきた黒毛和種経産牛延べ41頭を供試した。ホルスタイン種全頭及び黒毛和種のうち延べ13頭は経膈採卵の前日に卵胞刺激ホルモン製剤（アントリン、川崎三鷹製薬、以下FSH）10AUを頸部筋肉内に投与した。また、3頭の黒毛和種はFSHを投与せずに7～15日間隔で5～6回の経膈採卵を反復して実施した。

2. 経膈採卵

供試牛を柵場に保定し、超音波画像診断装置（日立メディコ、EUB405Bまたはアロカ、SSD1000）の探触子（コンベックス型、7.5MHz）を膈内に挿入し、卵巣内の卵胞数を確認した。その後、採卵用針（ミサワ医科工業、ディスプレイザブル採卵針-動物用）で卵胞液を1%子牛血清及び1%ヘパリン添加乳酸加リンゲル液を入れた遠心管に吸引採取した。

採取した卵胞液は受精卵回収用フィルター（エムコンフィルター、IMV）でろ過した後に、実体顕微鏡下で卵子を検索し、採取卵子を以下の試験に供した。

採取した卵子は卵丘細胞の付着状況により次のとおり分類した。

Aランク：卵丘細胞が3層以上で透明帯周囲に緊密に付着したもの

Bランク：卵丘細胞が2層以下または透明帯周囲1/3以上に付着したもの

Cランク：裸化卵子またはBランクより卵丘細胞

の付着が少ないもの

Dランク：卵丘細胞層が膨化または蜘蛛の巣状に変性したもの

3. 成熟培養

採取卵子は5%CO₂、95%空気、38.5℃の条件で20～22時間程度成熟培養した。成熟培養液は、5%子牛血清添加TCM199、または0.02AU/mlFSH、1μg/mlEstradiol-17β、0.2mMピルビン酸及び5%牛胎児血清添加TCM199を用いた。

4. 媒精

成熟培養後の卵子は、凍結精液を用いて媒精した。精子の受精能獲得誘起は、精子洗浄液（IVF100、機能性ペプチド研究所）で2回遠心洗浄することで行い、最終濃度500万/mlの精子懸濁液に成熟培養後の卵子を導入して5～6時間媒精した。

5. 発生培養

媒精後の卵子は、5%子牛血清添加TCM199または5%牛胎児血清添加修正合成卵管液で卵丘細胞と共培養を行い、媒精後10日目までの胚細胞の発生状況を調査した。

6. 統計処理

統計処理は、統計ソフトSPSSを用いて一元配置の分散分析後にTukeyのHSDで多重検定を行った。

結果

供卵牛の品種別の経膈採卵成績を表1に示した。ホルスタイン種では平均8.7個の卵子が採取され胚盤胞率は16.9%であった。供試牛38頭中20頭から1頭あたり1.6個の胚盤胞が得られた。一方、長期間にわたり過剰排卵処理に供してきた黒毛和種では平均10.0個の卵子が採取され、胚盤胞率は14.4%であった。供試牛41頭中25頭

表1 供卵牛の品種が胚生産成績に及ぼす影響

品種	供試頭数	卵胞数 a	採取卵数 b	採取卵率 b/a(%)	品質構成			分割卵数 c	分割卵率 c/b(%)	8細胞期胚数 d	8細胞期胚率 d/b(%)	胚盤胞数 e	胚盤胞率 e/b(%)
					A-B	C	D						
H	38	22.3±11.1	8.7±5.9	37.4±18.8	6.5	1.9	0.3	4.4±3.3	54.4±27.8	2.2±2.7	26.3±28.3	1.6±2.0	16.9±23.0
B	41	27.3±8.4	10.0±5.3	39.2±16.5	74.7	21.8	3.5	4.6±3.2	45.6±24.3	1.4±1.9	13.7±20.2	1.7±2.0	14.4±15.1
					68.3	24.0	7.7						

H:ホルスタイン種

B:黒毛和種

上段：個数、下段：(%)

表2 供卵牛の年齢が胚生産成績に及ぼす影響（ホルスタイン種）

年齢	供試頭数	卵胞数 a	採取卵数 b	採取卵率 b/a(%)	分割卵数 c	分割卵率 c/b(%)	胚盤胞数 d	胚盤胞率 d/b(%)
6歳未満 (4.5±0.9歳)	7	20.5±5.0	8.1±4.9	38.0±17.2	3.9±2.9	54.1±31.0	1.5±2.7	26.8±38.6
6歳以上 (8.2±1.2歳)	20	24.9±11.2	10.1±6.0	39.4±19.2	4.7±3.2	49.7±28.3	1.8±1.8	15.6±17.4

表3 供卵牛の空胎期間が胚生産成績に及ぼす影響 (ホルスタイン種)

空胎期間	供試頭数	卵胞数 a	採取卵数 b	採取卵率 b/a(%)	分割卵数 c	分割卵率 c/b(%)	胚盤胞数 d	胚盤胞率 d/b(%)
12ヶ月未満 (5.6±3.6ヶ月)	10	16.5±3.6	5.0±1.6	31.0±10.0	1.9±1.1	39.8±23.1	0.2±0.4	3.3±7.0 ^a
12ヶ月以上 (20.6±6.8ヶ月)	20	24.3±10.4	9.6±5.6	38.9±20.4	5.2±3.1	59.2±29.1	2.2±2.3	25.6±28.3 ^b

*: 異符号間に有意差あり、P<0.05

表4 FSH投与が胚生産成績に及ぼす影響 (黒毛和種)

FSH投与	供試頭数	卵胞数 a	採取卵数 b	採取卵率 b/a(%)	分割卵数 c	分割卵率 c/b(%)	胚盤胞数 d	胚盤胞率 d/b(%)
有り	13	28.2±7.6	9.4±5.6	34.2±18.7	4.3±3.1	45.3±17.8	1.8±2.1	15.7±16.0
なし	11	25.5±5.5	8.5±4.1	33.3±13.7	4.4±2.7	58.7±30.9	1.3±0.9	17.0±16.0

経膣採卵の前日に10AUを筋肉内投与

表5 回次別の反復経膣採卵成績 (黒毛和種)

実施回次	供試頭数	卵胞数 a	採取卵数 b	採取卵率 b/a(%)	分割卵数 c	分割卵率 c/b(%)	胚盤胞数 d	胚盤胞率 d/b(%)
1	3	27.0±11.5	14.0±6.6	51.0±3.7	8.7±2.5	68.0±20.9	4.3±0.0	24.4±21.4
2	3	19.3±7.6	11.3±4.5	59.2±6.0	4.0±1.0	36.0±10.3	2.3±1.5	19.7±9.2
3	3	28.7±9.7	15.0±4.4	53.2±6.4	4.7±4.0	26.7±23.1	0.0±0.0	11.3±11.1
4	3	29.0±13.5	9.0±4.4	34.4±15.9	2.0±1.0	24.2±9.5	1.3±2.3	11.1±19.2
5	3	30.0±11.5	9.3±2.1	33.1±7.8	2.7±1.5	28.8±10.6	0.0±0.0	0.0±0.0
6	2	29.0±10.4	17.0±9.9	56.1±33.8	6.0±7.0	34.2±22.3	0.3±0.6	1.4±2.4

7~15日間隔で経膣採卵を実施

表6 供卵牛別の反復経膣採卵成績 (黒毛和種)

供卵牛	反復回数	卵胞数 a	採取卵数 b	採取卵率 b/a(%)	分割卵数 c	分割卵率 c/b(%)	胚盤胞数 d	胚盤胞率 d/b(%)
A	5	15.0±2.7 ^a	7.6±1.3	51.4±8.6	2.2±2.4	30.8±33.5	0.4±0.9	5.7±12.8
B	6	32.8±5.4 ^b	14.8±6.9	45.9±18.1	6.7±4.4	41.8±10.2	2.0±3.0	10.7±15.1
C	6	33.3±5.5 ^b	13.8±2.8	42.8±12.3	5.3±3.1	37.9±18.8	2.8±2.2	18.4±14.7

7~15日間隔で経膣採卵を実施

*: 異符号間に有意差あり、P<0.05

から1頭あたり1.7個の胚盤胞が得られた。採取卵子の品質構成には大きな差は認められなかった。

ホルスタイン種において供卵牛の年齢が胚生産成績に及ぼす影響を表2に示した。6歳未満及び6歳以上の供卵牛の卵胞数(20.5個、24.9個)、採取卵数(8.1個、10.1個)、胚盤胞率(26.8%、15.6%)に差は認められず、1頭あたり1.5個及び1.8個の胚盤胞が得られた。

ホルスタイン種供卵牛の空胎期間が胚生産成績に及ぼす影響を表3に示した。12ヶ月未満の供卵牛では5.0個の卵子が採取され、体外受精後の胚盤胞率は3.3%であり、1頭あたり0.2個の胚盤胞が得られた。一方、空胎期間12ヶ月以上の供卵牛では9.6個の卵子が採取され、胚盤胞率は25.6%、1頭あたり2.2個の胚盤胞が得られ

た。両群の胚盤胞率の間に有意差が認められた(P<0.05)。

黒毛和種において、経膣採卵前日のFSH投与が胚生産成績に及ぼす影響について表4に示した。FSH投与の有無により、卵胞数(28.2個、25.5個)、採取卵数(9.4個、8.5個)、胚盤胞率(15.7%、17.0%)に差は認められなかった。

黒毛和種における反復経膣採卵成績を表5及び表6に示した。7~15日間隔で経膣採卵を5~6回反復したところ、1回あたり9.0~17.0個の卵子が採取され、体外受精後に0~4.3個の胚盤胞が得られた。しかし、経膣採卵の実施回数の増加に従って胚盤胞数は減少する傾向であった。また、供卵牛個体間で胚盤胞率にばらつきが大きく、供卵牛個体間の卵胞数に有意差が認められた(P<0.05)。

考察

種々の状況の供卵牛に対して経膈採卵を実施し、体外受精後の移植可能胚の生産状況を調査した。

山本ら⁷⁾は採卵成績の低下した輸入ホルスタイン種供卵牛に、坂口ら⁹⁾、今井ら⁶⁾は黒毛和種供卵牛に対して、計画的に経膈採卵を実施し、移植可能胚の生産が可能であることを報告している。本試験においても同様に、ホルスタイン種では供試牛38頭中20頭、黒毛和種では41頭中25頭において胚盤胞の発生が認められ、過剰排卵処理による胚生産が困難な供卵牛で移植可能胚の生産が可能であることが確認された。とくに、13.8歳の高齢牛や空胎期間28.9ヶ月の長期空胎牛から移植可能胚が生産されたことから、高齢牛や長期空胎牛であっても経膈採卵により移植可能胚が生産できることが示された。

一方、ホルスタイン種において、空胎期間が12ヶ月未満の供卵牛では12ヶ月以上の供卵牛に比べて卵胞数や採取卵数が少なく、胚盤胞率は有意に低かった。

我々は、と畜場で採取した卵巣を個体別に体外受精した実験において、肥育や繁殖障害を理由に廃用された供卵牛の卵巣では移植可能胚の発生が認められたが、乳房炎や事故により廃用された供卵牛の卵巣では卵胞数が少なく胚盤胞の発生は認められなかったことを報告した⁸⁾。また、と畜検査において肝臓廃棄となった牛では卵巣内の卵子の品質が低下していることが報告されている⁹⁾。

本試験における空胎期間が12ヶ月以上の供卵牛は酪農経営において後継牛生産が強く要望されたために、空胎にも関わらず長期間飼養された牛が多い。このため、分娩後の経過にともない泌乳量が低下し栄養充足が満たされることと併せて、良好な飼養環境が与えられていることが多いと考えられる。一方、空胎期間が12ヶ月未満の供卵牛では、乳房炎や肢蹄障害を理由に経膈採卵を実施した牛が多く認められ、これらのことが卵巣機能に影響を及ぼし、卵子採取や胚生産の成績を低下させたものと考えられる。

経膈採卵前のホルモン剤の投与について、種々の検討が行われている。轟木ら¹⁰⁾は経膈採卵の48時間前にFSH10AUを投与することにより、卵巣内の小卵胞の直径が7mm前後まで増加し、卵胞の吸引が容易となり、採卵に要する時間が短縮されることを報告した。橋谷田ら¹¹⁾は経膈採卵の72時間前にeCG250IUを投与した供卵牛において採取した卵子の品質の向上が期待できることを報告している。また、尾形ら¹²⁾は経膈

採卵の48時間前のGnRH200 μ gの投与が、新たな卵胞波の誘導による卵胞数の増加と採取卵数の増加につながることを報告している。本試験では経膈採卵の前日にFSH10AUを投与したが、経膈採卵の当日の卵胞数や採取卵数の増加は認められなかった。今後も採卵成績を向上させるために効果的なホルモン剤の投与について検討する必要があると考えられる。また、表1に示すとおり、本試験では超音波診断で確認した卵胞数に対して、採取された卵子の割合（採取卵率）は30~40%程度であったことから、採取技術の向上と併せて手技の改善を進める必要があると考えられる。

経膈採卵では過剰排卵処理が不要であることから、1週間程度の間隔で反復して採卵を行うことが可能とされている⁶⁾。本試験で得られた供卵牛1頭あたりの胚盤胞の発生数は、一般的な過剰排卵処理による胚生産に比べて少ないことが多かったが、反復経膈採卵において最も優れた個体では、58日間に6回の経膈採卵を行い17個の胚盤胞が得られており、これまでの報告と同様に、経膈採卵の反復実施により、特定の供卵牛からより多くの胚を生産できることが確認された。しかし、経膈採卵においても供卵牛毎に胚生産成績に変動があることも確認された。

これらのことから、経膈採卵の利用により過剰排卵処理による胚採取が困難な供卵牛からの胚生産が可能であることが確認され、過剰排卵処理による胚生産の補完または代替技術としての利用の可能性があると考えられた。また、若齢牛⁶⁾、肥育牛¹³⁾、分娩後牛¹⁴⁾、妊娠牛¹⁵⁾、など、これまで胚生産の対象とされなかった供卵牛からの胚生産の可能性が報告されており、牛の改良増殖を推進するための新しい胚生産方法として期待される。

今後は、経膈採卵による採卵成績や発生成績の向上と併せて、生産される胚の品質向上について検討が必要と考えられる。

引用文献

- 1) 柏木聡・佐藤洋三朗・秋山清・川西隆智. 牛人工妊娠の簡易化に関する試験. 牛受精卵移植の実用普及の検討. 神奈川県畜産試験場研究報告, 78 : 1-12. 1989.
- 2) 坂上信忠・秋山清・仲澤慶紀・橋村慎二・濱野岳人・久下壮・岩田尚孝・門司恭典. 経皮吸収エストロジオール利用が黒毛和種経産牛の過剰排卵処理成績に及ぼす影響. 日本胚移植学雑誌, 30 : 3, 109-117. 2008.

- 3) 浜野晴三. 体外受精卵による黒毛和種肥育素牛生産. 畜産の研究, 61:1, 81-85. 2007.
- 4) 永井卓. 牛卵胞卵の経膈反復採取と体外受精. 日本胚移植学雑誌, 17: 1, 34-37. 1995.
- 5) 坂口慎一・井口光国・小林直彦・藤谷泰裕・三溝成樹・内海恭三. 超音波診断装置を利用した繁殖不適和牛からの連続経膈採卵. 日本胚移植学雑誌, 17: 2, 94-101. 1995.
- 6) 今井敬・田川真人. 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: 1, 29-35. 2006.
- 7) 山本広憲. 輸入牛における過剰排卵処理と経膈採卵. 東日本家畜受精卵移植技術研究会報, 13: 11-16. 1997.
- 8) 秋山清・石渡浩江・宮下泰人・田仲修. 牛性周期における小卵胞の動態に関する研究, 雌牛個体の小卵胞数及び卵子回収成績が体外受精卵の発生成績に及ぼす影響. 神奈川県畜産研究所研究報告, 85: 1-5. 1995.
- 9) 田中裕志・芝野健一・増田恵・岩田尚孝・桑山岳人・門司恭典. ウシ肝臓の状態と卵子形成および卵子の発育能力について. 日本胚移植学雑誌, 31: 1, 61. 2009.
- 10) 轟木淳一. 経膈採卵(OPU)技術の現場への実用化に向けて. 日本胚移植学雑誌, 28: 1, 44-47. 2006.
- 11) 橋谷田豊・作田直之・福田淳郎・山谷省蔵・古屋敷忍・浅田正嗣・小西一之. 黒毛和種の連続生体卵子吸引におけるeCG前処理の効果. 東日本家畜受精卵移植技術研究会報, 19: 34-35. 2003.
- 12) 尾形康弘・日高健雅・松重忠美・堀内俊孝. GnRH製剤を用いた経膈採卵法の検討. 広島県獣医学会雑誌, 21: 20-23. 2006.
- 13) 大谷直人・渡邊貴之・小野寺健一・山形重喜・三谷和則・伊藤義文・塚口大祐・平尾正倫・小西一之. 黒毛和種雌肥育牛における連続生体卵子吸引が胚生産および肥育成績に及ぼす影響. 東日本家畜受精卵移植技術研究会報, 21: 38-39. 2005.
- 14) 秋山清・坂上信忠. 経膈採卵技術を用いたホルスタイン種泌乳初期牛からの胚生産. 東日本家畜受精卵移植技術研究会報, 25: 32-33. 2009.
- 15) 詫摩哲也・江副大輔・陣内孝臣・一丸仁. 牛受精卵の農家実証および関連技術の実用化試験(第14報), 佐賀県畜産試験場試験研究成績書, 44: 5-8. 2008.