

## 生体卵子吸引—体外受精技術による妊娠牛からの胚生産（続報）

中川 浩，安野僚太郎，福留信司，佐藤義政，大矢俊行  
新潟県農業総合研究所畜産研究センター

### Embryo production on OPU-IVF from pregnant dairy cows (continued report)

Hiroshi NAKAGAWA, Ryotaro YASUNO, Shinji FUKUDOME, Yoshimasa SATO and Toshiyuki OHYA  
Niigata Agricultural Research Institute Livestock Research Center

**要約** 前回我々は妊娠牛からの生体卵子吸引（OPU）による体外受精（IVF）胚作出について報告した。しかし、作出した IVF 胚の受胎事例は得られていたものの分娩まで至らなかった。そこで体外受精および培養方法を変更したところ、胚盤胞発生率は改善され 1 回の OPU で作出される胚盤胞数は  $1.8 \pm 0.9$  個、胚盤胞発生率は 18.2% となった。作出した胚盤胞を凍結保存後 8 頭、新鮮移植で 2 頭、合計 10 頭に移植したところ、新鮮胚移植した 2 頭のうち 1 頭が受胎した。受胎牛は妊娠期間 280 日を経て正常に分娩し、体重 41kg のメス産子が得られた。

我々は OPU および IVF の技術を改良することで胚生産の効率化を進めてきた。この中で妊娠牛からの IVF 胚生産技術に取り組み、一定の成果を得ている（中川ら 2011）。しかし、これまで妊娠牛からの胚の生産と妊娠例は得ていたものの、流産のため子牛の分娩にいたらなかった。そこで試験方法を再検討し、体外培養系を改良することで受胎、産子の分娩にまで至ることができたので報告する。

### 材料および方法

#### 1. 供試牛および試験期間

ホルスタイン種妊娠牛 7 頭（未経産牛 4 頭，経産泌乳牛 3 頭）を OPU に用いた。妊娠日齢は 59 日から 88 日齢であった。IVF 胚の作出および移植は 2012 年 3 月から 2013 年 5 月の間で行った。なお、試験に用いたウシは全て新潟県農業総合研究所畜産研究センター動物実験等実施規程に従って取り扱った。

#### 2. OPU 処理方法

OPU 実施牛には塩酸リドカイン（2%キシロカイン注射液，アストラゼネカ，大阪）の尾椎硬膜外麻酔を施した。17G の採卵針（COVA Needle，ミサワ医科工業，茨城）を装着した 7.5MHz プローブ（UST9109，Aloka，東京）

を実施牛の外陰部から腔内に挿入し，卵巣をプローブに押し当てながら，超音波画像診断装置（SSD1200，Aloka）で卵巣を確認し，採卵針を卵胞に穿刺して，吸引器（VACUUM PUMP MODEL4，富士平工業，東京）により卵胞液とともに卵子を回収した。回収時の吸引圧は，約 120mmHg とした。回収液は，10 単位/ml ヘパリンナトリウム注射液（ヘパリンナトリウム，富士製薬工業，東京），1% ウシ血清（Calf Serum，Life Technologies，アメリカ）および抗生物質（ベンジルペニシリン 100IU/ml とストレプトマイシン 100mg/ml）を加えた乳酸リンゲル液（ハルゼン V 注射液，日本全薬工業，東京）を用いた。

#### 3. 検卵方法

OPU 終了後，回収液を実験室内に搬入し，メッシュ付シャーレ（セルコレクター，ニプロ医工，東京）内で洗浄，濾過を行い，37.5°C 加温下で鏡検により卵子を回収した。

#### 4. 体外成熟培養，媒精，体外発生培養方法

成熟培養には，卵丘細胞が著しく膨化あるいは卵細胞質の著しく変性した卵子以外の全ての卵子を供した。培養液は 5% 新生子ウシ血清（NBCS，NEW BORN CALF SERUM，biowest，フランス）および 0.02AU/ml の FSH（アントリン R・10，共立製薬，東京）を加えた Medium199

Earle's (Life Technologies) を用い、5%CO<sub>2</sub>、95%空気、38.5℃の気相条件で22時間培養を行った。その後IVF100（機能性ペプチド研究所，山形）を用いて5%CO<sub>2</sub>、95%空気、38.5℃の気相条件で体外受精を6時間行った。精液は国内産の性選別精液を使用した。媒精後ただちに卵丘細胞をはがし、5%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>、90%N<sub>2</sub>、38.5℃の気相条件で5%NCS、0.25mg/ml リノール酸アルブミン（SIGMA，アメリカ）を加えたCR1aa（Rosenkransら1993）で9日間発生培養を行った。

### 5. 凍結保存及び移植方法

媒精日を0日として、9日目までに発生した胚盤胞期胚は、新鮮胚移植または凍結保存後に融解移植に供した。凍結は小出ら（2009）の方法に準じた。10%グリセリン、0.25M シュークロース、20%NBCSを加えた修正Medium199 Earle's (Life Technologies) を凍結媒液として胚と共にストロー中に封入し、封入後のストローを-6℃に設定したプログラムフリーザー（EYELA PROGRAM FREEZER MPF-1000，東京理化工機，東京）中で1分間保持したのち、植氷を行い、9分間保持してから毎分-0.33℃で-25℃まで冷却した後、さらに5分間保持し、液体窒素中に投入して保存した。凍結胚の移植時には凍結済みストローを空气中に6~10秒置いた後、30℃の温湯中に投入して融解し、常法により受胎牛の子宮角内に直接移植を実施した。

## 実験結果

### 1. 妊娠牛からの卵子回収成績

妊娠牛7頭、延べ11頭にOPUを実施した。OPU1回あたりの平均回収卵子数は未経産牛で8.4個、経産で13.3個であった。平均培養卵子数は未経産牛で7.4個、経産牛で12.0個であった（表1）。

表1 妊娠牛からのOPU成績

産歴の別	平均妊娠日齢	平均回収卵子数	平均培養卵子数
未経産 n=5	74.0±9.1 (59~82日齢)	8.4±3.0 (5~12個)	7.4±1.9 (5~10個)
経産 n=6	77.3±11.6 (60~88日齢)	13.3±5.7 (6~22個)	12.0±5.1 (6~21個)
合計 n=11	75.8±10.2 (59~88日齢)	11.1±5.2 (5~22個)	9.9±4.5 (5~21個)

平均±標準偏差

### 2. 卵子の体外成熟培養，媒成，体外発生成績

表2に示すとおりOPU1回あたり、成熟培養を行った未経産牛由来卵子7.4個のうち、体外受精後に分割した卵子の平均は2.6個（35.1%）であった。そのうち、胚盤胞まで発生したのは0.6個（8.1%）であり、移植に適す

と思われるAランクの胚盤胞も0.6個（8.1%）であった。一方、経産牛では成熟培養を行ったのは12.0個、分割したのは9.7個（80.6%）、胚盤胞まで発生したのは2.8個（23.6%）であった。そのうち、Aランクの胚盤胞は1.3個（11.1%）であった。

表2 体外培養、体外受精の成績

産歴の別	培養卵子数	分割卵子数	胚盤胞数	Aランク胚盤胞数
未経産 n=5	7.4±1.9	2.6±2.4 (35.1%)	0.6±0.9 (8.1%)	0.6±0.9 (8.1%)
経産 n=6	12.0±5.1	9.7±5.4 (80.6%)	2.8±3.7 (23.6%)	1.3±3.3 (11.1%)
合計 n=11	9.9±4.5	6.5±5.5 (65.7%)	1.8±2.9 (18.2%)	1.0±2.4 (10.1%)

平均±標準偏差

### 3. 移植成績

移植は延べ10頭のホルスタイン種に実施した。経産牛由来の凍結保存胚を当センター飼養牛4頭に1ないし3回、延べ8頭に移植したが、受胎例は得られなかった。一方、経産牛由来の胚を新鮮移植した2頭のうち1頭は受胎し、分娩に至った。未経産牛由来の胚は1頭のみ新鮮移植を行ったが、受胎しなかった（表3）。

表3 移植成績

ドナーの産歴	区分	移植頭数	受胎頭数	受胎率	分娩産子数
経産	凍結胚	8	0	0.0%	0
	新鮮胚	1	1	100.0%	1
未経産	新鮮胚	1	0	0.0%	0
	合計	10	1	10.0%	1

### 4. 移植により得られた産子

受胎したウシは妊娠期間280日で正常に分娩した（図1）。生まれた子牛の性別はメス、体重は41kgであった。



図1 この技術で生まれた子牛

卵子採取日：2013/4/22

IVF日：2013/4/23

移植日：2013/5/1（IVF8日目の胚を新鮮移植）

子牛の生年月日：2014/1/30

在胎日数：280日間

## 考 察

我々は過去にホルスタイン種妊娠牛 11 頭に延べ 70 回の OPU-IVF を実施し、流産などの事故も無く、多くの胚盤胞を作出できることを報告している（中川ら 2011）。このときの OPU1 回あたりの平均回収卵子数は  $4.2 \pm 3.2$  個であったが、今回の試験では  $11.1 \pm 5.2$  個と増加した。前回の試験では成熟培地として IVM D101 を、発生培地に IVD101（いずれも機能性ペプチド研究所）を用い、市販されている通常の凍結精液または性選別精液を用いて体外受精を行った。OPU1 回あたりの平均の培養卵子数、分割卵子数および胚盤胞数はそれぞれ 3.6 個、2.3 個および 0.5 個であったが、今回はそれぞれ 9.9 個、6.5 個および 1.8 個であり、培養卵子数、分割卵子数、胚盤胞数ともに増加した。一方、回収された卵子数に対する培養卵子数の割合は前回は 87.6%、今回は 89.3%であった。また今回は全ての IVF で性選別精液を用いたものの、分割卵子数の割合は今回は 65.7%と前回の 64.3%とほぼ同じ値となった。培養方法の変更により、一般的に分割率の低下する性選別精液による IVF でも分割率が低下しなかったと考えられる。そして最終的な胚盤胞数の割合は前回は 14.9%であったが、今回は 18.2%となり、若干の改善が見られた。Somfai ら（2010）は 5%ウシ血清を添加した CR1aa と IVD101 でウシ胚の培養成績を比較したところ、CR1aa で胚盤胞形成率が高かったと報告しており、今回の試験成績はそれを支持する結果となった。

OPU の時点で前回試験時よりも多くの卵子を回収できたことと、発生培養方法の変更によって胚盤胞発生率が改善されたことにより、OPU1 回あたりの胚盤胞発生数は大きく増加したと考えられる。

一方、未経産牛と経産牛で回収卵子数等を比較したところ、未経産牛で回収卵子数は少なく、媒精後の分割率も低かった。経産牛では分割率 80%であったが、未経産牛ではその半分以下の 35%であり、さらに胚盤胞への発生割合は低下し、経産牛で 23%であったものが、未経産牛では 8%であった。ただし、前回の試験、調査の結果、卵巣内卵胞数は産歴、飼料の粗濃比、および泌乳ステージなどの関連が示唆されている（中川ら 2011）。そのため、未経産妊娠牛の給与飼料に検討を加えることでより多くの卵子を回収し、受胎に至る IVF 胚をさらに多く作出できる可能性があると思われる。

作出した IVF 胚を凍結保存後に移植したのが 8 頭、新鮮移植したのが 2 頭であり、新鮮移植のうちの 1 頭が受胎、分娩に至ったが、凍結胚では受胎事例を得ることができなかった。我々は妊娠していない乾乳牛から今回と同様の方法で IVF 胚を作出、移植を行ったところ、例数は少ないものの 50%の受胎率であったことから（中川ら 2013）、今回の試験で受胎事例が得られるものと想定

していたが、そのような結果にはならなかった。しかし今後この技術が野外での応用に耐えられるものとなるようにするためには、凍結保存胚での受胎事例が必須であることから、さらに検討を進めていきたい。

## 引用文献

- 小出章子, 宮村元晴, 土屋秀樹, 井上洋一, 市岡英昭, 浜野清三. 2009. バイオブシーしたウシ体外受精胚の凍結保存および受胎性について（続報）. 第24回東日本家畜受精卵移植研究会大会講演要旨 25. 66-67.
- 中川邦昭, 瀬田剛史, 篠川 温, 中川 浩, 田村祐一. 2011. 生体内卵子吸引一体外受精技術による妊娠牛からの胚生産. 新潟県農総研畜産研究センター研究報告 17. 58-61.
- 中川 浩, 瀬田剛史, 福留信司, 佐藤義政, 佐藤義弘, 篠川 温, 稲葉泰志, 的場理子, 今井 敬, 下司雅也. 2013. 採卵困難となった高能力供胚牛から多排卵処置後に採取した体内成熟卵子および性選別精液を用いた体外受精胚生産事例. 第28回東日本家畜受精卵移植研究会大会講演要旨 29. 42-43.
- Rosenkrans C.F.JR. 1993. Development of Bovine Embryos In Vitro as Affected by Energy Substrates. *Biology of Reproduction* 49. 459-462.
- Somfai T, Inaba Y, Aikawa Y, Ohtake M, Kobayashi S, Konishi K, Nagai T, Imai K. 2010. Development of bovine embryo cultured in CR1aa and IVD101 media using different oxygen tensions and culture systems. *Acta Vet Hung.* 58(4). 465-474.