

ウシ体外受精に用いる卵母細胞数が胚盤胞期胚発生に及ぼす影響

安部茂樹 岡崎尚之¹⁾ 長谷川清寿

要約 ウシの体外受精において、卵母細胞数が胚盤胞期胚発生に及ぼす影響を調べるため、同一個体の卵巣から採取した卵母細胞を個体毎に区別し、体外成熟・受精・培養 (IVMFC) を行って、少数の卵母細胞からの体外受精胚の作出が可能か否かを、発生培養方法を検討することで調べ、少数の卵母細胞からIVMFCで発生した胚の受胎性についても併せて検討した。

培養方法の検討では、既報に従い体外成熟・体外受精の後、卵丘細胞をピペッティングにより剥離し、体外発生培養を3区に分け行った。すなわち、媒精終了から72時間目までCR1aa培養液で行い、以後11日目(媒精日 = 1日)までCR1aaで培養したCR1aa区、媒精72時間後からTCMで卵丘細胞との共培養を行ったCR1aa+TCM区および媒精終了から11日目まで、TCMで卵丘細胞と共培養を行ったTCM+TCM区とした。

卵母細胞数の検討では、IVMFCにおけるードロップ当たりの卵母細胞数を、10個までとし、10個以上の卵母細胞が採取された場合はドロップ数を増加させ実施した。

卵割検査は媒精72時間後に行い、また、胚盤胞期胚発生検査は媒精6~11日目までに発生した胚盤胞期胚の発生率を調べた。

CR1aa区、CR1aa+TCM区およびTCM+TCM区の卵割率は、それぞれ76.2%、82.4%および68.0%であり、CR1aa+TCM区の値はTCM+TCM区の値と比べ高率であった ($P < 0.01$)。また、胚盤胞期胚への発生率は、それぞれ、31.3% (46/147)、42.4% (108/255)、22.5% (62/275) であり、CR1aa+TCM区の発生率は、CR1aa区およびTCM+TCM区の発生率と比べ明らかに高率であった ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

卵母細胞数毎の成績は、11ドロップの卵母細胞数10個の卵割率は80.9% (89/110個) であった。5ドロップの卵母細胞10個以下の卵割率は65.5% (19/29個) であり、卵割率に差は認められなかった。また、胚盤胞期胚の発生は、10個のドロップからはドロップ当たり1.36個 (0~3個)、発生率13.6% (15/110個)、10個以下のドロップからはドロップ当たり1.25個 (0~1個)、発生率13.7% (4/29個) であり、これらの値に差は認められなかった。

10個以下のドロップから発生した4個の胚を移植し、1頭が受胎し、286日目に正常な雄子牛を得た。

以上の結果から、IVCにおいて、CR1aaとTCMを組み合わせれば、ドロップ内の卵母細胞数が少なくても、胚盤胞にまで発生することが明らかになり、また、発生した胚盤胞から正常な産子を得ることができた。

キーワード：ウシ 個体別体外受精 卵母細胞数 発生培養液 CR1aa

ウシの体外受精技術を種畜の改良に利用する場合、卵母細胞の由来が特定されている必要があることから、雌牛個体別の卵巣から卵母細胞の採取、体外成熟・受精・培養 (IVMFC) を実施しなければならない。この際の隘路となることは、IVMFCにおける同一ドロップに導入する卵母細胞数である。つまり、IVMFCを実施する場合、同一ドロップ内の卵母細胞数が少ない場合は胚盤胞期胚の発生率が低くなること^{1, 2, 5)} が報告されている。この問題を回避するため、体外受精胚生産実施機関の多くは、食肉処理場で処理された複数の雌牛の卵巣から採取した卵母細胞を、同一ドロップ内にプールしてIVMFC

を実施している。これは卵母細胞一個一個の個体識別を不可能にする原因であり、改良に本技術を応用するに当たってどうしても改善しなくてはならない点である。

そこで、同一個体の卵巣から採取した卵母細胞を卵母細胞数毎に区別し、IVMFCを行って、少数の卵母細胞からの体外受精胚の作出が可能か否かについて検討し、少数の卵母細胞からIVMFCで発生した胚の受胎性についても調べた。

なお、体外受精後の発生培養には、体外受精胚の発生率の改善を目的として、各種体細胞との共培養を必要としない合成培養液¹⁰⁾ (CR1aa) を用い、そ

の効果についても検討した。

材料および方法

卵巣からの卵母細胞の採取

食肉処理場で採取した卵巣は、個体毎に区別し、20 ℃に保持したPBSに抗生物質を加えた輸送液の入った保温瓶中に投入した。卵巣採取には開始から終了まで1～2時間を要し、さらに、食肉処理場から実験室まで約1時間かけて輸送した。

卵巣からの卵母細胞の採取は、卵巣表面の血液や脂肪を滅菌濾紙でふき取った後、18Gの滅菌注射針を装着した5 ml注射器で卵巣内の5 mm以下の小卵胞から卵胞液とともに卵母細胞を吸引採取するか、あるいは、外科用メス（フェザー社製、11）で卵巣表面の小卵胞を切開し、小匙により切開した小卵胞中の内容物とともに採取した。

卵母細胞の体外成熟、精子処理および媒精

体外成熟は、成熟培養液として10%CSおよび抗生物質を加えた25mM HEPES緩衝TCM-199 (TCM)を用い、100 μlの液滴とし、卵母細胞を導入し、流動パラフィンで覆い、39 ℃、5%炭酸ガス、95%空気の条件下で20時間行った。成熟培養液中への卵母細胞の導入は、発生培養法の検討では一ドロップ当たり概ね10個とし、また、同一個体からの卵母細胞を用いた場合は、10個以上の卵母細胞が採取された時にはドロップ数を増加させた。すなわち、15個の卵母細胞が採取されれば、10個および5個とし、採取数が21個では、10個を2ドロップと1個のドロップとした。

また、この成熟培養に用いた培養ディッシュおよび培養液は、成熟培養終了後も廃棄することなくそのまま炭酸ガス培養器内に静置し、媒精72時間後からの体外受精卵母細胞の発生培養液として用いた。なお、媒精72時間後からの体外受精卵母細胞の導入時には、ディッシュ底面には卵丘細胞のシートが形成されていた。

精子処理は、凍結精液を35 ℃の温湯中で融解後、Caf-BO液で2回遠心洗浄し、精子濃度を 1.0×10^7 精子/mlに調整した後、BSA-BOで等量希釈した。

媒精は、成熟培養20時間後の卵母細胞を受精培地に導入し、39 ℃、5%炭酸ガス、95%空気の条件下6時間培養することにより行った。

体外受精卵母細胞の発生培養および検査

体外発生培養は以下の2実験区について行った。

実験1. 初期胚の培養方法の検討：初期胚の体外発生培養は、媒精終了後卵丘細胞をピペッティングにより剥離し、3区に分け胚盤胞期胚への発生について検討した。すなわち、媒精終了から72時間目までCR1 aaに5%子牛血清を添加した培養液で培養し、以後は、媒精後11日目（媒精日 = 1日）までCR1 aaに子牛血清5%を加えた培養液で卵丘細胞との共培養することなく培養した（CR1 aa区）。また、媒精72時間目までCR1 aa区と同様に培養し、以後TCMに子牛血清を10%、抗生物質を加え100 μlの小滴とし卵丘細胞との共培養を流動パラフィンで覆い行った（以下CR1 aa+TCM区）。媒精終了から11日目まで、TCMに子牛血清を10%、抗生物質を加えた培養液で卵丘細胞と共培養を行った（TCM+TCM区）。

卵割検査は、媒精72時間後に行い、2細胞以上および8細胞以上へ卵割した胚を調べた。胚盤胞発生検査は媒精6日目（媒精日 = 1日）から11日目まで24時間間隔で行い、この期間に発生した胚盤胞の発生率を調べた。

実験2. 卵母細胞数毎の検討：同一個体毎に区分し実施した初期胚の発生培養は、CR1 aa+TCM区と同様とし、卵割検査および胚盤胞期胚の発生検査は実験1と同様に実施した。発生した胚盤胞期胚は、新鮮胚として3個、凍結胚として16個を発情後7日目の受胎牛19頭に移植した。

実験1および2における卵割率および胚盤胞への発生率の有意差検定は、 χ^2 検定を行い各区間の成績を比較した。

結 果

初期胚の培養方法について検討した実験1の成績は、表1に示した。CR1 aa+TCM区、CR1 aa区およびTCM+TCM区の卵割率は、それぞれ82.4%、76.2%および68.0%であり、CR1 aa+TCM区の値はTCM+TCM区の値と比べ高率であった（ $P < 0.01$ ）。媒精6日目～11日目までの胚盤胞期胚への発生率は、CR1 aa+TCM区では42.4%（108/255）、CR1 aa区では31.3%（46/147）およびTCM+TCM区では22.5%（62/275）であり、CR1 aa+TCM区の発生率はCR1 aa区およびTCM+TCM区の発生率と比べ明らかに高率であった（ $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ ）。

小数の卵母細胞から発生した胚盤胞期胚の受胎性確認のために実施した実験2の成績は、表2に示した。供試牛の卵巣から卵母細胞採取数は、13個から50個（平均29.5個）であり、個体により差が認めら

れた。媒精72時間後の2細胞以上への卵割率は、65.0% (13/20個) から84.2% (16/19個) の範囲であった。媒精後6日から11日目までの供試した個体別の胚盤胞発生率は、8.3% (2/24個) から22.9% (8/35個) であった。

これらの成績を、ドロップ毎に検討した成績を表3に示した。11ドロップの卵母細胞数10個の卵割胚数は89個であり、卵割率は80.9% (89/110個) であった。5ドロップの卵母細胞2から9個の卵割胚数は19個であり、卵割率は65.5% (19/29個) であった。胚盤胞期胚の発生は、10個のドロップからは最大3個発生し、ドロップ当たり1.36個、発生率13.6% (15/110個)、10個以下のドロップからは最大1個発生し、ドロップ当たり1.25個、発生率13.7% (4/29個) であった。

10個以下あるいは10個のドロップから発生した胚盤胞の移植成績は表4に示した。10個以下のドロップから発生した4個の胚を移植し、1頭が受胎、その受胎率は25.0%であり、また、10個のドロップから発生した15個の胚を移植し、7頭が受胎、その受胎率は46.7%であった。

考 察

ウシの体外受精において、個体別の体外受精胚作出についてはいくつかの報告^{1, 2, 5)}があるが、IVMFCにおける培養ドロップ内へ導入した卵母細胞数の違いによる卵割率、胚盤胞期胚への発生率について、系統的に調べた報告はない。Funahashiら¹⁾およびMermillodら⁵⁾は、卵巣毎に採取される卵母細胞数と胚盤胞期胚への発生数および発生率を比較し、卵母細胞の採取数が多い卵巣ほど胚盤胞期胚への発生数およびその率が高くなるが、これは、TCM共培養系での体外発生培養では、発生培養液量当たりの発生培養胚数が少ないと胚盤胞への発生率が著しく低率になることによると報告している。しかし、今回の成績では、発生培養液をCR1aa+TCMを用いたところ、培養ドロップ内へ導入した卵母細胞の数による卵割率および胚盤胞発生率にも差が認められず、発生培養液量当たりの培養胚数の多少にかかわらず、比較的安定かつ効率的

表1 体外発生培養液の違いが体外受精胚の発生に及ぼす影響

発生培養液		供 試 卵 母 細胞数	卵割 胚数 (%)	胚盤胞 期胚数 (%)
媒精72時間 前	後			
CR1aa	TCM	255	210 (82.4) ^a	108 (42.4) ^a
CR1aa	CR1aa	147	112 (76.2)	46 (31.3) ^b
TCM	TCM	275	187 (68.0) ^c	62 (22.5) ^c

異符号間に有意差(a,c;p<0.01, a,b;p<0.05, b,c;p<0.05).

表2 体外成熟・受精・発生培養に用いる卵母細胞数が胚発生に及ぼす影響

供試 牛	供 試 卵 母 細胞数	培 養 液 当 り の 卵 母 細胞 数	卵割胚数 (%)	胚盤胞期胚数 (%)
1	24	10	8(80.0)	1(10.0)
		10	9(90.0)	1(10.0)
		4	2(50.0)	0(0.0)
		24	19(79.2)	2(8.3)
2	19	10	9(90.0)	1(10.0)
		9	7(77.8)	1(11.1)
		19	16(84.2)	2(10.5)
3	29	10	9(90.0)	2(20.0)
		10	7(70.0)	0(0.0)
		9	6(66.7)	1(11.1)
		29	19(75.9)	3(10.3)
4	12	10	8(80.0)	1(10.0)
		2	1(50.0)	1(50.0)
		12	9(75.0)	2(16.7)
		10	7(70.0)	2(20.0)
5	35	10	9(90.0)	3(30.0)
		10	10(100.0)	2(20.0)
		5	3(60.0)	1(20.0)
		35	29(82.9)	8(22.9)
6	20	10	8(80.0)	1(10.0)
		10	5(50.0)	1(10.0)
		20	13(65.0)	2(10.0)
計		139	108(77.7)	19(13.7)

表3 培養液当たりの卵母細胞数毎の体外受精胚の発生成績

培 養 液 当 り の 卵 母 細胞 数	供 試 培 養 液 数	卵割胚数 (%)	胚盤胞期 胚数 (%)
10	11	89 (80.9)	15 (13.6)
9	2	15 (83.3)	2 (11.1)
5	1	3 (60.0)	1 (20.0)
4	1	2 (50.0)	0 (0.0)
2	1	1 (50.0)	1 (50.0)

表4 培養液当たりの異なった卵母細胞数毎に発生した胚盤胞期胚の移植成績

培 養 液 当 り の 卵 母 細胞 数	移 植 胚 の 由 来	移 植 頭 数	受 胎 頭 数	受胎率	備 考
10	Fresh	3	2	66.7	雄2頭生産
	Frozen	12	5	41.7	雄3、雌2頭
2-9	Fresh	1	0	0.0	
	Frozen	3	1	33.3	雄1頭生産
	Total	19	8	42.1	

に胚盤胞の作出が可能であった。

体外受精後の初期胚の発生培養は、卵丘細胞との共培養で培養液はTCMが用いられてきた。小西ら³⁾は、TCMおよびCR 1 aaの2種類の培養液を用い、体外受精卵母細胞の胚盤胞への発生率の比較を行い、体外受精48～72時間までの初期胚の発生培養には、各種細胞の共培養を必要としない合成培地であるCR 1 aaが、基礎培養液として適していることを報告した。今回の成績においても同様であり、体外発生培養において、媒精終了後から72時間目まではCR 1 aaを用いた場合の卵割率は、媒精終了後からTCMで卵丘細胞との共培養を行った場合の卵割率と比べ明らかに高率であった。TCMの卵割率が、CR 1 aa培養液に比べ低率であった理由としては、TCM中に含まれるグルコースが、ウシ初期胚の発育を阻害する^{4, 12)}ことが報告され、これは、TCM中のグルコース濃度が、ウシの卵管内濃度(0.05～0.2mM)より高いため、受精直後の受精卵から8細胞期までの胚はグルコースをエネルギー源として代謝できない⁸⁾ことにより、発育を阻害されたためと考えられる。CR 1 aa培養液中には、TCMに比べると、グルコースが含まれないこと、また、無機塩類の種類も少なくより単純な組成であることから、CR 1 aa培養液は体外受精後の初期発生培養液として、TCMと比べ優れていると思われる。

今回の成績の8細胞期胚から胚盤胞への発生率は、媒精72時間後に培養液をCR 1 aaからTCMに変え卵丘細胞と共培養したCR 1 aa+TCM区の値がCR 1 aa区およびTCM区の値と比べ高率であった。8細胞期以後の胚は、グルコースを代謝できる酵素活性が発現し、胚盤胞への発生率は、グルコースを全く含まない培養液と比べグルコースを含んだ培養液が高率である⁹⁾ことが報告されている。また、体外発生培養時の酸素濃度は、ウシ体外受精初期胚の発生に影響し、発生培養時の酸素の濃度を大気中の酸素濃度である20%から5～10%に減少させると胚の発生率が向上する^{7, 13, 14)}ことが報告されている。すなわち、長尾ら⁶⁾は、体外発生培養条件での気相について、卵丘細胞との共培養系、または非共培養系で体外発生培養器内の酸素濃度を変え胚盤胞への発生率を検討し、共培養系では通常の大気中の酸素濃度(約20%)での発生率が33.0%であり、低酸素濃度(5%)での発生率4.0%に比べ明らかに高率であり、これとは逆に、非共培養系では低酸素濃度での胚盤胞発生率(30.0%)が高酸素濃度での発生率(5.0%)と比べ高率であったと報告している。また、体

外発生培養で顆粒層細胞の無血清培養上清液には、共培養と同様の胚発生促進作用が認められる¹¹⁾ことも報告されている。従って、本試験の8細胞期胚から胚盤胞への発生率が非共培養系のCR 1 aa区と比べCR 1 aa+TCM区で高率であったのは、共培養することにより卵丘細胞がTCM培養液中に含まれる過剰なグルコースを消費し、胚にとっての至適濃度に調整したこと、胚への発生促進作用を有していたことおよび培養液中の酸素を消費することによって20%の濃度から生体内の濃度(5%)に低下させたことによると思われる。

個体識別した雌牛卵巣の卵母細胞を用い、体外受精により発生した胚盤胞を移植し、個体識別の可能な産子を得た報告⁵⁾は少なく、また、生産された子牛を個体識別のために登録した報告はない。今回の10個のドロップおよび10個以下のドロップから発生した胚盤胞期胚を移植し、生産した子牛は、卵母細胞一個一個の個体識別が可能であったことから、個体識別のために登録することができた。

以上のことから、体外受精後の初期胚の培養において、体細胞との共培養を必要としない5%CS添加のCR 1 aa培養液で媒精72時間後まで培養することにより、卵割率および胚盤胞への発生率が、従来のTCMと卵丘細胞との共培養系と比較し高率になることが明らかとなった。この体外受精系を用いた場合、発生培養ドロップ内の体外受精卵母細胞の導入数が少なくても、安定的に胚盤胞が発生することを確認することができた。さらに、発生した胚盤胞期胚から正常な産子を得ることもできた。

従って、今回行った個体別の体外受精技術を応用すれば、今後、屠畜される優良雌牛からの産子を得ることができ、また、得られた産子は、雌雄の由来が明らかなることから血統登録も可能となり肉用牛の改良にも貢献できることが示された。

文 献

- 1) Funahashi H., et al., *Theriogenology*, 36:427-434, 1991.
- 2) 後藤和文ら, *家畜繁殖誌*, 36:110-113, 1990.
- 3) 小西正人ら, *家畜繁殖誌*, 40:j1-j4, 1994.
- 4) 松本光晴ら, *J.Mamm.Ova Res.*, 16:73-76, 1999.
- 5) Mermillod P.C., et al., *J. Reprod. Fert.*, 96:717-723, 1992.
- 6) 長尾慶和ら, *J. Reprod. Dev.*, 41:j29-j36, 1995.
- 7) Nakao H. et al., *Theriogenology*, 33:591-600,

- 1992.
- 8) Pinyopummintr T. et al., Biol. Reprod., 45:736-742, 1991.
- 9) Rieger D., et al., J. Reprod. Fert., 95:585-595, 1992.
- 10) Rosenkrans C.F. et al., Theriogenology, 35:266 (Abstr.), 1991.
- 11) Takagi Y., et al., J.Mamm.Ova Res., 12:15-21, 1995.
- 12) Takahashi Y. et al., Theriogenology, 33:669-675, 1992.
- 13) Tervit H. R., et al., J. Reprod. Fert., 30:493-497, 1972.
- 14) Voelkel S.A. et al., Theriogenology, 37:1117-1131, 1992.