

黒毛和種牛における生体内卵子の効率的採取および体外受精成績の向上に関する検討

長谷川清寿 澤 香代子 佐々木恵美¹⁾ 高仁敏光²⁾ 岡崎尚之

要約 経膈採卵（OPU）におけるウシ生体内卵子の効率的採取および体外受精（IVF）成績の向上を目的に、大卵胞の存在がOPU-IVF成績に及ぼす影響を調査するとともに、卵胞波をコントロールした黒毛和種経産牛を用いてOPUを実施する時期を検討した。OPU時の長径8mm以上の卵胞（大卵胞）の有無と卵丘細胞-卵子複合体（COC）採取成績およびIVF成績について調査した結果、大卵胞の観察されない個体群（大卵胞無、 $n=6$ ）でOPU1回あたりの平均採取COC数および平均発生胚盤胞数は29.2個および6.8個であったのに対し、大卵胞を有する個体群（大卵胞有、 $n=32$ ）では20.9個および3.9個であった。さらに、プロスタグランジンF₂ α および性腺刺激ホルモン放出ホルモン製剤（Gn-RH）を用いた発情排卵誘起処理により新たな卵胞波を生じさせた供卵牛（ $n=9$ ）を供試して、OPU時期の検討を試みた。Gn-RH処理（Day0）後3日目（Day3区）および5日目（Day5区）にOPUを実施した結果、OPU1回あたりの平均採取COC数および平均発生胚盤胞数は、Day3区が17.9個および2.0個、Day5区が17.0個および2.3個、無処理の対照区が15.7個および2.6個で、各区の間で差は認められなかった。以上のことから、OPU時の大卵胞の存在はOPU-IVF成績にマイナスの影響を与えている可能性が推察されたが、発情排卵誘起処理を用いた卵胞波コントロール後の2つのOPU時期（Day3およびDay5）では、いずれもCOC採取やIVFによる胚盤胞発生への明らかな向上効果は認められなかった。

キーワード：ウシ 黒毛和種 OPU IVF 発情排卵誘起

近年、生体卵巣から直接卵子を吸引採取する経膈採卵（ovum pick up：OPU）技術によって、ウシの生体内卵子は体外受精（in vitro fertilization：IVF）技術との組み合わせ（OPU-IVF）で遺伝資源として活用することが可能となっている。元来、OPU-IVFは人医領域における不妊治療の一手法¹⁾として開発され、ウシへの応用が図られた²⁾。その後、特定個体からの産子生産の新たな手法としてクローズアップされ、これまでに国内外で様々な知見が蓄積されてきた^{3,4)}。OPUの利点の一つとしては胚生産が継続的に行えることであり、また、育種改良の観点からみれば優良雌牛の種畜利用としての可能性を拡大できることである。OPU-IVF技術については、連続したOPUでの採取卵子数の減少、発生率のバラツキ、流産や過大子、胚の超低温保存法の改善などのいくつかの課題が指摘されており⁵⁾、体内胚移植や食肉処理場卵巣由来卵子のIVF胚移植と比べて、フィールドでの実用例がそれほど多くないのが現状である⁶⁾。

OPU-IVF技術のフィールドでの実用化に向けては、供卵牛として農家繋養牛を想定した場合に必ずしも連続的なOPUができる状況にはならないこと、

そして、仮にOPUを連続して行うことができて、採取卵子数や採取卵子の品質が低い場合には、移植可能胚が十分確保されず子牛が効率的に生産できないといった問題点が生じ、これらは実用化の障壁になる。OPU1回あたりの採取卵子数については、供卵牛のコンディション、採取間隔、技術レベルなどの要因で大きく変動することが知られている^{3,7)}。最近、Mertonら⁸⁾がOPUの間隔と胚発生成績を詳細に検討して、OPU時に存在する主席卵胞が卵子の胚発育能にマイナス効果を及ぼすことを示唆した。

そこで、我々は、供卵牛をOPU時の大卵胞の有無で区分してOPU-IVF成績に違いがあるかどうかを比較検討した。そしてさらに、プロスタグランジンF₂ α （PG）と性腺刺激ホルモン放出ホルモン製剤（Gn-RH）を用いた発情排卵誘起処理⁹⁾によって生じさせた新たな卵胞波に応じたOPUを行い、大卵胞の存在がOPU-IVF成績に影響を及ぼすかどうかを調べた。

材料および方法

実験1

供試牛は、同一飼養環境下で飼育中で正常発情周

現所属：¹⁾ 東部農林振興センター出雲家畜衛生部

²⁾ 西部農林振興センター益田家畜衛生部

期が確認された2から16歳の黒毛和種経産牛 (n=38) を用いた。発情周期の任意の時期に、超音波画像 (Aloka; SSD-1200) で長径2 mm以上の卵胞数を算定し、同時に長径8 mm以上の卵胞を大卵胞として計数後、大卵胞の有無で供試牛を2区分してOPUを行い、COC採取およびIVF成績を比較した。OPUは既報¹⁾に従って行い、超音波画像で観察可能な卵胞は全て吸引対象とした。採取した卵丘細胞-卵子複合体 (cumulus oocyte complex: COC) は、Haslerらの評価¹⁾に基づいて明らかに変性したCOCを除き、個体別に成熟培養を行った。成熟培養は、5% CO₂、95% 空気の気相条件下の5% 子牛非働化血清を添加したTCM199培地 (GIBCO) 内で22から23時間行った。成熟培養後のCOCは、5 × 10⁶/mlに濃度調整した凍結融解精子ドロップ内で6時間の媒精処理を行った後、卵子周囲に付着している卵丘細胞を除去し、5% CO₂、5% O₂、90% N₂の気相条件下の改変TCM199培地 (IVD101; 機能性ペプチド研究所)¹²⁾ で7日間体外培養して胚発生を観察した。

実験2

供試牛は、同一飼養環境下で飼育中で正常発情周期が確認された3から14歳の黒毛和種経産牛 (n=9) を用いた。OPU前の卵胞波のコントロールを目的とした発情排卵誘起処理は、発情周期5から15日目にPG (ジノプロストとして15mg)、その48時間後にGn-RH (酢酸フェルチレリンとして100 μg) を投与 (Day0) した。試験区は、Gn-RH投与後3日目 (Day3区) および5日目 (Day5区) にOPUを行った。対照区では、発情周期の任意の時期にOPUを行った。供試牛は任意に3頭ずつの3グループに分別し、1か月間隔で2試験区および対照区の適用順序をグループごとに入れ替えてOPUを行った。

OPU、成熟培養、媒精および発生培養は、実験1と同じ方法を用いた。ただし、媒精には同一種雄牛由来かつ同一採取ロットの凍結精液を用いた。調査項目は、OPU時の計測卵胞数 (小卵胞: 2 mm以上5 mm未満、中卵胞: 5 mm以上8 mm未満、大卵胞: 長径8 mm以上)、採取COCの数と品質およびIVF後の胚発生成績とした。

統計処理

各区分間の成績比較にかかる統計処理は、t検定 (student's t-test) またはχ²検定を用いた。

成 績

実験1

供試牛は、OPU時に大卵胞が観察されない個体群 (n=6) および観察された個体群 (n=32) に区分した (表1)。供試牛1頭あたりの総卵胞数、採取COC数、IVF供試数、体外培養後の卵割数および胚盤胞数は、両群間に明らかな差は認められなかったが、大卵胞が観察されない個体群でいずれも多い傾向であった。また、COC採取率および胚盤胞発生率についても、両群間に明らかな差は認められなかったが、大卵胞が観察されない個体群で高率傾向であった。

実験2

OPU時に卵胞数 (/OPU、mean±SD) を計測した結果 (図1)、総卵胞数はDay3区が26.3±10.0個、Day5区が22.4±7.8個、対照区が24.2±9.7個であり、有意差は認められなかった。サイズ別の卵胞数は、中卵胞数についてDay3区 (6.7±3.4個) がDay5区 (3.2±2.8個) と比べて有意に多かった (P=0.02)。小卵胞数および大卵胞数については各区分間で差は認められなかったが、Day3区の大卵胞数 (0.4±0.5個) はDay5区 (1.9±1.5個) と比べて少ない傾向であっ

表1 OPU時の大卵胞の有無区分別のOPUおよびIVF成績

大卵胞の有無 による区分	OPU		IVF		
	総卵胞数	採取COC数	供試卵数	卵割卵数	胚盤胞数
無 (n=9)	32.3±17.3	29.2±18.6 (90.2) ¹⁾	20.0±12.3	13.0±13.4 (65.0) ²⁾	6.8±11.0 (34.2) ²⁾
有 (n=32)	27.4±9.3	20.9±12.3 (76.1) ¹⁾	13.8±8.5	9.3±7.6 (67.0) ²⁾	3.9±4.7 (28.2) ²⁾

表中の () 内の数値は、¹⁾ 総卵胞数に占める割合 (%), ならびに ²⁾ 供試卵数に占める割合 (%) を示す。

た。OPUによるCOC採取成績（図2）について、採取COC数（/OPU、mean±SD）は、Day3区が17.9±12.9個、Day5区が17.0±11.6個で、対照区が15.7±13.5個であった。採取COCに対する変性COCの割合は、Day3区が22.4%（34/161）、Day5区が19.6%（30/153）であり、対照区は17.0%（24/141）であった。これらのCOC採取に関する調査項目において、各区の数値間に有意差は認められなかった。IVF後の胚発生を調べた結果（表2）、卵割率および胚盤胞発生率、さらにOPU1回あたりの卵割数および胚盤胞数についても、差は認められなかった。

考 察

現在、島根県内では、ウシ胚移植技術の普及定着に伴い、高い経済形質を有する種畜の高度利用に取り組む産地の増加、酪農経営の収入源としての和牛胚移植の要望の急増などによって、移植に用いる胚の不足が生じている。これまで20年余りにわたって普及定着化を進めてきたSOVによる体内胚の採取・利用に加えて、OPU-IVFによって生産される体外胚の移植が高位安定的な生産技術として普及できれば、技術の選択肢が増え、生産現場の要望に応じていくことができる。そして、広域的な活用が可能となれば、優良な経済形質を有する雌牛の活用が加速されるとともに、地域や農場における改良進捗が

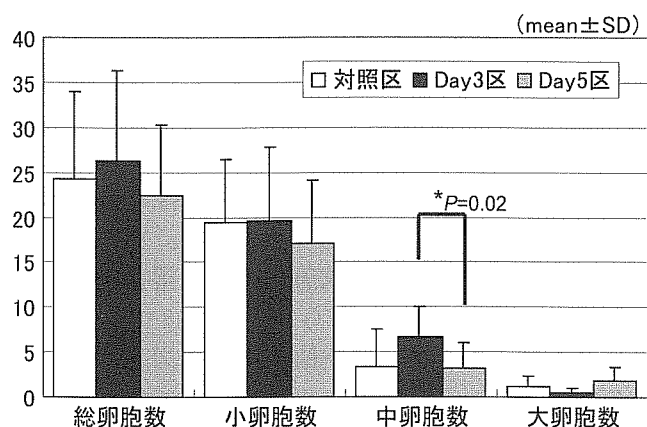


図1 OPU時期別の推定卵胞数

OPU時期区別に、OPU時の卵胞数を示す。卵胞数の区分は、小卵胞が長径2mm以上5mm未満、中卵胞が長径5mm以上8mm未満、大卵胞が8mm以上。

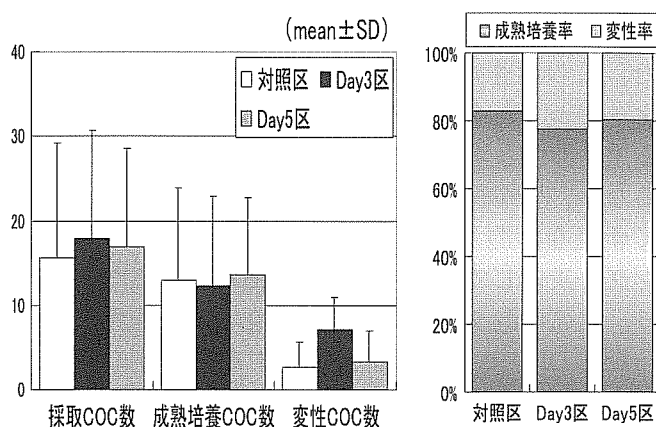


図2 OPU時期別のCOC採取成績

左図はOPU時期区別にOPU1回あたりのCOC数を示し、右図は、採取COC数に占める成熟培養可能COCおよび変性COCの割合を示す。

表2 OPU時期別のIVF成績

調査項目	対照区		Day3区		Day5区	
	n	n/OPU (mean±SD)	n	n/OPU (mean±SD)	n	n/OPU (mean±SD)
供試卵子	108	12.0±10.7	113	12.6±9.3	113	12.6±8.1
2cell≤ (%)	47 (43.5)	5.2±5.6	48 (42.5)	5.3±4.1	35 (31.0)	3.9±2.8
8cell≤ (%)	26 (24.1)	2.9±3.8	22 (19.5)	2.4±3.2	21 (18.6)	2.3±1.9
胚盤胞 (%)	23 (21.3)	2.6±3.2	18 (15.9)	2.0±2.5	21 (18.6)	2.3±1.9

OPU時期区別にIVF後の発生成績を示す。表中()内の数値は、供試卵子数に対する割合。

し、結果的に農場経営に寄与できると考えられる¹³⁾。

我々はまず、OPU 1回あたりの採取卵子数および移植可能なIVF胚の発生数を増加させるため、OPU時の大卵胞の有無が卵子採取成績や発生成績に影響を及ぼしているかどうかを調査した(実験1)。その結果、明らかな差は認められなかったものの、OPU時に大卵胞が存在しない場合に採取卵子数および発生胚数が多い傾向であり、Gibbonsら¹⁴⁾あるいはMertonら⁸⁾の指摘と同様な結果となった。ただし、OPU時に存在した大卵胞が主席卵胞として機能していたかどうかについては、卵胞波の観察を行っていないため不明であった。しかしながら、今回の成績から、OPU時に大卵胞が存在しない供卵牛を用いれば、COCが比較的多く採取され、移植可能な胚盤胞も多く得られる可能性があるかと推察した。この調査結果を踏まえ、我々は、仮にOPUのターゲットとする卵胞内卵子の品質が卵巣に存在する主席卵胞と考えられる大卵胞の影響を受けるとするならば、発情誘起と排卵処理で卵胞波をリセットして新たな卵胞波を生じさせた上で、OPUのタイミングを設定して検討する必要があると考えた。つまり、主席卵胞を含む大卵胞が存在する可能性の高い時期のOPU-IVF成績が、存在する可能性の低い時期と比べて良好であった場合、大卵胞の有無を想定したOPU時期の最適化が図れることになると推測した。

そして今回、OPUの実施時期について、主席卵胞が選択されていない時期としてGn-RH投与後3日目 (Day3)、そして主席卵胞がすでに選択されている時期としてGn-RH投与後5日目 (Day5)を設定して、無処理の対照区との比較を試みた(実験2)。実際に、Day5と比べてDay3では、明らかにOPU時に中卵胞数が有意に多く、大卵胞が少ない傾向であったことから、主席卵胞の選択前で大卵胞の出現頻度が低い時期と考えられた。結果的に、卵胞波コントロールを行った供卵牛に対してDay3およびDay5でのOPUを行ったが、COC採取およびIVF胚発生に関してはいずれも対照区との差は認められず、特定のOPU時期によるポジティブな効果は確認されなかった。そして、発情排卵処理におけるGn-RHの投与量⁹⁾が影響し、その投与量を減じた場合に有意な効果が確認できた可能性も考えられたが、明らかな根拠は見いだせなかった。ただし、Gibbonsら¹⁴⁾、Mertonら⁸⁾およびImaiら⁵⁾はいずれも共存する主席卵胞の影響を示唆していることから、実験例数を増やすか、あるいはクローンのような相似性の高い個

体^{15,16)}を用いて検討すれば、明らかな成績差が認められた可能性も否定できない。よって、今回と同様の検討を行う場合には、COCの外見的評価やIVF発生成績に加えて、COCの比重¹⁷⁾、卵丘細胞のアポトーシスの出現¹⁸⁾などの評価法も追加する必要があるかもしれない。

これまでに他の研究者も、OPU-IVF成績の向上につなげるためのOPU前処理プログラムを種々検討している。それらの主体となるのは、前処理プログラムを考案、改良して、体外胚の効率的な確保につなげる試み¹⁹⁻²³⁾である。その中で、早坂ら²⁴⁾はOPU6日前のエストラジオール (EB) 製剤投与で発育型の卵胞群を誘起でき、その結果として採取COCの品質と胚発生成績を向上させることが可能であると述べている。我々も、黒毛和種牛にOPUの48時間前に卵胞刺激ホルモンあるいはGn-RHを投与して、非投与群との成績比較を行い、形態的なCOC品質と胚盤胞発生率の向上の可能性を示唆した²⁵⁾。しかし、いずれも再現性の高い確実な手法として提案されるまでには至っていない。別の角度から、供卵牛の栄養状態を改善すべきと指摘する研究者²⁶⁾もいる。最近、Leroyら¹⁸⁾はパルミチン酸、ステアリン酸などの血中脂肪酸がウシのストレス状態を反映し、パルミチン酸を成熟培地に添加した場合での卵子成熟やIVF後の胚発生の低下を報告した。このような脂肪酸の動向に加え、他の検査可能なパラメータも組み合わせて分析し、農場全体の飼養管理の改善を誘導することによって、供卵牛からの採取COC数やIVFでの胚盤胞の発生数を向上させるようなことが可能になるかもしれない。それはまた、IVF胚のフィールドでの受胎率の高位安定化に向けたヒントにもなる可能性がある。

参 考 文 献

- 1) Gleicher N., et al. *Lancet*. 27: 508-509, 1983.
- 2) Pieterse M.C., et al. *Theriogenology*. 27: 751-762, 1988.
- 3) 今井 敬・田川真人. 日本胚移植学雑誌, 28: 29-35, 2006.
- 4) Leeuw A.M.W., et al. *Theriogenology*. 65: 914-925, 2006.
- 5) Imai K., et al. *Journal of Reproduction and Development*. 52: S19-29, 2006.
- 6) 今井 敬. 畜産技術, 2: 14-18, 2008.
- 7) 今井 敬. ETニュースレター, 29: 1-7, 2005.
- 8) Merton J.S., et al. *Theriogenology*. 59: 651-674,

- 2003.
- 9) Sato T., et al. *Journal of Reproduction and Development*. 51: 573-578, 2005.
- 10) 長谷川清寿ら. 島根県立畜産試験場研究報告, 35: 1-4, 2002.
- 11) Hasler J.F., et al. *Theriogenology*. 43: 141-152, 1995.
- 12) Abe H. and Hoshi H. *Journal of Reproduction and Development*. 49: 193-202, 2003.
- 13) 轟木淳一. 日本胚移植学雑誌, 28: 44-47, 2006.
- 14) Gibbons J.R., et al. *Theriogenology*. 42: 405-419, 1994.
- 15) 長谷川清寿ら. 島根県立畜産試験場研究報告, 36: 33-37, 2003.
- 16) Yonai M., et al. *Journal of Dairy Science*. 88: 4097-4110, 2005.
- 17) Yotsushima K., et al. *Journal of Reproduction and Development*. 53 :971-976, 2007.
- 18) Leroy J.L.M.R., et al. *Reproduction*. 130: 485-495, 2005.
- 19) Blondin P., et al. *Biology of Reproduction*. 66: 38-43, 2002.
- 20) Algriany O., et al. *Theriogenology*. 62: 1483-1497, 2004.
- 21) Berlinguer F., et al. *Theriogenology*. 65: 1099-1109, 2006.
- 22) Chaubal S.A., et al. *Theriogenology*. 65: 1631-1648, 2006.
- 23) Chaubal S.A., et al. *Theriogenology*. 67: 719-728, 2007.
- 24) 早坂駿哉. 日本胚移植学雑誌, 28: 94-101, 2008.
- 25) 岡崎尚之ら. 島根県立畜産試験場研究報告, 36: 12-15, 2003.
- 26) Fouladi-Nashta A.A., et al. *Biology of Reproduction*. 77: 9-17, 2007.