

## 2. 卵巣採材から成熟培養開始時までの未成熟卵子の処理法

酪農科：中里 敏<sup>1)</sup>・小笠原俊介  
谷山 敦・松尾 信明  
(<sup>1)</sup>現 畜産課)

### 要 約

牛海綿状脳症 (BSE) 検査終了までの待機時間を利用し食肉処理場内で卵子を処理することで、卵巣採材から成熟培養開始時までの時間を短縮できる。また、卵子の輸送液に20%牛血清 (CS) 加HEPES緩衝TCM 199を用いることで良好な卵子成熟が得られ、その後の体細胞クローン胚の体外発生も正常である。

### 目 的

クローンや体外受精技術に用いるための未成熟卵子の吸引採取は、屠殺後できるだけ短時間 (少なくとも5時間以内) に行うこと<sup>1)</sup>とされている。

しかし、国内でのBSEの発生により、食肉処理場では全頭検査が始まったため、検査終了までは内臓等の場外持ち出しが禁止となった。したがって、卵巣の採材後、検査終了時まで処理場内で待機し、その後、当场実験室まで卵巣を輸送した場合、採材後の時間の経過とともに卵子の成熟率が低下し、ひいてはクローン胚の発生率も低下することが予想される。

このため、卵巣採材後、検査終了までの待機時間を利用して処理場内で卵子を吸引・選別し、これを専用の輸送器で保温 (38.0℃) しながら実験室まで輸送した場合の輸送用培地について検討するとともに体細胞クローン胚の発生成績についても従来の方法と比較検討した。

### 方 法

食肉処理場で屠殺直後の牛卵巣を採取し、魔法瓶内で37℃に保温した生理食塩水 (ペニシリン10万単位/ℓ, ストレプトマイシン100mg/ℓ添加) に浸漬して食肉処理場内の実験室に持ち帰り、一旦保管した後、検査終了予定の約2時間前から作業を開始した。

まず、新しい生理食塩水で卵巣を洗浄後、ビーカーに入れ37℃の水槽中に保温した。次に、卵巣を1個ずつペーパータオル上で転がし水分や血液等を除

去した後、2~7mmの小卵胞から18Gの注射器で卵胞卵子を吸引採取し、尖底試験管に移してストックした。これをピペットで実体顕微鏡下のシャーレに移し、マウスピースを付けたパスツールピペットで卵子を集め、培地にストックした。その後、2~3枚の培地を用いて洗浄し、卵子を30~40個ずつ0.25mlストローに吸引し、専用の輸送器で38℃に保温しながら当场の実験室まで輸送した。なお、培地は20%CS加HEPES緩衝TCM 199または10%CS加TCM 199を用いて、それぞれ輸送前後のpH及び卵子の成熟率を比較した。

持ち帰った卵子は10%CS加TCM 199を用いて500μℓ当り約50個ずつの卵子を投入し、炭酸ガス培養器内 (38.5℃, 5%CO<sub>2</sub>, 95%空気下) で18~20時間成熟培養した。なお卵子は緊密な卵丘細胞が付着し、細胞質が均一なもののみを培養に供した。成熟培養後は0.1%ヒアルロニダーゼ液に移し、ボルテックス、ピペッティング操作により卵丘細胞を剥離した後、第1極体の放出された卵子を選別し、既報のとおり<sup>2)</sup>、体細胞クローン胚を作出した。

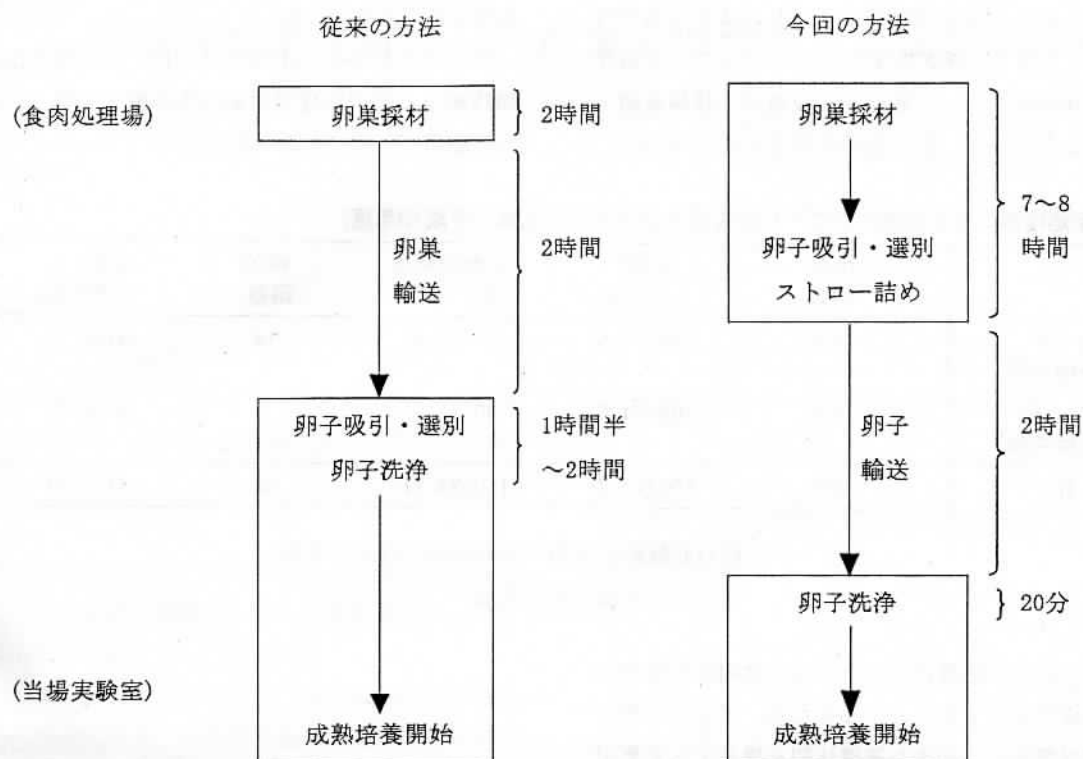


図1 卵巣採材から成熟培養を開始するまでの過程

### 結果及び考察

卵巣の採材後、検査終了時まで食肉処理場内で待機し、その後当场実験室まで卵巣を輸送し成熟培養を開始した場合、採材後約12時間経過するため、卵子の成熟率は17/35(48.6%)ときわめて低い値となった(表1)。

そこで、卵巣採材から成熟培養開始時までの時間短縮を目的に、検査終了までの待機時間を利用して食肉処理場内で卵子を吸引・選別し、これを専用の輸送器で保温(38.0℃)しながら当场実験室まで輸送した。

この方法により、卵巣採材から成熟培養を開始するまでの時間を約2時間短縮することができた(図1)。

次に、卵子の輸送用培地として、10%CS加TCM199と20%CS加HEPES緩衝TCM199とを比較検討した。HEPES緩衝TCM199はpHの変化をゆるめる作用(緩衝作用)をもつHEPESが25mM含まれた培地であるが、10%CS加TCM199と比較した場合、輸送前後のpHの変動も少なく、卵子の成熟率も有意に高かった(表1)。

表1 輸送用培地による成熟率の比較

輸送用培地	pH		採取 卵子数	成熟卵子 数(%) <sup>註)</sup>
	輸送前	輸送後		
10%CS加TCM199	7.7	8.4	183	93 <sup>B</sup> (50.8)
20%CS加HEPES緩衝TCM199	7.5	7.8	463	291 <sup>A</sup> (62.9)
生理食塩水(卵巣輸送)	—	—	35	17(48.6)

A-B:P<0.01

注)成熟培養開始後18~20時間目

一方、BSE検査実施前の4～9月まで（従来の方法）とBSE検査実施後の10～3月まで（新処理法）の体細胞クローン胚の発生成績及び移植成績を比較すると分割率、胚盤胞発生率さらには受胎率に

も差はみられなかった。

以上のことから、本技術はクローン技術や体外受精技術など食肉処理場由来の牛卵巣を必要とする技術に応用が可能である（表2）。

表2 新処理法による体細胞クローン胚生産と従来法との比較（平成13年度）

月	供試 個数	分割 数(%)	胚盤胞発生 数(%) <sup>注1)</sup>	移植 頭数	受胎 頭数(%)
4～9 (BSE検査前)	381	285(74.8)	64(22.5)	14	5(35.7)
10～3 <sup>注2)</sup> (BSE検査後)	489	365(74.6)	86(23.6)	9	3(33.3)
計	870	650(74.7)	150(23.1)	23	8(34.8)

注1) 胚盤胞発生率＝胚盤胞発生数／分割数

注2) 新処理法による成績

なお、卵子の処理に当たっては、食肉衛生検査所等の施設を活用することになるため、従来にも増して各関係機関との緊密な連携体制を構築する必要がある。

### 謝 辞

卵巣の採材に御協力いただいた佐世保食肉センター（株）並びに佐世保市食肉衛生検査所の方々に感謝いたします。

### 参考文献

- 1) 菅原七郎・尾川昭三編：生殖機能細胞の培養法，学会出版センター，78－84（1993）
- 2) 中里敏・井上哲郎・谷山敦・清松邦章：ウシ体細胞クローン胚の体外発生と移植成績，長崎県畜産試験場研究報告10，4－6（2001）