

4. 経膈採卵と通常採胚を組み合わせた効率的胚生産の検討

酪農科：谷山 敦・中里 敏¹⁾
井上 哲郎¹⁾・清松 邦章²⁾
小笠原俊介・松尾 信明

(¹⁾ 現 畜産課, ²⁾ 現 県北家畜保健衛生所)

要 約

効率的に胚の生産を行うために、経膈採卵 (OPU) と通常採胚を組み合わせた方法を検討し、以下の結果を得た。1) 採胚と採胚の間に5～10回のOPUを実施、吸引卵子数と体外受精 (IVF) 発生胚数の平均は2.9個、0.2個、OPU後の採胚成績は成績良好群で低下し、逆に不良群で向上した。2) 発情周期中で小卵胞が多い排卵後にOPUを行い、その後採胚を行うと吸引卵子数および発生胚数は、OPU前低単位卵胞刺激ホルモン処置区7.8個、0.6個、無処置区6.6個、1.0個、OPU後の採胚の正常胚数は処置区1.6個、無処置区5.7個で、採胚のみの区8.6個に比べ低下。3) 過剰排卵処置・人工授精後にOPUを行うと、吸引卵子数および発生胚数は、4.1個、0.9個、OPU後の採胚は、正常胚数7.0個、発生胚数を加えた総正常胚数7.9個は、採胚のみの区7.9個に比べ同等。特にOPU時に総卵胞数10以上の群は、吸引卵子数7.7個、発生胚数3.0個、総正常胚数9.0個で向上が期待できる。4) OPU-IVF発生胚5個を4頭に移植した結果、新鮮2卵および凍結1卵移植の2頭が受胎、雄3頭の産子を得た。

緒 言

ウシの胚移植技術は、現在実用段階に至っているが、過剰排卵処置の反復や加齢により採胚数や正常胚率が低下するなど胚の生産効率については多くの問題を抱えている。

そのような中、1988年Pieterseら¹⁾が超音波診断装置を用いて牛の生体卵巣からの卵胞卵子の採取法を開発し、さらに90年には体外受精技術を応用して子牛が生産されている。

経膈採卵 (OPU: Ovum Pick-Up) 技術とは、卵子吸引用の針が外部に出るように加工された超音波探触子 (プローブ) を膈内に挿入し、直腸内に挿入した手で卵巣を操作、診断装置の画像を見ながらプローブに装着した採卵針により膈壁を介して卵巣の卵胞を穿刺し、接続した吸引ポンプにより卵胞液とともに卵子を吸引採取するものである。

当場では平成11～13年度に経膈採卵と通常採胚を組み合わせた効率的胚生産を検討したので、その概要を報告する。

材料および方法

採胚から次の採胚までの期間内に連続経膈採卵を行う「試験Ⅰ」、発情周期の中で小卵胞数が多い時期である排卵後に経膈採卵し、その後過剰排卵処置を行い採胚する「試験Ⅱ」、過剰排卵処置 (SOV) ・人工授精 (AI) 後にOPUを行い採胚する「試験Ⅲ」を設定した。

1) 試験Ⅰ

12頭の黒毛和種供胚牛を過去3回の採胚成績 (表1) により良好群6頭及び不良群6頭に分け、さらに各群をそれぞれ2区に分け、試験は図1に示したとおり、採胚終了後に発情誘起 (PG) 処置を行い、発情の確認後14日以内に経膈採卵を開始し、表2のとおり連続的に実施した。また過剰排卵処置は最終の経膈採卵後24～72時間目に開始、卵胞刺激ホルモン製剤 (FSH) 14 AUを朝夕2回4日間減量投与し、人工授精は処置開始から5日目の夕方と6日目の早朝の2回行い、1回目の人工授精から7日後に採胚した。なお過剰排卵処置開始時から3日間は膈内留置型黄体ホルモン製剤 (CIDR) を挿入した (図1)。

表1 過去3回の採胚成績

		採胚数	正常胚数
良好群	A区3頭	9.1	7.6
	B区3頭	5.4	5.0
不良群	C区3頭	3.4	3.2
	D区3頭	1.9	1.1

表2 連続経膈採卵の方法(試験I)

A区3頭	: 7日間隔で5回経膈採卵
B区3頭	: 7日間隔で10回経膈採卵
C区3頭	: 7日間隔で9回経膈採卵
D区3頭	: 14日間隔で5回経膈採卵

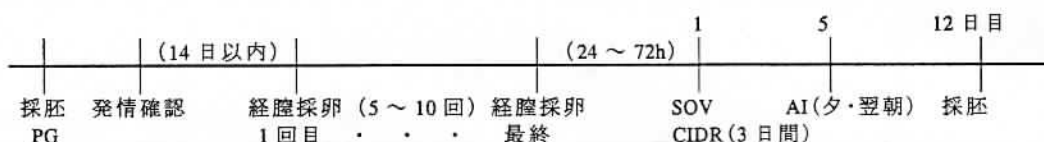


図1 連続経膈採卵及び過剰排卵処置計画(試験I)

2) 試験II

黒毛和種供胚牛10頭(延べ22頭)を用い、E及びF区では経膈採卵及び過剰排卵処置を行い採胚し

た(図2)。また、G区は対照区とし、経膈採卵を行わず採胚のみを行い比較検討した。

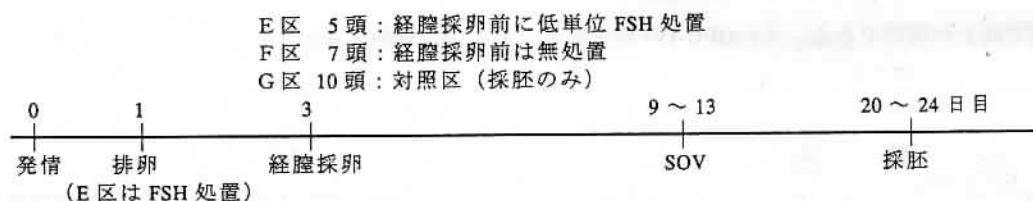


図2 経膈採卵及び過剰排卵処置計画(試験II)

3) 試験III

黒毛和種延べ13頭を用い、過剰排卵処置を実施した後1回目AI実施後24時間後にOPUを実施するH区と、対照としてOPUを行わないI区を反転し、採胚成績および総胚生産数について比較検討した(図3)。

試験区分	供試頭数	過剰排卵処理	OPU(AI後24h)	通常採卵
H区	13頭	○	○	○
I区	13頭	○	×	○

図3 連続経膈採卵及び過剰排卵処置計画(試験III)

4) 経膈採卵の方法

卵子吸引は、超音波診断装置(SSD-620)に採卵針ガイドを取り付けた5.0MHzのコンベックス型探触子を用いた。穿刺針は18G×12mmの採卵針に

内径2mm、長さ600mmの硬質ポリエチレンチューブを取り付けたものおよび17G×75mmのone-Way採卵針を用い、吸引圧100mmHgで卵胞液とともに卵子を吸引採取した。

5) 個別体外受精の方法

経膈採卵により採取した卵子は、卵丘細胞の付着状況で6段階に分類し(表3)、G1~G3を正常卵子として体外受精(IVF)を行った。IVFは市販(機能性ペプチド研究所製)の無血清培地を用いて行い(表4)、10日目まで胚の発生状況を調査した。

表3 卵子の形態による区分

- G1: 卵丘細胞が4層以上付着
 G2: 卵丘細胞が1～3層付着
 G3: 卵丘細胞が一部付着
 G4: 裸化卵子
 G5: 卵子周囲の卵丘細胞層が膨化
 G6: 変性卵

表4 無血清培地による体外受精

1日目: 経膈採卵により卵子採取 成熟培養23時間 (IVMD101、38.5℃、5%CO ₂ 、in air)
2日目: 媒精6時間 (IVF100、38.5℃、5%CO ₂ 、in air) 受精卵の前培養 (IVMD101、38.5℃、5%CO ₂ 、in air)
3日目: 裸化受精卵低酸素培養 (IVD101、38.5℃、5%CO ₂ 、5%O ₂ 、90%N ₂)
7日目: 培養液を半量交換

結果および考察

1) 試験 I

(1) 連続経膈採卵及び体外受精成績

経膈採卵を延べ87回行った結果、経膈採卵時の卵

胞数は3～16個、平均7.8個であった。このうち、経膈採卵により吸引した卵子数は0～12個、平均2.9個であった(表5、表6)。

表5 連続経膈採卵時の卵胞数と吸引卵子数成績

卵胞数	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	16	合計
頻度	2	3	8	15	13	19	10	7	2	4	2	1	1	87
卵子数平均	0.5	1.0	1.0	2.1	2.6	2.9	2.8	2.1	5.5	3.5	12.0	12.0	10.0	2.9
最大	1	3	3	4	6	7	6	5	9	5	12	12	10	
最小	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	12	12	10	

表6 吸引卵子数及び体外受精成績

区	n	卵胞数	吸引卵子数	正常卵子数	分割数	胚盤胞発生数・発生率
A	15	145(9.7)	79(5.3)	66(4.4)	48(3.2)	12(0.8) 18.2%
B	30	232(7.7)	61(2.0)	54(1.8)	40(1.3)	2(0.1) 3.7%
C	27	194(7.2)	81(3.0)	54(2.0)	40(1.5)	4(0.1) 7.4%
D	15	103(6.9)	27(1.8)	20(1.3)	17(1.1)	0(0) 0%
合計	87	677(7.8)	248(2.9)	194(2.2)	145(1.7)	18(0.2) 9.3%

注) ()内は経膈採卵1回当たりの平均
 発生率 = 胚盤胞発生数 / 正常卵子数

また、連続経膈採卵時の卵胞数の推移を図4に示した。各区とも卵胞数には大幅な増減は見られず、轟ら²⁾の報告と同様の結果であった。

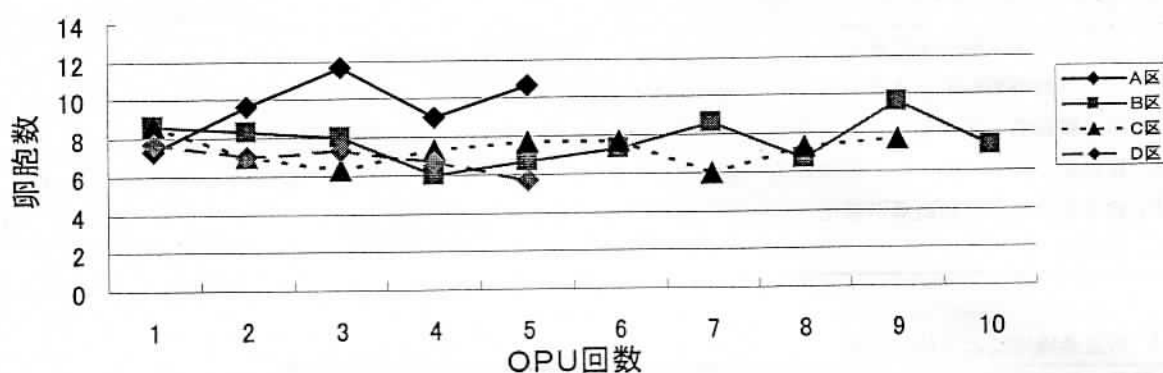


図4 卵胞数の推移

吸引卵子数及び体外受精成績は表6に示したとおり、A、B、C区において合計18個の胚盤胞を作出することができ、特にA区では、経膈採卵1回当たりの吸引卵子数、正常卵子数、分割数、胚盤胞発生数いずれも他の区に比べ良好な成績であった。

以上より、採胚から次の採胚までの期間内に経膈採卵-体外受精により胚盤胞を作出することは可能であったが、経膈採卵1回当たりの吸引卵子数、胚盤胞発生数は少なかった。

胚盤胞発生率が低い要因としては、吸引卵子数が少なく、体外受精-体外培養を少数卵子行ったことが考えられる。発生率については、卵巣から回収された卵子数が多いほど胚盤胞期胚の発生率が高くなる³⁾⁴⁾ことが報告されており、また藤田ら⁵⁾は極少数卵子での体外受精後の発生培養について多数胚培養液を添加することで発生率が改善されたと報告している。

(2) 連続経膈採卵終了後の採胚成績

良好群のA、B区において採胚成績の低下が見られた。しかし不良群のC、D区では採胚成績が向上し、特にD区では過去3回の採胚数及び正常胚数が1.9、1.1であったものが、経膈採卵終了後の採胚で6.0、4.7と大幅に成績が向上した(表7)。

OPU後の採胚成績については、良好群で低下がみられたことから、採胚成績が良好な供胚牛に対しては通常の採胚のみを実施し、経膈採卵は行わないことが望ましいと思われ、一方不良群では成績が向上したことから、採胚成績の低下した供胚牛に対しては経膈採卵を併用することで胚の生産効率を高めることが可能であると思われる。

表7 経膈採卵終了後の採胚成績

区	採胚数	正常胚数
A	3.3	2.7
B	4.0	4.0
C	4.3	3.7
D	6.0	4.7

2) 試験II

(1) 経膈採卵及び体外受精成績

卵胞数の平均はE区12.8個、F区9.7個であり、経膈採卵前に低単位FSH処置を行ったE区では中卵胞数が増加したが、総卵胞数ではF区と差はなかった(表8)。吸引卵子数についてはE区7.8個、F区6.6個であった。胚盤胞発生数はE区0.6個、F区1.0個であった(表9)。

E区では卵胞数を増加させる目的で卵胞刺激ホルモン製剤を投与したが、結果的に中卵胞数が増加し経膈採卵に要する時間が短縮できたが、反対に小卵胞数は減少し、また発生率も低かった。R.C.Fry⁶⁾らはOPU前にFSH処置を行うことでOPU時間の短縮と採取卵子数が増加したと報告しているが、今回は吸引卵子数に増加はみられなかった。通常体外受精においては、5mm以下の卵胞から卵子を吸引しているが、経膈採卵の場合、小卵胞の吸引は難しく、ホルモン投与により中卵胞を増加させることで容易になると考えられる。しかし発生率が低いため、今後培養条件の検討が必要と思われる。

表8 経膈採卵時の卵巣状態

区	n	経膈採卵時の卵胞数			
		大卵胞	中卵胞	小卵胞	総卵胞数 (最大-最小)
E	5	0.8 ± 1.3	10.4 ± 7.3 ^a	1.6 ± 3.1 ^a	12.8 ± 5.3 (19 - 9)
F	7	0.7 ± 1.0	1.7 ± 1.9 ^b	7.4 ± 4.2 ^b	9.7 ± 5.5 (21 - 6)

注) 大卵胞：9mm以上、中卵胞：6～8mm、小卵胞：5mm以下
同列異符号に有意差(p<0.05)

表9 経膈採卵及び体外受精成績

区	n	経膈採卵成績			体外受精成績		
		吸引卵子数(最大-最小)	培養卵子数	分割数	分割率	発生数(最大-最小)	発生率
E	5	7.8 ± 6.6 (19 - 3)	6.8 ± 6.1	3.6 ± 2.8	52.9%	0.6 ± 0.9 (2 - 0)	8.8%
F	7	6.6 ± 6.6 (20 - 0)	5.6 ± 5.7	2.7 ± 3.7	48.2%	1.0 ± 2.2 (6 - 0)	17.8%

注) 分割率=分割数/培養卵子数 (分割数：媒精後24時間目の分割数)
発生率=発生数/培養卵子数 (発生数：胚盤胞発生数)

(2) 採胚成績

採胚成績では、E区が他の区と比較して採胚数、正常胚数、正常胚率とも著しく悪い成績であり、採胚のみを行ったG区で最も良好な成績が得られた(表10)。

これは、経膈採卵前の卵胞刺激ホルモン処置が採胚時の過剰排卵処置に悪影響を及ぼしたものと思われる。

表10 採胚成績

区	n	採胚数	正常胚数	正常胚率
E	5	1.6 ± 2.6 ^a	0.2 ± 0.4 ^a	12.5%
F	7	8.6 ± 6.5 ^b	5.7 ± 5.2 ^b	66.3%
G	10	9.7 ± 9.6 ^{a,b}	8.6 ± 10.0 ^{a,b}	88.7%

注) 正常胚率=正常胚数/採胚数
同列異符号に有意差(p<0.05)

3) 試験III

(1) 経膈採卵及び体外受精成績

H区の総卵胞数の平均は8.85個であり、吸引卵子数4.08個、回収率46.1%、培養に供した卵子数は2.54個であった。特にH区の総卵胞数が10以上の群は10未満の群と比較すると総卵胞数14.2個、そ

の内中卵胞数8.50個と高く、また吸引卵子数7.25個、回収率50.9%で良好であった(表11)。IVF成績では、分割数1.46個、発生胚数0.92個であったが、総卵胞数10以上の群は分割率75.0%、発生率60.0%で高い成績であった(表12)。これは培養卵子数の差によることが考えられる。

表11 OPU時の総卵胞数によるOPU成績比較

卵胞数	n	OPU時の卵胞数				吸引卵子数	回収率 (%)	培養卵子数
		大卵胞	中卵胞	小卵胞	総卵胞数			
10以上	4	1.75	8.50	4.00	14.25	7.25 ± 2.63	50.9	5.00 ± 3.92
10未満	9	0.56	2.22	3.67	6.44	2.67 ± 1.41	41.5	1.44 ± 0.73
計	13	0.92	4.15	3.77	8.85	4.08 ± 2.70	46.1	2.54 ± 2.56

注) 大卵胞：9mm以上、中卵胞：6～8mm、小卵胞：5mm以下
回収率=吸引卵子数/総卵胞数

表12 OPU時の総卵胞数によるIVF成績比較

卵胞数	n	培養卵子数	分割数	分割率 (%)	発生胚数	発生率 (%)
10以上	4	5.00 ± 3.92	3.75 ± 3.86	75.0	3.00 ± 3.56	60.0
10未満	9	1.44 ± 0.73	0.44 ± 0.53	30.6	0	0
計	13	2.54 ± 2.56	1.46 ± 2.44	57.5	0.92 ± 2.20	36.2

分割率=分割数/培養卵子数 (分割数：IVF24時間後の分割数)
発生率=発生数/培養卵子数 (発生数：移植可能胚発生数)

(2) 採胚成績および総正常胚生産数

通常採胚成績および体外受精成績を含めた総胚生産成績においてH区とI区との間に有意な差は認められず(表13), OPUによる通常採胚への悪影響は少なかったものの, 体外受精成績が低かったため総

胚生産の向上に結びつかなかったと考えられる。しかしOPU時の総卵胞数10以上の群は, 通常採胚成績はやや低いものの, 体外受精と通常採胚を合わせた総正常胚数は高くなった(表14)。

表13 採胚成績

試験区	n	体外受精成績		通常採胚成績		総胚生産成績	
		発生胚数	正常胚数	総胚数	正常胚数	総胚数	正常胚数
H区	13	0.92±2.29	0.85±2.30	10.54±7.39	7.00±6.72	11.46±6.73	7.85±6.30
I区	13	—	—	13.23±6.60	7.92±7.01	13.23±6.60	7.92±7.01

表14 OPU時の総卵胞数による採胚成績比較

卵胞数	n	体外受精成績		通常採胚成績		総正常胚数
		正常胚数	総胚数	正常胚数	総胚数	
10以上	4	2.75±3.76	9.00±6.68	6.25±5.91	9.00±3.37	9.00±3.37
10未満	9	0	11.22±7.97	7.33±7.37	7.33±7.37	7.33±7.37

4) 移植成績

経膣採卵—体外受精により発生した胚盤胞5個を4頭に移植した結果, 新鮮2胚移植で1頭及び凍結1胚移植で1頭, 計2頭の受胎を確認し, 計雄3頭の産子を得た(表15)。

表15 移植成績

移植方法	移植頭数	受胎頭数
新鮮1胚	1頭	0頭
新鮮2胚	1頭	1頭
凍結1胚	2頭	1頭

以上のことから, 経膣採卵と通常採胚を組み合わせる場合, OPUの実施方法については, SOV-AI後の成績が良好であったが, 今後より効率的に胚生産を行える方法を検討する必要がある。また経膣採卵—体外受精による胚盤胞の発生率向上を図るためには, 培養卵子数が多いほど成績が良好と考えられ, そのためには吸引卵子数の回収率の向上及び培養条件等の検討が必要であると思われる。

さらに経膣採卵の活用面としては, 1) 卵管炎や子宮内膜炎, 過剰排卵処置に反応しないなど通常の採胚が不可能な牛からも卵子を採取し, 体外受精することで産子を得ることができる。2) 春期発動前の6カ月齢のドナーから卵子の採取が可能である⁷⁾。

3) 妊娠牛についても, 少なくとも90日までは供胚牛として用いることが可能である⁸⁾ことが報告されている。

また, 通常の体外受精産子の場合と異なり, 血液型検査を実施することにより, 経膣採卵—体外受精による産子は登録が可能であることから, 経膣採卵技術を活用することにより, 畜産現場においてより効率的な胚生産が行えるよう検討する必要がある。

参考文献

- 1) Pieterse, M.C., K.A. Kappen, Th. A.M. Kruij & M.A.M. Tavernier. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. Theriogenology. 30 : 751 - 762. 1988.
- 2) 轟木淳一ら, 超音波ガイドを用いた牛卵胞嚢腫治療直後の過剰排卵処置の可能性。鹿児島県肉用牛改良研究所研究報告, 1 : 16 - 20. 1995.
- 3) 山田均ら, 牛の体外受精技術の確立に関する試験。埼玉畜産試験場研究報告 29 : 49 - 52. 1992.
- 4) 石田美保ら, 個体別体外受精による体外胚の生産効率。石川県畜産総合センター研究報告, 33 : 13 - 16. 1999.
- 5) 藤田達男・広瀬啓二・志賀一穂, 生体由来卵

子の体外受精卵作出試験。大分県畜産試験場試験成績報告書, 27 : 35 - 16. 1998.

6) P.C.Fry, T.L.Simpson & T.J.Squires.

Ultrasonically guided transvaginal oocyte recovery from calves treated with or without GnRH. *Theriogenology*. 49 : 1077 - 1082. 1998.

7) G.Rick, K.G.Hadeler, E.Lemme, A.Lucas-Hahn, D.Rath, L.Schindler & H.Niemann. Long-term ultrasound guided ovum pick-up in heifers from 6 to 15 months of age. *Theriogenology*. 45 : 356. 1996.

8) Reiders, M.C. & A.M.van Wagtenonk-de Leeuw. Improvement of a moet program by addition of in vitro production of embryos after ovum pick up from pregnant donor heifers. *Theriogenology*. 45 : 354. 1996.