

牛の胚移植技術に関する研究

(第3報) 体外受精技術の確立

西 康裕・榊原秀夫・余谷行義

Studies on Embryo Transfer Techniques in Cattle

3. Establishment of techniques for in vitro fertilization

Yasuhiro NISHI, Hideo SAKAKIBARA and Yukiyo YOTANI

緒 言

本県の特産である優良雌和牛のブランドを保持しつつ、効率的生産を図るには優良素牛の確保が極めて重要である。近年においては、従前からの子牛生産県が繁殖肥育一貫経営に移行してきたため、県外からの導入に依存していた本県の肉牛生産農家は優良素牛の安定確保が困難になってきた。このため、早くから乳牛を借り腹とする胚移植技術を利用した和牛の生産に取り組んでいるが、繁殖和牛の少ない本県では、十分な数の体内受精卵を確保することは困難である。

他県に比べ優良雌和牛のと殺頭数が多い本県の特徴を生かして、これから得られる大量の卵巣を利用し、体外受精により高能力の肉用牛の増産を図ることが期待されている。

そこで、卵巣からの未成熟卵子の回収、体外培養における培養条件や媒精条件の検討及び凍結方法など、一連の体外受精技術の確立をめざした試験を行ったので報告する。

材料と方法

試験1. 卵巣からの未成熟卵子回収方法の検討

と畜場で黒毛和種の成雌牛から卵巣を、と殺解体直後に採取し、約30℃に加温した生理食塩水中に浸漬して実験室に持ち帰った。卵胞卵子の採取は①注射器法は、19G鈍角注射針を装着した10mlプラスチック注射器で、卵子を卵巣表面の直径7mm以下の卵胞から卵胞液とともに吸引した。②切開法は、替刃メスで卵巣を修正TCM-199培地（以下m-TCM）を浸したシャーレー内で細切した。③葉さじ法は、塩谷ら¹²⁾の方法で小型の葉さ

じと替刃メスを組み合わせ、卵巣表面の直径7mm以下の卵胞をメスで切り、卵胞内容物を葉さじでヘパリン加m-TCM中で掻き出した。④注射器・メス併用法は①と同様に卵子を吸引した後、卵巣を替刃メスで細切し、m-TCM中で洗浄した。

供試した卵巣数は、注射器法が40個、切開法、葉さじ法、注射器メス併用法はいずれも10個とした。

以上の方法で採取した液（卵子を含む）はm-TCMで2回洗浄後シャーレーに移し、実体顕微鏡下で卵丘細胞が1/3以上附着した卵子のみを選別した。

以後、いずれの区も次の方法で行った。成熟培養は、10%牛胎児血清（以下FCS）及び抗生物質（ペニシリン100IU/mlとストレプトマイシン100μg/ml）を添加した市販液体TCM199培地（以下L-TCM）中で、パラフィンオイルを重層して、38.5℃、湿度99%、炭酸ガス5%条件下の培養器内で20~22時間行った。

媒精は牛血清アルブミン20mg/mlとヘパリン2μg/mlを加えたBO液（原法Brackett and Oliphant¹³⁾）50μlの小滴に成熟卵子を入れ、これに黒毛和種雄牛の凍結精液を融解後、10mMカフェイン加BO液で希釈、3,000回転5分間の遠心分離を2回行い精子を洗浄し、精子濃度を $1 \times 10^6 \sim 7$ /mlに調整した精子浮遊液50μlを加え、5時間行った。

発生培養は授精させた成熟卵子を5%子牛血清（以下CS）及び抗生物質を加えたL-TCM中で卵丘細胞と共に成熟培養と同条件下で7~10日間培養を行い、分割率、胚盤胞発生率を比較した。

試験2. 完全体外培養条件の検討

（1）人工培地の検討

卵子の吸引から成熟培養、媒精までは試験1の注射器法と同様の方法で行い、発生培養を試験1と同じL-TCMで行ったもの（供試卵子数130個）と市販の粉末培地を基に調製したTCM-199（以下P-TCM）で行ったもの（供試卵子数60個）、イーグルMEM培地（以下MEM）で行ったもの（供試卵子数105個）の3方法で分割率、胚盤胞発生率を比較した。

（2）共培養細胞の検討

卵丘細胞の単層作成法は、（1）のL-TCMと同様の方法で卵子に付着しているものを用いた。

卵管上皮細胞の単層作成法は、木之下ら⁸⁾の方法に準拠した。卵管を3～5cmに切断後、卵管膨大部～狭部の内腔を切開し、上皮面を滅菌したスライドガラスで軽く擦過して採取した。それにL-TCMを加え、ピペッティング及び遠心分離（1,000rpm, 5min）を3回行い、細胞を洗浄後、5%CS加L-TCMで培養した。

以上の2種類の共培養細胞で100個ずつの卵子を発生培養し、分割率、胚盤胞発生率を比較した。

（3）CO₂濃度の検討

卵子の吸引から発生培養までは（1）のL-TCMと同様の方法で行ったが、CO₂濃度を5%で培養した場合（供試卵子数154個）と4%で培養した場合（供試卵子数140個）の分割率、胚盤胞発生率を比較した。

試験3. 媒精に用いる培養液の検討

（1）媒精を、その都度調整したBO液で行う方法（供試卵子数65個）とあらかじめ10倍濃縮BO液（以下c-BO液）を作成しておいて使用時に希釈し、NaHCO₃を添加する方法（供試卵子数71個）でその後の分割率、胚盤胞発生率を比較した。

（2）同様に媒精を、BO液で行う方法（供試卵子数40個）とL-TCMで行う方法（供試卵子数40個）でその後の分割率、胚盤胞発生率を比較した。

試験4. 凍結方法の検討

凍結は既報^{15, 16)}の超低温冷凍庫を用いる方法で行った。凍結胚の融解は、ステップワイズ法により行った。ストローを液体窒素中から取り出し、空気中で10秒間保持し

た後、35℃の温湯で融解した。シャーレに胚を取り出して形態を観察した後、あらかじめ6段階（8.3%, 6.7%, 5.0%, 3.3%, 1.7%, 0%）に耐凍剤を混合した液の濃度の高い方から低い方へ順に約5分間隔で移し換え、耐凍剤を除去した。生存性の判定は、卵丘細胞を単層培養したTCM199培地に胚を移し、24～48時間培養して観察した。

凍結媒液の検討ではD-PBSを用いたもの33個、TCM199を用いたもの34個で行った。耐凍剤の検討では10%グリセリン（以下GLY）を用いたもの66個、15%プロピレングリコール（以下P-G）32個、10%P-G17個、10%エチレングリコール（以下E-G）31個でそれぞれ行った。

結 果

1. 卵巣からの未成熟卵回収方法の検討

表1に示すように、卵巣からの未成熟卵子採取数は注射器・メス併用法が最も多く、以下薬さじ法、切開法、注射器法の順であった。胚盤胞発生率は薬さじ法が最も良く、次いで、注射器メス併用法、注射器法、切開法の順であった。

2. 完全体外培養方法の検討

発生培地としてL-TCM, P-TCM, MEMを用いて比較したが、表2に示すようにP-TCMで分割率、胚盤胞発生率は最も高く、イーグルMEMでは極端に成績が悪かった。

発生培養時に共培養する細胞として、卵丘細胞と卵管上皮細胞を比較したが、表3に示すように卵丘細胞の方が胚盤胞発生率は若干高かった。

培養条件として38.5℃でCO₂濃度5%と4%を比較したが、表4に示すように分割率、胚盤胞発生率に差はみられなかった。

3. 媒精に用いる培養液の検討

媒精をBO液とc-BO液で実施し、比較検討したが、表5に示すように分割率、胚盤胞発生率ともに差は認められなかった。

BO液とL-TCMを比較した試験結果は表6に示したがL-TCMを用いた方法では胚盤胞の発生は無かつ

表1. 未成熟卵回収方法の検討

採取方法	卵巣数 (A)	卵子数 (B)	B/A	分割率 (%)	胚盤胞発生数	胚盤胞発生率 (%)
注射器法	40	200	5.0	70.7	13	6.5
切開法	10	55	5.5	20.0	0	0.0
薬さじ法	10	75	7.5	71.4	12	16.0
注射器メス併用法	10	100	10.0	77.7	9	9.0

た。

4. 凍結方法の検討

10%GLYを耐凍剤として、2種類の凍結媒液(D-PBSとTCM199)を用いて、体外受精胚を凍結後、融解しステップワイズ法でGLYを除去、24~48時間の共培養で生存率を比較したが、表7に示すように両者に差は無かった。また3種類の耐凍剤(GLY, P-G, E-G)を用いて4つの方法で凍結後、融解しステップワイズ法で耐凍剤を除去、共培養で同様に生存率を比較したが表8に示すように10%E-G区で最も高く(54.8%)、以下15%P-G, 10%GLYの順で、10%P-G区が最も低く29.4%であった。

考 察

と畜場で廃棄される肉用牛の卵巣を有効に活用して、低コストの体外受精胚を大量に生産することができれば肉用牛の増産に役立てることができる^{4,10)}。また、クローンや性別判別といった新技術の試験研究に利用することも可能である¹¹⁾。そこで、一連の体外受精技術の確立をめざして和牛卵巣からの未成熟卵子の回収、体外培養条件、媒精に用いる溶液及び凍結方法などを検討した。

卵巣からの未成熟卵子回収方法としては、注射器法⁵⁾

が一般的であるが、葉さじ法¹²⁾及び注射器・メス併用法⁶⁾の方が、回収卵数や胚盤胞発生率で成績は上回った。

葉さじ法では、卵胞を1個ずつ切開し、えぐる様にして卵子を含む卵胞内容物を掻き出すことにより、卵丘細胞が緊密に付着した卵子を比較的効率よく回収できるように思われた。

注射器法では吸引の仕方により、卵丘細胞が剥がれ落ちて良い卵子を回収できず、取り残しもかなりあると思われた。

注射器・メス併用法は注射器法で卵子を回収後、卵巣をメスで細切し、培養液中に洗い出した後も卵子を採取するため多くの卵子を回収できる利点がある。

表5. 媒精に用いる培地の検討(1)

培地名	培養 卵数	分割率 (%)	胚盤胞数	胚盤胞発生率 (%)
BO液	65	66.2	12	18.5
c-BO液	71	64.8	13	18.3

表6. 媒精に用いる培地の検討(2)

培地名	培養 卵数	分割率 (%)	胚盤胞数	胚盤胞発生率 (%)
BO液	40	60.0	3	7.5
L-TCM	40	7.5	0	0.0

表2. 発生培地の検討

培地名	培養 卵数	分割率 (%)	胚盤胞数	胚盤胞発生率 (%)
L-TCM	130	67.7	20	15.4
P-TCM	60	76.7	26	43.3
MEM	105	25.7	4	3.8

表3. 共培養細胞の検討

細胞名	培養 卵数	分割率 (%)	胚盤胞数	胚盤胞発生率 (%)
卵丘細胞	100	71.0	9	9.0
卵管上皮細胞	100	70.5	5	5.0

表4. CO₂濃度の検討

CO ₂ (%)	温度	培養 卵数	分割率 (%)	胚盤胞数	胚盤胞発生率 (%)
5	38.5℃	154	76.9	21	13.6
4	38.5	140	75.9	22	15.7

表7. 凍結媒液の検討

凍結媒液	耐凍剤	融解卵数	生存卵数	生存率(%)
D-PBS	10%GLY	33	20	60.6
m-TCM	10%GLY	34	19	55.9

共培養：24~48時間

表8. 耐凍剤の検討

耐凍剤	凍結媒液	融解卵数	生存卵数	生存率(%)
10%GLY	m-TCM	66	27	40.9
15%P-G	"	32	15	46.9
10%P-G	"	17	5	29.4
10%E-G	"	31	17	54.8

共培養：24~48時間

しかし、葉さじ法と注射器・メス併用法は手間と時間がかかるため、多量の卵巣を処理する場合は難しいが、今井ら⁸⁾が報告しているように極少数の優良牛の卵巣から卵子を採取しなければならない場合には有効な方法と考えられる。

一方、切開法は、卵巣を直接メスで切り刻むため血液や卵胞液などの夾雑物を多量に混入することから、検卵に支障を来し、分割率、胚盤胞発生率も良くなかった。このことから回収方法としては、あらかじめ血液や卵胞液など余分なものをできるだけ除去した後、卵巣をメスで細切することが必要と思われる。

従来は発生培地に市販の液体培地(L-TCM)を主に使用していたが、成績にばらつきがあるため、市販の粉末培地を基に調製した培地(P-TCM)を用いたところ胚盤胞発生率が43.3%と向上した。L-TCMの場合、炭酸水素ナトリウム濃度などにロット差や作成してからの保存期間に問題がある可能性があり、その都度調製したP-TCMの安定性が高いことが示唆されたため今後例数を重ねたい。

また調製が容易で安価なイーグルMEMは、TCM-199に比べ、アミノ酸等の含有成分の種類が少ないためか分割率、胚盤胞発生率が極端に悪かった。

初期胚を卵丘細胞と共培養する方法は、梶原ら⁷⁾により初めて報告されたが、本来この時期生体内では胚は卵管内に存在していることから、卵管上皮細胞を用いたほうが生体内の条件により近いと考え、両細胞での共培養を比較検討したが、木之下ら⁹⁾が報告しているのと同様、特に卵管上皮細胞が有効であることは認められなかった。

一般に胚の培養に用いるCO₂濃度は5%である⁵⁾。著者らの培養法はドロップ法ではなく、液量の多いプレート培養によるため、培養中に液の交換を行っていないが、培養後半にややpHが低下する傾向があるため、CO₂濃度を4%に下げて検討してみた。しかし、分割率、発生率とも両者に差はみられなかったことから1%程度の差は大きく影響しないと考えられる。

媒精に用いる培養液は一般に修正タイロード液(BO液)¹⁾を用いるが、その都度調製が必要である。あらかじめ10倍濃厚な液(c-BO液)を作成しておけば保存が可能で、使用時に希釈するだけで調製が容易である。また、成熟培地、発生培地に用いるTCM-199をそのまま媒精に使用できれば、液の調製の必要がなくなる。

今回、それぞれの液を用いて検討してみたところ、c-BO液については全く問題なく使用できることがわかった。しかし、L-TCMについてはあまり実用的でないと考えられた。

I VF卵を用いた耐凍剤の検討で、10%GLYと15%

P-Gを比較すると、その生存率にほとんど差はなかったが、P-Gのみの場合10%より15%の方が、生存率が高い傾向にあった。今回はステップワイズ法で耐凍剤を除去したが、野外で移植する場合、この方法は融解後移植までかなり時間を要することから、山口ら¹⁰⁾が言うようにその間の温度の変化が胚に対し悪影響を及ぼすことが考えられる。これに対し、10%E-GがGLYやP-Gに比べ高い生存率を示したことから、堂地ら³⁾が報告している10%E-Gによる直接移植法を今後検討してみたい。

体外受精胚は体内受精胚と比べ、新鮮胚ではほぼ同様の受胎率が得られるものの、凍結することにより生存性が著しく低下する²⁾と言われていることから、ある程度生存率が低下するのはやむを得ないとしても、今回、著者らが行ったいずれの凍結方法も桑山ら⁹⁾が報告している凍結融解胚の成績に比べて生存率が低いことから、凍結融解方法¹³⁾以外に耐凍性の強い胚を作成する培養技術の開発が今後必要と考えられる。

要 約

和牛の卵巣を利用した一連の体外受精・体外培養の技術の確立を目的として、未成熟卵子回収方法、完全体外培養条件、媒精に用いる溶液、凍結方法について検討を行ったところ以下の成績が得られた。

1. 未成熟卵子回収方法では注射器・メス併用法の回収卵数が多かった。
2. 完全体外培養の条件では、培養液として粉末培地を基に調製したTCM199が、共培養においては卵丘細胞と培養した卵の胚盤胞への発生率が高かった。CO₂濃度に関しては5%と4%で胚盤胞発生率に差はなかった。
3. 媒精に用いる溶液では10倍濃縮保存BO液(使用時に10倍希釈)が新鮮BO液とほぼ同様の分割率であった。
4. 凍結方法では胚の凍結に用いる耐凍剤については、エチレングリコールによる生存率が高く(54.8%)、直接移植法の適用の可能性を示唆した。

引用文献

- 1) Brackett BG, Oliphant G(1975): Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro, Biol Reprod 12, 260~274
- 2) 堂地修ら(1991): ウシ体外受精胚を使った凍結保存法の検討, 第6回東日本ET研講演要旨, 76
- 3) 堂地修ら(1991): Ethylene glycolを用いて凍結したウシ胚のDirect transfer法による移植, 第84回日本畜産学会大会講演要旨
- 4) 後藤和文(1988): 体外受精卵を利用した肉牛の受精卵移植

- の現状と課題, 畜産の研究42(9), 1013~1016
- 5) 花田章ら(1985): ウシにおける体外受精, 家畜繁殖学会誌31(5), 56~61
 - 6) 今井敬ら(1992): 体外受精の野外応用例・廃用された高能力牛の卵巣の利用, 第7回東日本ET研講演要旨, 66.
 - 7) 梶原豊ら(1987): 牛卵胞卵子の体外受精および体外培養によるふ化, 家畜繁殖学会誌33(4), 173~179
 - 8) 木之下明弘ら(1991): ウシ体外受精卵の発生に及ぼす共存細胞種の影響, 繁殖技術会誌13(3), 139~142
 - 9) 桑山正成ら(1991): 牛体外受精由来胚の凍結保存, 第6回東日本ET研講演要旨, 72.
 - 10) 湊芳明ら(1989): 乳用牛からの肉牛生産への応用, 第4回東日本ET研講演要旨, 11~14
 - 11) 塩谷康生ら(1988): 屠場で吸引採取した牛未成熟卵胞卵子の体外受精後の発生能, 家畜繁殖学会誌34(1), 39~44
 - 12) 塩谷康生(1992): 牛の体外受精—研究と応用(1) 畜産の研究46(2), 233~236
 - 13) 下平乙夫ら(1992): 体外受精由来胚を使った凍結保存法の検討, 第80回家畜繁殖学会講演要旨, 58.
 - 14) 山口佳男ら(1992): 和牛体外培養新鮮胚の長距離輸送による受精卵移植試験, 畜産の研究46, 1189~1194
 - 15) 余谷行義ら(1990): 牛の受精卵移植に関する研究1 過剰排卵処理および凍結方法, 三重農技研報18, 27~37.
 - 16) 余谷行義ら(1991): 牛の受精卵移植に関する研究2 超低温冷凍庫を用いた1段階ストロー法での牛胚の凍結, 三重農技研報19, 51~56.

Studies on Embryo Transfer Techniques in Cattle 3. Establishment of techniques for in vitro fertilization

Yasuhiro NISHI, Hideo SAKAKIBARA and Yukiyooshi YOTANI

SUMMARY

To establish the techniques for IVM-IVF and in vitro culture of bovine oocyte, we evaluated the method of recovering oocyte, the condition of in vitro culture, a medium for IVF and the cryoprotectant for freezing embryos. So we achieved the following results:

1. For the method of recovering oocyte, the combination both suction by a cylinder with a needle of 19G and cutting by a rezor could recover most many oocytes.
2. On the condition of in vitro culture, the self-prepared TCM-199 from powder and coculture with cumulus cells brought good effects for the growing rates of embryos, but the concentration of CO₂ had no difference between 5% and 4%.
3. About the medium for IVF, we found the conc-BO medium (we used at $\times 10$ dilution) had nearly the same divided rate as the fresh BO medium.
4. As for the cryoprotectant for freezing embryos, ethylene-glycol (EG) showed the best survival rate (54.8 %).

It indicates the possibility of an application for direct embryo transfer.