

ウシ胚の多量確保技術の確立

経膈採卵を利用した正常卵子の多量採取と体外胚の効率的生産に関する研究

島田浩明・余谷行義・西 康裕*・柿原秀夫**

家畜改良繁殖グループ・三重県南勢家畜保健衛生所*・三重県中央家畜保健衛生所**

畜 産

要 旨

ウシ生体卵巢から卵胞内卵子を吸引採取し、体外で受精・培養することでウシ胚を生産するとともに、同一個体で短期間に採卵操作を繰り返し、ウシ胚を効率的かつ多量に生産する手段を検討した。

採卵にはウシ14頭を供試し、延べ25回実施した。その結果、計70個の卵子が採取でき、うち正常な卵子は53個であった。一採取当りに換算すると2.8個の卵子数となり、正常卵は2.1個であった。

採取した卵子を用い、体外受精を行った結果、正常卵子53個中、移植可能胚までの発育数は14個(26.4%)であった。

同一個体において1ヶ月以内に2回採卵を実施したウシは2頭、3回実施は2頭であったが、採卵成績はバラツキが大きく、短期間に繰り返し採卵を行うことのメリットは明らかでなかった。

キーワード：卵胞内卵子の吸引採取；体外受精；短期間内での採卵操作の繰り返し

結 言

ウシ胚の多量生産手段には、ウシに過剰排卵処理を施し人工授精後に子宮から胚を回収する体内胚と、屠体卵巢から採取した卵子を体外で受精・培養させる体外胚がある。

体内胚の生産ではホルモン剤投与ならびに供胚牛からの胚の採取作業に労力を要するとともに、胚採取後は卵巢機能の回復を図るため次回採胚まで2～3ヶ月を要する。

体外胚の生産においては、卵子の多量確保は可能なものの、同一牛からの卵子採取は一度限りであるため、良い子牛が生産されても、もはや同一母牛からの再生産はできない。また体外胚由来産子の場合、母牛の血液型検査が未実施であることが多く、このような母牛の卵子から誕生した子牛は登録ができないため、子牛市場価格は一般の登録牛に比べ低い傾向にある。

そこで、ウシ生体卵巢から長針を用いて卵胞内卵子を吸引し、体外受精技術により移植可能な胚にまで発育させる手法が考案された(経膈採卵)。卵巢の回復は早く、経膈採卵技術に習熟すれば、短期間での卵胞内卵子吸引操作の反復が可能であり^{1), 3)}、ホルモン剤投与の必要もない。この技術を体内胚生産のため飼養している優良な血統のウシ(供胚牛)に用いれば、生産子牛の血統登録ができるとともに、採取操作を繰り返し行うことにより、胚の再生産も可能となる利点もある。

このような経膈採卵技術のメリットを活かしたウシ胚の効率的生産を普及させるため、その可能性について検討した。

材料及び方法

- 1 試験・調査実施場所：農業技術センター 畜産施設内
- 2 試験実施期間：平成9年3月～平成11年4月

3 試験の規模：黒毛和種（雌牛）14頭

延べ経膈採卵回数25回

4 試験方法

(1) 前準備

ア 卵胞内卵子を還流するため、1%ヘパリン加TCM199を100ml注射筒にいれ、自動還流装置にセットする。

イ 棒状のアダプターの先端に超音波診断装置（コンベックス指先探触子）を、背面には卵子吸引採取用の長針を装着し、自動還流装置に接続する。
なお超音波診断装置は日立EUP-905を使用し、指先探触子（EUB-F331）を接続した。

卵子採取針は2-Way式のものを使用した。

ウ 試験牛を保定枠に入れ、除糞後に陰部周辺を洗浄・消毒する。

エ 卵胞内卵子採取による痛みを軽減させるため、2%塩酸プロカイン7mlで尾椎麻酔をする。

(2) 卵胞内卵子採取操作

ア 片手を直腸に挿入し、直腸壁を介して卵巣を保定する。

イ 他方の手でアダプターを外陰部から膈内に挿入し、膈壁を介し先端のコンベックス探触子を卵巣に密着させ保持する。

ウ 超音波画像を観察し、卵巣内の卵胞の大きさ・個数・場所を確認後、採卵針を卵胞めがけて突き刺す。

エ 超音波画像で長針先端部が卵胞内に穿入されたのを確認した後、卵胞液とともに卵胞内卵子を吸引する。

オ 卵胞内卵子の採取を確実にするため、シリンジにセットした還流液を卵胞内に注入し、再び吸引する操作を繰り返す。

カ 卵胞液の回収を確認後、次の卵胞内卵子の吸引操作に移る。

キ 小試験管に回収した卵子を含む液には、血液等が混入し濁っているため、回収液を約100メッシュの網を張った専用容器（セルコレクター：FHK製）に流し、濁りを洗い流す。

(3) 回収卵子の体外受精

ア セルコレクター内の卵胞内卵子を実体顕微鏡下で選別し、10%子牛血清加TCM199培養液で20時間成熟培養を行う。培養は、温度38.5℃、4%二酸化炭素、96%空気、湿度飽和の条件下で行う。

イ 採取した卵胞内卵子は、坂口ら⁹⁾の分類に準じて、卵丘細胞の付着状態や卵子の細胞質の色調により、良いものから順にI～Vランクに区別する。

ランクI：卵子の表面全体に4層以上の卵丘細胞

が付着している卵子

ランクII：卵子の表面全体に1～3層の卵丘細胞が付着しているか、あるいは表面の一部で細胞が剥離している卵子

ランクIII：卵丘細胞の付着が卵子の表面1/3に満たない卵子

ランクIV：卵丘細胞が膨化した卵子

ランクV：変性卵子

ウ 成熟培養後、受精が可能な状態にまで成熟した卵子（成熟卵）を市販の媒液（製造元：機能性ペプチド研究所）内で精子と5時間接合（媒精）させる。

エ 媒精後は成熟卵に付着した卵丘細胞や精子をピペッティング操作で剥した後、5%子牛血清加m-SOF培地に入れ、胚に発育するまで観察する。

結 果

1 生体からの卵胞内卵子経膈採取

黒毛和種14頭を用い、延べ25回の経膈採卵操作を実施した結果、計70個の卵子が回収できた。このうち体外受精可能な卵子に成熟する可能性のある正常卵子（ランクI、II、III）は53個で、全採取卵子数の75.7%を占めた。一操作当りの採取卵子数は2.8個で、正常卵子数は2.1個であった（表1）。

表1 経膈採卵実施成績

供試牛	採卵回数	採取卵子のランク					採取卵子数
		I	II	III	IV	V	
B11	1	1	1	2			4
B17	4	1		2		5	8
B18	2	8	1	3		1	13
B22	1	2	1				3
B23	2	3				3	6
B24	1						0
B25	1						0
B39	1	2	1				3
B46	2	5	4	4	1	1	15
B52	4	3				2	5
B58	1		1			1	2
B67	1						0
B69	1			1		1	2
B82	3	4	3			2	9
ランク別卵子数		29	12	12	1	16	70
同上(率)		(41.4)	(17.1)	(17.1)	(1.4)	(22.9)	(100)
1採取当り卵子数		1.16	0.48	0.48	0.04	0.64	2.80

14頭について、延べ25回採卵した。

2 採取卵子の体外胚（移植可能胚）への発育

採取した卵子70個を成熟培養後、媒精したところ、29個(41.4%)が分割を開始し、移植可能胚に発育したものは14個(20.0%)であった。また、正常卵子53個を対象にした場合、26.4%が移植可能胚へ発育したことになる。分割した卵子29個に占める移植可能胚への発生率は48.3%となり、当所の体外受精胚発生率45.8%（平成8・9年度成績）とほぼ同じ値であった。

移植可能胚14個中5個を移植に供したところ2頭が受胎した。そのうち1頭は早期流産したが、もう1頭は正常分娩に至った（表2）。

表2 回収卵子による体外胚生産及び移植成績

供試 卵子数	分割卵子 数 (%)	移植可能胚 発生数 (%)	移植 頭数	受胎 頭数
70	29 (41.4%)	14 (20.0%)	5	2

3 短期間の経膣採卵の回数と卵子のランク

1ヶ月以内に2回以上の経膣採卵を実施した4頭について成績をまとめた（表3）。

3頭で2回目以降の採取卵子数ならびに正常卵子数が僅かに増加したものの、各個体とも採卵操作回数別の成績は異なり、安定した採卵成績は得られなかった。

表3 経膣採卵反復成績

供試 牛	採卵 回数	採取卵子のランク					採取 卵子 数
		I	II	III	IV	V	
B17	1回	0		0		0	0
	2回	1		1		1	3
B23	1回	3				1	4
	2回	0				2	2
B52	1回	0					0
	2回	1					1
	3回	2					2
B82	1回	1	0			2	3
	2回	2	3			0	5
	3回	1	0			0	1

考 察

1 生体からの卵胞内卵子経膣採取法

屠体卵巣を用いて体外胚を生産する場合、1頭の卵巣から平均13.3個の正常卵子が得られた（平成8・9年度、当場での平均）。しかし本実験では、経膣採卵操作によって採取できた卵子数は2.8個で、うち正常卵子は2.1個にとどまった。

橋本ら⁴⁾は延べ42頭の牛の経膣採卵を行い、1頭1回あたり1.8個の正常卵子を採取したと報告している。また青木ら¹⁾は1経膣採卵あたり2.3個±1.9個、エムトラン社(アメリカ)⁷⁾では4.1個の正常卵子を採取できたと報告している。これらの結果からみると、一般には経膣採卵での正常卵子採取数は5個までが限度と思われる。

しかし今井ら⁵⁾は、4頭の黒毛和種を対象に、7日間隔で8回の経膣採卵を実施し、1採取当たり平均20.4±10.2個の卵子を採取し、内18.5±9.1個を培養に供することが出来たと報告している。彼らは経膣採卵により多量の卵子を採取するコツとして、第一に「試験牛の卵巣には多数の卵胞が存在していること」、第二に「採卵技術には、かなりの熟練を要すること」の2点を強調している。当場の供試牛については、1頭当たりの優良卵胞（2mm～10mm）は多くても10個未満であり、上記第一の条件には該当していなかった。また、超音波診断画像では、10個以上の卵胞を確認した牛もいたものの、採取卵子数は多くても5個であったことは、明らかに採取技術が未熟であると考えられ、更なる技術修得に努める必要がある。

また経膣採卵操作は、卵巣内出血や腹腔内への卵巣癒着の危険を伴う。坂口ら¹⁰⁾は経膣採卵実施後、1日目から7日目に6頭の牛の剖検を実施した結果、卵巣と卵管間膜との癒着や子宮体表面の切創ならびに卵巣の穿刺痕を認めたと報告している。今回の試験は、供試牛としての使命を終え、肥育に転向させたウシを対象に実施したため、直腸周囲に多量の脂肪が付着しており、採卵操作を困難にしたことが、卵子採取数低減の一原因になったと考えられる。

経膣採卵に使用した超音波診断装置について、永井⁸⁾は、直径約2mmの卵胞をモニターに映し出す試験を行い、アロカ社製SSD-2000の解像度が優れていると報告している。この中で、当場が使用しているEUB-905の卵胞識別の比較はされていないが、SSD-2000使用時の確認率が73.3%であったのに対し、EUB-905の下位機種であるEUB-515Aが61.3%であったことから、卵胞数の把握には問題は無かったと考えられた。

また、今回の成績をもとに、経膣採卵を実施する場合のコストを試算すると、一採取当たりの正常卵子採取数

2.1個が移植可能胚へ発育(26.4%)するのは0.55個となる。この場合、卵胞内卵子の吸引に使用する2-WAY採卵針は使い捨てで、単価が約10,000円、授精用の凍結精液は約3,500円、その他費用を含めると一採卵当たり約15,000円を要することになる(ただし人件費は除く)。一度に数頭の牛から経膈採卵を行っても経費は1頭分と大きく変わらないので、移植可能胚1個を生産するための経費を約5,000円にするには、5頭前後の牛から一度に経膈採卵する必要がある。

更なるコスト低減のためには、やはり1頭当たりの優良卵子の採取数を増加させる必要があり、近年は卵胞刺激ホルモン剤を投与し、卵胞数を増やした後で、経膈採卵をする試みもなされている。²⁾

2 採取した卵子の体外受精技術

小試験管に回収した卵子は、赤血球や白血球、粘液ならびに血液凝固阻止剤として還流液に添加したヘパリンの影響等により衰弱または死滅する危険性がある。しかし分割卵数に占める移植可能胚への発生は48.3%で、当所での体外胚の発生率とほぼ同じ値を示した。本試験では経膈採卵から約1時間以内に卵子の洗浄・選別を開始できた。このように、卵子の吸引採取から成熟培養までの操作が1時間以内に完了すれば、その後の卵子の発育に大きな障害がないことが判明した。

3 1ヶ月以内での経膈採卵の繰り返し

卵子の採取数は、1回目に比べ2回目の方がわずかながら向上した。これは経膈採卵技術が向上したことによると推測される。

また、1回目の採卵操作により卵巣は、少なからず損傷があったと考えるが、2回目以降も正常卵子が採取できたことから、卵巣の回復はかなり早く、10日間隔の経膈採卵でも卵子が採取できることの可能性が示唆された。

卵巣内の卵胞には7日間隔または10日間隔の発育波があり、この波に合わせて複数の卵子が発育・退行を繰り返している。小西ら³⁾は、経膈採卵日を0日として、1, 2, 3, 4日目および7日目の卵巣の状況を超音波診断装置で確認したところ、小卵胞(2mm~4mm)数は7日間通じて変化はないものの、中卵胞(6mm~9mm)数は2~4日目で増加し7日目に減少したため、継続しての採卵を行う場合には7日間隔よりも3, 4日間隔で実施する方が採取卵子数が増加すると報告している。

この様に、経膈採卵の実施にあたっては各個体の卵胞波を十分に把握し、より多くの卵胞が発育した時点で行うことにより、正常卵子数の増加が期待できると思われた。

引用文献

- 1) 青木義和、三溝成樹、藤田 耕、藤谷泰裕、内海恭三(1997):ウシの繁殖生理状況の違いが超音波経膈採取成績に及ぼす影響、日本胚移植学雑誌 19(2), 117-123.
- 2) Bordignon, V, Morin, N, Durocher, J, Bousquet, D and L. C. Smith (1996): Effect of injection on recovery rate, meiotic synchronization and developmental competence of oocytes aspirated from ovaries, Theriogenology 45, 352.
- 3) Garcia, A and M. Salaheddine (1998), Effect of ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development: Theriogenology 50, 575-585.
- 4) 橋本 周、長尾慶和、佐伯和弘、清家 昇、永井正信(1996):超音波断層診断装置を用いて経膈的にウシ生体から採取した卵子の発育機能の検討、日本胚移植学雑誌18(3), 206-209
- 5) 今井 敬、小林修司、後藤裕司、新納正之、辻野堂史、宮澤 彰、小島敏之(1998):黒毛和種における超音波ガイド生体卵子吸引を用いた胚生産、第13回東日本受精卵移植技術研究会大会講演要旨, 58
- 6) 小西正人、青木敬人、武富敏郎、宇留野勝好(1999):経膈採卵技術の現場への普及にむけて、日本胚移植学雑誌21(1), 49-52.
- 7) 京都大学農学部ほか(1995):胚生産のための超音波ガイドによるウシ卵母細胞の経膈回収と体外受精、日本胚移植学雑誌 17(2), 132-139.
- 8) 永井 卓(1995):牛卵胞の経膈反復採取と体外受精、日本胚移植学雑誌 17(1), 34-37.
- 9) 坂口慎一、井口光国、小林直彦、藤谷泰裕、三溝成樹、内海恭三(1995):超音波診断装置を利用した繁殖不適和牛からの連続経膈採卵、日本胚移植学雑誌 17(2), 94-101.
- 10) 坂口慎一、井口光国、小林直彦、下垣内重三、三溝成樹、藤谷泰弘、内海恭三(1994):超音波診断装置を利用した和牛からの連続経膈採卵、第5回西日本胚移植研究会講演要旨 11
- 11) 谷本保幸、後藤和文、上村俊一、石田 誠、田中道弘、多久津昌治、中西喜彦、柳田宏一、窪田 力、加治佐修、山口 浩、川端健次、堤 知子、横山喜世志(1993):超音波ガイドによるウシ卵子の経膈卵と体外受精、繁殖技術研究会誌 15(3), 181-185.

Establishment of Techniques for Production of Number of Bovine

Embryos

(Studies on Ovum Pick-Up technique to collect many normal ovum and efficiently product of cows embryo by in vitro fertilization.)

Hiroaki SHIMADA, Yukiyo YOTANI, Yasuhiro NISHI, Hideo SAKAKIBARA

Abstract

To establish the technique for an efficient production of bovine embryos, we carried out the extraction of ovum from an ovarian follicle and tried their in vitro fertilization and culture, by using 14 Japanese black cows. The Ovum Pick-Up (OPU) operation for several cows was repeated twice or more. Seventy ovum were extracted by 25 operations. But it was 53 ovum that were normal, giving 2.1 ovum for an operation on the average. Fourteen out of 53 extracted normal ovum could develop to the embryos by in vitro fertilization. The rate of development (24.6%) was very similar to that obtained previously for the ovum from slaughtered cows ovary.

key words: Ovum Pick-Up (OPU), Numbers of normal ovum,
Development rate to embryo