

# 超音波誘導経膈採卵法 (Ovum Pick-Up : OPU) 技術の確立

## (2) と場卵巢由来卵胞卵を用いた培養試験

堺龍樹 建本秀樹\*

### I 要 約

OPUにより体外受精(IVF)を実施するにあたり、その基礎研究の追究として、前報<sup>1)</sup>とは異なる3頭の種雄牛C, Y, およびKの凍結精液を媒精に用い、IVFによる胚作出技術への適応性を検査するため、屠殺された雌畜の卵巢を用いた精子受精の評価試験および胚発生(IVC)試験をおこなった。その結果は以下の通りであった。

- 1 種雄牛C, Y, およびKの3種類の凍結精液を用いた結果、各々の体外成熟(IVM)卵への精子侵入率は順に89.5%, 50.0%および90.6%であった。
- 2 種雄牛C, Y, およびKの雄性前核形成卵率は順に100.0%, 88.9%および96.9%であった。
- 3 種雄牛C, Y, およびKにおける総胚盤胞期胚の発生率は順に44.4%, 2.6%および47.4%であった。
- 4 種雄牛CおよびKは種雄牛Yと比較し受精能と総胚盤胞期胚の発生率は高く、特に総胚盤胞期胚の発生率においてはYとの間に有意な差を認めた。

上記のことから種雄牛CおよびKの凍結精液は、IVFによる胚作出に適応性があると判明した。

### II 緒 言

OPUとIVFによる体外受精胚生産は、子宮灌流による体内胚採卵法を代替する胚生産法として多くの研究者により開発されてきた<sup>2, 3)</sup>。また、体内受精卵生産の際に必須の過剰排卵処置(SOV)を必ずしも必要としないため、SOVに反応しない供卵牛(繁殖障害等)や妊娠期牛からも採卵が可能である<sup>3)</sup>などの期待は大きい。

沖縄県は肉用子牛生産において全国有数の繁殖地帯であり、高能力種雄牛の造成と育種価に優れた母牛群の整備が今後の課題となっている。そこで、OPU技術を用いて優良雌牛から継続的に週に1-2回の頻度で採卵をおこない、卵胞卵のIVM、ならびに優良雄牛精子とのIVFにより、凍結保存に耐え得るだけの良質な胚を生産できれば、効果的な優良牛の普及拡大ならびに遺伝資源の保護が容易になる。

そこで、本研究ではOPUによるIVF/IVC由来胚の生産技術の研究を進めており、前報<sup>1)</sup>において、OPUによるウシ体外作出胚の安定した生産ならびにガラス化凍結保存の根幹は確立されたが、IVFに供する種雄牛凍結精液毎にその適応性が大きく異なった。そこで、今回は沖縄県で現在繋養している種雄牛から3頭を選び、IVF/IVCによる体外での胚生産に利用できる種雄牛凍結精液を選抜することを目的とした。

### III 材料および方法

#### 1. 試験期間および試験場所

試験は2022年11月から2023年1月まで琉球大学農学部家畜繁殖学研究室にて培養実験を実施した。

#### 2. 試験方法

##### 1) 材料

(株)沖縄県食肉センターで屠殺された雌牛卵巢を高圧蒸気滅菌済み0.9%(w/v)生理食塩水内で30℃輸送し、卵巢表面の直径が3~8mm以下の小卵胞から吸引採取した4層以上の卵丘細胞に密に覆われ卵細胞質が均一な卵胞卵を用いた。

媒精には沖縄県畜産研究センターで製造し、供用されている種雄牛C, Y, およびKの凍結精液を用いた。

## 2) IVM

吸引採取した卵丘細胞-卵子複合体 (COCs) は、TL-HEPES-PVA 溶液内で再選別および洗浄を行った。そして、IVM 培地ドロップ (100  $\mu$ L) 毎に卵丘細胞-卵子複合体 (Cumulus-Oocyte Complexes; COCs) を 16-20 個ずつ入れ、5%CO<sub>2</sub>、95%空気、38.5°Cで 21-22 時間の IVM 培養をおこなった。TL-HEPES-PVA 溶液および IVM 培地組成は、表 1 に示した。

表 1 TL-HEPES-PVA溶液およびIVM培地の組成

| TL-HEPES-PVA溶液                       |               | IVM培地                           |               |
|--------------------------------------|---------------|---------------------------------|---------------|
| NaCl                                 | 114mM         | Medium 199 HEPES Modification   |               |
| KCl                                  | 3.2mM         | -Powder (M-2520; Sigma-Aldrich, |               |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>     | 0.34mM        | -St. Louis, MO, USA)            | 15mg/ml       |
| MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O | 0.5mM         | NaHCO <sub>3</sub>              | 26.18mM       |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 2mM           | New born calf serum (NCS)       | 10%(v/v)      |
| NaHCO <sub>3</sub>                   | 2mM           | Cysteine                        | 0.6mM         |
| HEPES                                | 10mM          | LH                              | 0.02U/ml      |
| Na-pyruvate                          | 0.2mM         | FSH                             | 0.04U/ml      |
| Na-lactate                           | 10mM          | Penicillin G                    | 100IU/ml      |
| Penicillin G                         | 100IU/ml      | Streptomycin                    | 50 $\mu$ g/ml |
| Streptomycin                         | 50 $\mu$ g/ml |                                 |               |
| PVA                                  | 0.01%(w/v)    |                                 |               |

## 3) IVF および IVC

IVM 終了後、IVF 培地 (BO-IVF; IVF Bioscience, Cornwall, UK) 内で COCs を洗浄した後、IVF 培地ドロップ (100  $\mu$ L) に 15-20 個ずつ移した。一方、0.5 mL ストローの牛凍結精液を融解し BO-SemenPrep (IVF Bioscience) に攪拌し遠心分離操作で 2 回洗浄し、精子濃度が約  $1.0 \times 10^8$ /ml で 4  $\mu$ L を COCs の入った IVF 培地ドロップに加えて培精をおこない、5% CO<sub>2</sub>、95%空気、38.5°C条件下で 16~20 時間の共培養の後、各核相の卵子を観察し、精子受精の評価試験をおこなった。また、IVF 後、卵透明帯表面に付着している精子および卵丘細胞をピペッティングにより削剥した裸化卵を IVC 培地 (BO-IVC; IVF Bioscience) の各ドロップ (50  $\mu$ L) に 20~30 個ずつ移し、マルチガスインキュベーター (38.5°C, 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>) 内で 8 日間の IVC 培養をおこなった。

### 3. 調査項目

#### 1) 各種雄牛凍結精液における受精能

3 種類の県有種雄牛凍結精液を用いて IVF をおこない、各凍結精液の精子侵入率、多精子侵入率および雄性前核形成率を調査し、体外受精による受精能を比較した。

#### 2) 総胚盤胞胚発生率

IVF 日を 0 日目とし、2 日目 (IVF 40 時間後) に分割率を、6~8 日目で胚盤胞期胚への発生率を調査した。

#### 3) 統計処理

統計処理は、カイ二乗検定を用い、5%棄却域で有意差を求めた。

## IV 結 果

### 1. 各種雄牛凍結精液における受精能

3種類の県有種雄牛凍結精液を用いて IVF をおこない、各精子の受精能を調べた結果を表 2 に示した。種雄牛 C および K で、それぞれ 89.5%と 90.6%の高い精子侵入率が得られた。いっぽう、種雄牛 Y の精子を用いた IVF 時には、50.0%の精子侵入率であった。供試卵数が少なく統計処理による有意差は認められなかったが、種雄牛 C 及び K の受精能力は種雄牛 Y に比較して高い傾向にあった。また、いずれの個体の凍結精子においても、高い雄性前核形成率(88.9-100.0%)が観察された。

表 2 3種類の種雄牛凍結精液を用いた体外受精による受精能の比較試験

| 種雄牛 | 媒精卵子数 | 各核相の卵子数 (%) |                      |                       |
|-----|-------|-------------|----------------------|-----------------------|
|     |       | 精子侵入卵       | 多精子侵入卵 <sup>1)</sup> | 雄性前核形成卵 <sup>1)</sup> |
| C   | 19    | 17 (89.5)   | 2 (11.8)             | 17 (100.0)            |
| Y   | 18    | 9 (50.0)    | 0 (0.0)              | 8 (88.9)              |
| K   | 32    | 29 (90.6)   | 6 (20.7)             | 28 (96.9)             |

注 1) 精子侵入卵当たりの卵子数.

### 2. 種雄牛凍結精液別発生率

3種類の県有種雄牛凍結精液を用いて IVF をおこない、各精子の胚発生能を調べた結果を表 3 に示した。IVF 後 2 日目の分割率は、種雄牛 C および種雄牛 K が 92.6%, 92.1%であり、共に高い分割率を示した。しかし、種雄牛 Y の分割率は 5.3%であり、他の 2 種雄牛に比較して有意に低い値であった(P<0.05)。そして、高い分割率を示した種雄牛 C と種雄牛 K の IVF 由来胚は、それぞれ 44.4%と 47.4%の非常に高い胚盤胞期胚への発生率を示した。胚盤胞期胚の出現日に着目すると、種雄牛 C の IVF 由来胚の方が種雄牛 K の IVF 由来胚に比べて 1 日早い発生を示した。

表 3 3種類の種雄牛凍結精液を用いた体外受精後の胚発生試験

| 種雄牛 | 媒精卵子数 | 分割率 (%)   | 胚盤胞期への発生胚数 (%) |          |           | 総胚盤胞期胚数 (%) |
|-----|-------|-----------|----------------|----------|-----------|-------------|
|     |       |           | 6日目            | 7日目      | 8日目       |             |
| C   | 27    | 25 (92.6) | 0 (0.0)        | 9 (36.0) | 3 (11.1)  | 12 (44.4)   |
| Y   | 38    | 2 (5.3)*  | 0 (0.0)        | 0 (0.0)  | 1 (2.6)   | 1 (2.6) *   |
| K   | 38    | 35 (92.1) | 0 (0.0)        | 6 (15.8) | 12 (34.3) | 18 (47.4)   |

注) 他の個体に比較して有意差を認める(P<0.05).



写真1 種雄牛Cで作出したIVF7日後の胚盤胞期胚

## V 考 察

各種雄牛凍結精液における受精能の比較試験について、精子侵入率は種雄牛C, YおよびKでそれぞれ89.5%, 90.6%, 50.0%であり、雄性前核形成率は、それぞれ100.0%, 88.9%, 96.9%であった。この結果からは、種雄牛3種類ともに、今後のOPU卵による体外発生胚作出を目指した各種試験に供する受精能力を持っていると考えられた。

一方IVFによる胚盤胞発生数及び発生率は、個体により大きな差があると報告されている<sup>4, 5)</sup>。3種類の沖縄県種雄牛凍結精液の内、種雄牛C及びKは胚盤胞期胚への発生率が高い傾向にあった。この結果から、OPU卵を用いたIVFを行う際の凍結精液は種雄牛C及びKが最適であると考えられた。いっぽう、種雄牛Yの受精率は50%と低く、胚盤胞期胚への発生は僅か2.6%であった。他の種雄牛に比較して受精率ならびに発生率が低い値を示したことから、種雄牛Yは体外での発生能が極めて低い精子であると考えられる。今回のIVC試験では、媒精卵子数が少ないため、確証は得られないが、種雄牛Yの繁殖能力に関わる遺伝子に何らかの欠損がある可能性を否定できない。

また、IVCをIVF Bioscience社製のIVF培地とIVC培地を使用し、3種混合インキュベーター内で酸素分圧を5%に低下させた条件で行ったところ、種雄牛C及びKのIVF由来胚の胚盤胞期胚への発生率は44.4~47.4%と非常に高い値を示し、特に、種雄牛CのIVF由来胚では、IVF後7日目で総胚盤胞期胚の3/4に及ぶ大多数の胚が胚盤胞期に発生した。いっぽう、種雄牛KではIVF後8日目で多くの胚が胚盤胞期に達した。このことは、種雄牛Cの胚発生の活力が高いことを意味しており、OPUによるIVF/IVC胚を移植した際に種雄牛Cの方が高い受胎率が得られるものと推察できる。さらに、胚盤胞の品質の新たな指標<sup>6, 7)</sup>などに沿った胚の選別、すなわち、今後、胚盤胞期胚における割球数やTUNEL陽性細胞数の測定を実施することで、胚発生能や品質のさらなる検討が必要であると考えられる。また、今後OPUによって作出した胚盤胞期胚を受胎牛に移植することを考えると、フィールドでの1step融解が可能なプログラムフリーザーを使用した緩慢凍結胚を作出し、実用化に向けた研究を実施する必要がある。

## 謝 辞

本研究に協力していただきました琉球大学農学部家畜繁殖学研究室の皆様へ深く感謝いたします。また、卵巣採取に協力していただきました(株)沖縄県食肉センター職員の皆様へ感謝申し上げます。

## VI 引用文献

1) 西山朱音・建本秀樹・平安山英登(2021)超音波誘導経膈採卵法(Ovum Pick-Up: OPU)技術の確立, 沖

縄畜研研報, 59, 5-11

2) 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膣採卵, 日本胚移植学会雑誌, 17, 94-101

3) 今井敬・田川真人(2006)OPU-IVFによるウシ胚の作出, その効率と汎用性, 日本胚移植学会雑誌, 28, 29-35

4) 秋山清・坂上信忠・仲澤慶紀(2009)経膣採卵と体外受精による牛胚の生産, 神奈川県畜産技術センター研究報告, 2, 1-5

5) 黒澤功(1993)牛の改良を目的とした体外受精, 群馬農業研究 C 畜産, 10, 151-154

6) Satoshi Sugimura, Tomonori Akai, Yutaka Hashiyada, Tamas Somfai, Yasushi Inaba, Muneyuki Hirayama, Tadayuki Yamanouchi, Hideo Matsuda, Shuji Kobayashi, Yoshio Aikawa, Masaki Ohtake, Eiji Kobayashi, Kazuyuki Konishi, Kei Imai(2012)Promising System for Selecting Healthy In Vitro-Fertilized Embryos in Cattle, *PLoS One*, 7(5), e36627

7) 中橋冬陽・小林大誠・山下秀幸(2019)ウシ体外受精胚生産における高品質胚の簡易判別技術の開発と培養液の改善, 千葉県畜産総合研究センター研究報告, 19, 1-6