

牛の体外受精技術確立試験

(1) 体外培養方法の検討

野中克治 山城 存 渡久地政康

I 要 約

屠殺された牛の卵巣を有効利用するため、体外受精技術を活用して胚の生産を行い、その培養方法と胚発生成績について検討を行った。その結果は次の通りであった。

1. 屠殺理由別の分割率及び胚盤胞発生率の平均は、肥育牛で52.6%及び13.0%、繁殖廃用牛で45.5%及び12.8%であった。胚盤胞発生数は、肥育牛2.1個、繁殖廃用牛3.8個であった。
2. 1頭当たりの胚盤胞発生数及び発生率は0～10個及び0～41.7%の範囲であった。
3. 種雄牛T、F及びSの精子の胚盤胞発生率は13.7%、8.9%及び15.6%であった。
4. 培養液200 μ lに対して、培養卵子数が10個以下、11～20個、21～30個及び31個以上の胚盤胞率は、9.6%、14.3%、20.5%及び8.9%であった。
5. 発生培地への5 μ Mシステアミン添加は、胚盤胞発生率を高めた ($P < 0.01$)。また、システアミンの添加濃度を高めると胚の発育停止が早まった。

II 緒 言

牛の体外受精は、食肉処理場で屠殺された牛の卵巣を有効利用することで、胚を大量に供給できる可能性がある。また、個体毎に卵子の体外成熟、受精及び発生培養を実施することが可能であり、屠殺された雌牛の血統及び枝肉成績の情報を利用すれば、付加価値の高い胚生産が可能である。

そこで、今回、屠殺された雌牛の卵巣を個体毎に採取して体外受精胚の生産を行い、その培養方法と胚発生成績について検討した。

III 材料及び方法

1. 試験期間

1994年4月から1995年3月まで実施した。

2. 試験方法

1) 材 料

屠殺された黒毛和種の肥育雌牛41頭、繁殖廃用雌牛16頭の卵巣を個体別に分け、それぞれの卵巣から採取した卵子を用いた。

2) 培養方法

- (1) 成熟培養：5%子牛血清加TCM199培地で22時間行った。
- (2) 媒精：ピルビン酸ナトリウム0.138mg/ml、グルコース1.5mg/ml、カフェイン5 mM及びヘパリン60 μ g/ml加TCM培地で精子洗浄を行った後、同液に牛血清アルブミン10mg/ml加えた等量液で希釈して行った。供試精子は試験場繁殖の種雄牛3頭の精子を用いた。
- (3) 発生培養：2%子牛血清及びピルビン酸ナトリウム0.11mg/ml加TCM199培地の200 μ lドロップで行った。システアミン添加による胚発生の効果試験では、媒精終了72時間後の発生培養液にシステアミンをそれぞれ5、10及び50 μ Mの添加を行った。
- (4) 培養条件：2.5%CO₂、38.5°Cの条件下で卵丘細胞との共培養で行った。また、成熟、媒精及び発生培養まで卵子の移動は行わず、培養液のみを2日毎に交換した。

3) 調査項目及び調査方法

- (1) 屠殺理由別胚発生成績：肥育牛及び繁殖廃用牛に分け、それぞれの分割率と胚盤胞率を調べた。
- (2) 胚盤胞発生数別頭数分布：胚盤胞発生数に対する頭数分布を調べた。
- (3) 胚盤胞発生率別頭数分布：胚盤胞発生率に対する頭数分布を調べた。
- (4) 種雄牛別胚発生成績：肥育牛について供試精子別に分割率と胚盤胞率を調べた。
- (5) 卵子数別胚発生成績：培養卵子数別に分割率と胚盤胞率を調べた。
- (6) システアミン添加による胚発生の効果：それぞれのシステアミン添加濃度における胚盤胞発生率と胚盤胞発生日について調べた。

IV 結 果

1. 屠殺理由別胚発生成績

屠殺理由別胚発生成績は表-1に示した。肥育牛41頭から683個(平均17個)、繁殖廃用牛16頭から470個(平均29個)の培養可能な卵子が採取された。これらの媒精後における分割率の平均は、肥育牛で52.6%、繁殖廃用牛で45.5%であった。胚盤胞率の平均は、肥育牛で13.0%、繁殖廃用牛で12.8%であった。分割率は肥育牛が繁殖廃用牛に比べて高い傾向にあったが、胚盤胞率はほぼ同じであった。また、1頭当たりの胚盤胞発生数は、肥育牛2.1個に比べて繁殖廃用牛3.8個が多い傾向にあった。

表-1 屠殺理由別胚発生成績

屠殺理由	頭数	卵子数	分割数(%)	胚盤胞数(%)	胚盤胞数/頭
肥育牛	41	683	359 (52.6)	89 (13.0)	2.1
繁殖廃用牛	16	470	214 (45.5)	60 (12.8)	3.8

2. 胚盤胞発生数別頭数分布

胚盤胞発生数別頭数分布は図-1に示した。1頭当たりの胚盤胞発生数の平均は2.6個、その範囲は0~10個とバラツキがあった。また、胚盤胞発生数が1個の個体が17頭で最も多かった。

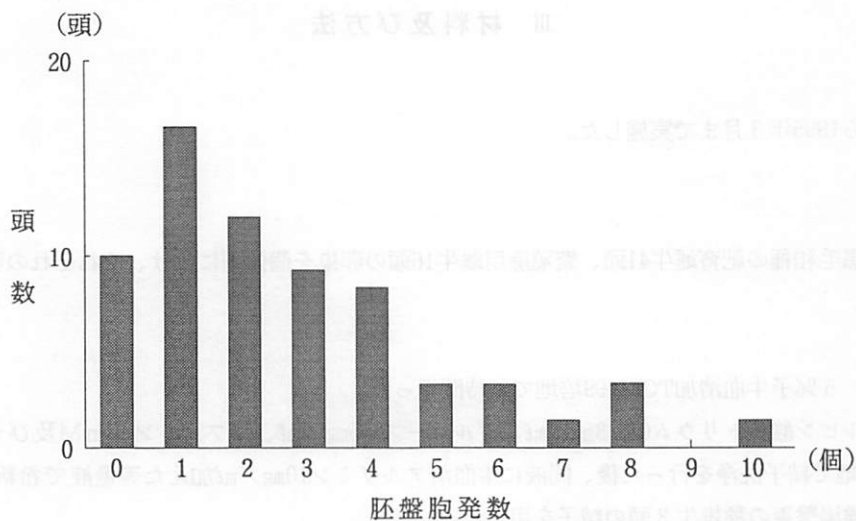


図-1 胚盤胞発生数別頭数分布

3. 胚盤胞発生率別頭数分布

胚盤胞発生率別頭数分布は図-2に示した。1頭当たりの胚盤胞発生率の平均は12.9%、その範囲は0~41.7%とバラツキがあった。また、胚盤胞発生率11~20%の個体が25頭で最も多かった。

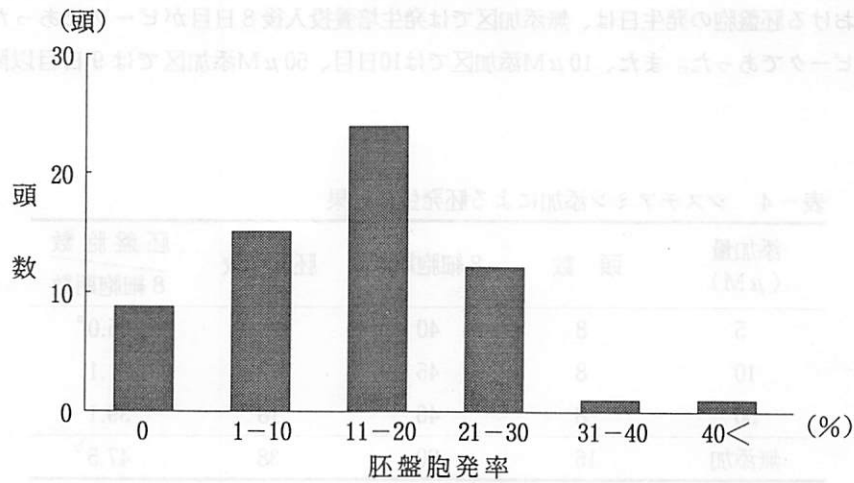


図-2 胚盤胞発生率別頭数分布

4. 種雄牛別胚発生成績

種雄牛別胚発生成績は表-2に示した。肥育牛におけるT、F及びSの精子を使用した場合の分割率は54.7%、43.3%及び56.9%、胚盤胞発生率は13.7%、8.9%及び15.6%で、いずれもS精子で高い傾向にあった。しかし、それぞれの種雄牛精子間の分割率及び胚盤胞発生率における有意差 ($P < 0.05$) はなかった。

表-2 種雄牛別胚発生成績

種雄牛精子	頭数	卵子数	分割数 (%)	胚盤胞数 (%)	胚盤胞数/頭
T	25	366	200 (54.7)	50 (13.7)	2.0
F	8	157	68 (43.3)	14 (8.9)	1.8
S	8	160	91 (56.9)	25 (15.6)	2.6
計	41	683	359 (52.6)	89 (13.0)	2.1

5. 卵子数別胚発生成績

卵子数別胚発生成績は表-3に示した。培養卵子数が10個以下、11~20個、21~30個及び31個以上の分割率は42.6%、56.0%、52.4%及び44.6%、胚盤胞発生率は9.6%、14.3%、20.5%及び8.9%であった。培養卵子数が21~30個で最も高く、31個以上で低かったが、それぞれの間には有意な差はなかった ($P < 0.05$)

表-3 卵子数別胚発生成績

卵子数	頭数	卵子数	分割数 (%)	胚盤胞数 (%)
≤10	13	94	40 (42.6)	9 (9.6)
11~20	15	252	141 (56.0)	36 (14.3)
21~30	7	185	97 (52.4)	38 (20.5)
31≤	6	305	136 (44.6)	27 (8.9)

6. システアミン添加による胚発生の効果

システアミン添加による胚発生の効果とその胚盤胞発生分布は表-4及び図-3で示した。システアミンを媒精終了72時間後の発生培地に5、10及び50 μM 添加した。その結果、胚盤胞の発生した割合は、無添加区47.5%、5 μM 添加区65.0%、10 μM 添加区51.1%及び50 μM 添加区39.1%であった。5 μM 添加区は無添加区に比べて有意に高かった ($P < 0.01$)。また、無添加区に比べて10 μM 添加区は高い傾向にあり、50 μM 添加区は低い傾向にあったが、有意な差はなかった ($P < 0.05$)。

これら各区における胚盤胞の発生日は、無添加区では発生培養投入後8日目がピークであったのに対し、添加区では7日目がピークであった。また、10 μ M添加区では10日目、50 μ M添加区では9日目以降全ての胚は発育が停止した。

表-4 システアミン添加による胚発生の効果

添加量 (μ M)	頭数	8細胞期数	胚盤胞数	胚盤胞数 8細胞期数
5	8	40	26	65.0 ^a
10	8	45	23	51.1
50	8	46	18	39.1
無添加	16	80	38	47.5 ^b

注) 1%レベルで異符号間に有意差あり

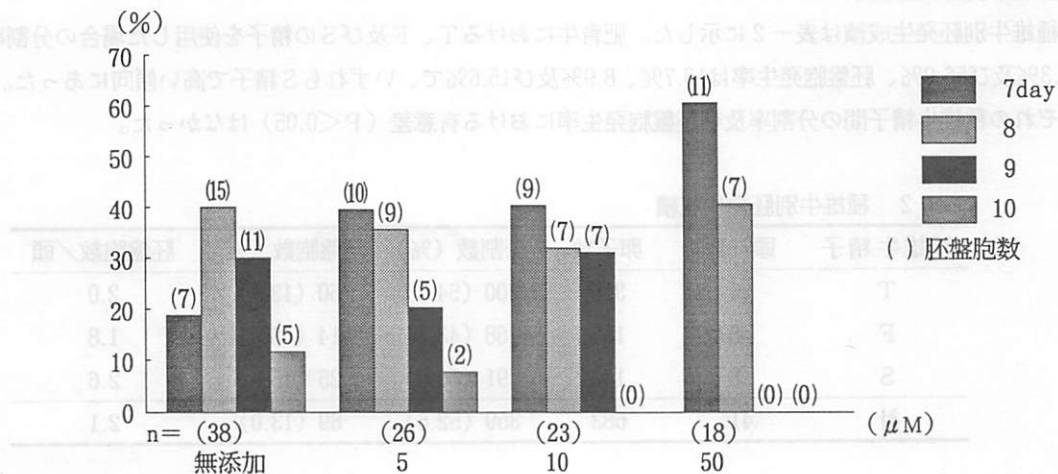


図-3 システアミン添加による胚盤胞発生日分布

V 考 察

屠殺理由別胚発生成績では、肥育牛と繁殖廃用牛の胚盤胞発生率はほぼ変わらなかったが、胚盤胞発生数は繁殖廃用牛で多かった。このことは、繁殖廃用牛の産歴は肥育牛に比べて多く、卵巣が大きく発達しており、卵胞が多く、そのため、採取される卵子数が多かったことによると思われる。

胚盤胞発生数及び発生率は、個体別に体外受精を行うと、個体によって大きな差があると報告されている^{1,2)}。今回の試験でも、個体によって大きなバラツキがあった。これらの要因の1つとして、媒精に使用する種雄牛精子や培養液量に対する培養卵子数の影響が考えられる。

種雄牛別胚成績で胚発生率の低い傾向にあった種雄牛精子については、分割率の向上が報告されているテオフィリン・ヘパリン法³⁾で行うことも検討する必要がある。

卵子数別胚発生成績で、培養卵子数が10個以下で胚盤胞発生率が低かったのは、卵丘細胞のシート形成が遅いことが考えられ、さらに、31個以上での低下は培養液量に比べて卵丘細胞が多すぎたため、栄養不足になったことが考えられた。これらのことから、培養液200 μ lに対する卵子数は21~30個が適当と思われる。今後は卵子数が多い場合は培養ドロップを分けることや、また、卵子数の少ない場合は、細胞増殖効果のあるシステアミンや β -メルカプトエタノールの添加も検討する必要がある。

還元剤であるシステアミンは牛胚のシステインの利用性を高め、発生環境を改善し、細胞数の増加を促進すると言

われている⁴⁾。システアミン添加による胚発生の効果で、高橋ら⁵⁾は卵丘細胞の共培養なしでは50 μ Mのシステアミン添加が適正量であると報告している。今回の試験は卵丘細胞との共培養で行い、この場合のシステアミン添加量は、5 μ Mが適正と思われた。しかし、50 μ Mでは卵細胞に対して還元作用が強すぎたため、胚発生率が低下したと思われた。

謝 辞

本試験の実施にあたり、卵巣採取に協力していただいた沖縄県食肉センター、沖縄県協同食肉株式会社、沖縄県北部食肉衛生検査所及び沖縄県中央食肉衛生検査所の職員に対し深謝いたします。

VI 引用文献

- 1) 黒沢 功 外 4 名、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
- 2) 秋山 清 外 3 名、1994、個体別体外受精による胚生産、第 9 回東日本家畜受精卵移植研究会大会講演要旨、49～50
- 3) 浜野晴三・桑山正成、1991、牛体外受精における異なる種雄牛の凍結・融解精子処理条件の検討、第 2 回西日本胚移植研究会講演要旨、9
- 4) 高橋昌志、1993、胚発生と酸化障害、ET ニュースレター、12、46～55
- 5) 高橋昌志 外 6 名、1992、牛体外受精胚の培養に及ぼすシステアミンの効果、第 85 回日本畜産学会大会講演要旨、4～6

研究補助：山田義智