

1. 牛の体外受精に関する試験(1)

—体外受精卵移植による子牛生産—

酪農科 奥 透・山口雅之・大串正明・野口弥市*
(*現 五島畜産技術センター)

緒 言

牛の受精卵移植技術は普及化が図られつつあるが、受精卵にかかる費用は高価であるため¹⁾、とくに黒毛和種の増殖を目的とした移植卵については低コスト化が望まれる。

近年、体外受精技術は急速な進展がみられ、完全体外培養で移植可能な胚盤胞まで発育させ、移植することにより産子を得ることができるようになった^{2) 3)}。本技術を利用してこれまで廃棄されていた卵巣中の卵子を利用して、安価な受精卵を生産することができる。

当場では主として梶原らの方法^{4) 6)}を追試し、本試験に取り組んできたので報告する。

材料及び方法

1. 卵 子

食肉処理場に出荷屠殺された牛(主としてホルスタイン種)の卵巣を生理食塩液(ペニシリン100iu/ml, ストレプトマイシン100μg/mlを含む)に投入し、約35°Cに保温して持ち帰り実験に供した。卵子の採取は22Gの注射針をつけた注射筒で2から7mmの卵胞から吸引した。卵子は3%子牛血清を含む修正磷酸緩衝液で2回洗浄後、さらに3回成熟培養液で洗浄後成熟培養に供した。成熟培養液は25mM HEPES 緩衝Earle型TCM 199(GIBCO)に5%子牛血清及び抗生物質を加えて用いた。1シャーレー(テルモ)に2.5mlの成熟培養液を入れ、ミネラルオイル(SQIBB)でおおい、20~70個の卵子を投入し、5%CO₂、39°C条件下で22時間成熟培養した。

2. 精子の処理

黒毛和種の凍結精液を用い、融解後5mM テオフィリン、10μg/mlヘパリン、2.5mg/mlBSAを含むBO液で3回遠心分離(1600rpm)により洗浄後、精子濃度が $16 \times 10^6 / ml$ になるように調製し

た。100μlのドロップとして精子の前培養を3時間行った。

3. 媒精及び発生

精子の前培養終了後、卵子は上記BO液で2回洗浄後、精子のドロップに10~15個づつ投入し、6時間媒精を行った。その後卵子は発生用シャーレーに移し、1%牛血清を含むTCM 199で培養した。媒精開始48時間後にピペettingにより卵丘細胞より卵子を遊離し、そのまま卵丘細胞と共に培養した。培養液の交換は48時間毎に行った。

4. 体外受精卵の凍結、融解、培養方法

胚盤胞まで発育した体外受精卵は従来の牛からの回収卵と同様に、グリセリンを含む修正磷酸緩衝液に3段階(3%、6%、10%)で添加し、-6°Cで植氷後、-30°Cまで0.3°C/分で冷却し、-30°Cで10分保持して液体窒素中に投入して保存した。

35°Cの水で融解し、凍結と逆に3段階(10%、6%、3%)で、各10分ずつ脱グリセリンを行った。

培養は5%CO₂39°Cの条件下で5%CS加TCM 199に体外受精卵を入れ48時間行った。

5. 移 植

形態的に良好と思われる新鮮卵、凍結融解卵を場内繫用ホルスタインを受卵牛として頸管経由法で移植した。なお本試験は昭和63年度に行った。

結果及び考察

1. 吸引法で得られる体外成熟培養に適する卵子数は1頭当たり約10個で、全採取卵数の60%程度とされている。⁵⁾。今回ホルスタイン種14頭から採取した総卵子数は296個であり1頭当たり21個となったが、これは体外受精に不適とされる卵丘細胞の付着していないもの、細胞質の均一でないものも含めたためと思われる。

また吸引回数に対する採取卵数も半分程度であり、実用面から、より効率のよい採取方法の検討が必要である。

表1 体外受精卵の発育

供試卵数	2細胞	8細胞以上	胚盤胞
296	182 (61.5%)	82 (27.7%)	46 (15.5%)

2. 精子の処理、媒精については梶原らの方法⁶⁾で行ったが、ヘパリン・BSAを最初から加えてあるため作業の面では簡便で、実用的であると思われる。

体外受精卵の発育については供試卵数296個中2細胞以上に発育したものが182個(61.5%)、8細胞以上に発育したものが82個(27.7%)、胚盤胞以上に発育したものが46個(15.5%)であった(表1)。媒精後胚盤胞に発育した日数は7日目が23個(50.0%)、8日目が17個(37.0%)、9日目が6個(13.0%)であった。また、これらの中で移植可能と思われる形態のものは31個(67.3%)であった。

宅萬ら⁷⁾は発生培地での最適卵数は1シャーレーあたり50個~100個がよいと述べている。今回は1シャーレーあたり20~70個を用いたが、発育率に差は見られなかった。

上田ら¹⁰⁾はヘパリン処理した2種類の精液を用い、胚盤胞への発育率で25%、17%の成績を得ている。今回は無選別ですべての卵子を用いた結果、胚盤胞への発育率が5.5%であったことを考慮すると、ほぼ同様の成績であると考えられる。

梶原ら⁶⁾は子宮内膜細胞と共培養し、胚盤胞への発育率で30~40%の成績を得ており、坊園ら⁸⁾も卵管上皮細胞、子宮内膜上皮細胞との共培養で良好な成績を得ているため、今後これらの方法も取入れ検討する必要がある。

表2 凍結体外受精卵の培養成績

融解卵数	透明帯 破損卵数	生存卵数	脱殻卵数
15	3 (20%)	6 (40%)	4

3. 凍結した体外受精卵の融解後の生存性を培養成績で見た結果、15個中6個が生存し(40%)、内4個が脱殻した。また3個について透明帯の破損がみられた(表2)。

移植成績については新鮮卵を5頭に、凍結卵を3頭に移植し、それぞれ2頭および1頭が受胎した(受胎率40%、33%、表3)。生まれた子牛はすべて単子で、生時体重は雄32.3kg、雌は49.5kgと49.0kgであった。

また著者らは本試験に先立ち、昭和62年10月から昭和63年2月まで鹿児島大学家畜繁殖学教室で、冷凍庫を用いた方法で凍結保存した体外受精卵の融解培養、野外移植試験²⁾を実施したので参考として掲げた(表4、表5、表6)。

体外受精卵は体内受精卵に比較し凍結能が低いことが報告⁹⁾¹⁰⁾されている。今回の融解培養試験でも同様であり、耐凍剤、凍結方法、耐凍剤除去法などの検討が必要である。

表3 移植成績

受卵牛NO	発情後日数	受精卵の種類	移植個数	妊否	性	生時体重	妊娠期間
ホル1	8	新鮮 B1	1	+	♂	32.3kg	287日
ホル2	8	新鮮 B1	2	+	♀	49.5	280日
ホル3	8	新鮮 B1	2	—			
ホル4	8	新鮮 B1	2	—			
ホル5	7	新鮮 B1	2	—			
ホル6	7	凍結 B1	1	+	♀	49.0	290日
ホル7	7	凍結 B1	2	—			
ホル8	8	凍結 B1	3	—			

表4 凍結体外受精卵の培養成績 (鹿児島大学分)

融解卵数	生存卵数	生存率
58	21	36.2%

表5 凍結体外受精卵移植成績 (鹿児島大学分)

移植頭数	受胎頭数	受胎率	流産頭数
23	7	30.4	3

表6 凍結体外受精卵移植牛生産状況 (鹿児島大学分)

受卵牛NO	発情後日数	移植個数	産子性	生時体重	妊娠期間
広瀬25	7	2	♂	35.0	284
サバスカ	7	3	♂	32.6	292
広瀬77	8	2	♀	50.0	295
広瀬82	7	2	♂♀	27.0・9.0	265

注) 昭和62年10月～昭和63年2月に実施

岸哉枝, 柳沢香奈江, 福田芳, 豊田裕: 家畜繁殖学会講演要旨(1987)

- 4) 梶原豊, 後藤和文, 小坂昭三, 中西喜彦, 小川清彦: 家畜繁殖学雑誌33, 173-180 (1987)
- 5) 花田章, 塩谷康生: 畜産試験場年報25 (1987)
- 6) 梶原豊, 米谷尚子, 小山恒太郎, 菱山和洋, 小紫雄治, 小林里美, 白岩憲司, 安積弥一郎: 家畜繁殖学会講演要旨(1988)
- 7) 宅萬義博, 後藤和文, 木庭正光, 徳丸元幸, 中西喜彦, 小川清彦: 家畜繁殖学会講演要旨(1989)
- 8) 坊園正恒, 谷之木精吾, 中原高士, 岩崎英明: 西日本畜産学会講演要旨(1989)
- 9) 舟橋弘晃, 武富敏郎, 板倉はつえ, 武田哲夫, 鬼原辰雄: 全農飼料畜産研究所 試験研究報告 17, 381-389 (1989)
- 10) 上田修二, 大崎順子, 山下滋貴, 田口清美: 福岡農総試研報C-9, 19-24 (1989)

要 約

完全体外培養系による体外受精を試み次の結果を得た。

1. 1頭当りの総採取卵数は22個であった。
2. 受精後発育した卵は61.5% (182/296), 8細胞以上に発育したものが27.7% (82/296), 胚盤胞以上に発育したものが15.5% (46/296)であった。
3. 凍結卵の融解培養試験により生存率は40%であった。
4. 新鮮卵を5頭に, 凍結卵を3頭に移植しそれぞれ2頭と1頭が受胎した。

参考文献

- 1) 田中尚道, 砂川正広, 笠原民夫, 木暮誠一: 群馬農業研究C-5, 5-8 (1988)
- 2) 後藤和文, 梶原豊, 木庭正光, 江副幹太, 柳田宏一, 中西喜彦, 小川清彦, 奥透, 藤山雅照, 吉田豊昭: 日畜学会講演要旨(1988)
- 3) 市川優樹, 大武勝弘, 菅原重行, 富田一司, 根