

原 著

繁殖障害ホルスタイン種乳牛に対する 経膈生体内卵子吸引-体外受精・培養法の適用

平田統一¹⁾, 塩倉健一²⁾, 宇名澤和幸³⁾, 山本公平⁴⁾, 伊藤葉子⁴⁾,
佐々木修一¹⁾, 佐々木 修¹⁾, 杉澤 規¹⁾

要 約

地域の基幹牛として期待されながら、繁殖障害で廃用予定であった牛に経膈生体内卵子吸引-体外受精・培養法 (OPU-IVF・IVP法) を13回適用して20個の移植可能胚を生産することができた。本試験では胚移植後に産子を得ることはできなかったが、遺伝的価値が高い繁殖障害牛ではOPU-IVF・IVP法を治療代替的手法として採用することができる。

キーワード: OPU, IVF, 繁殖障害牛

経膈生体内卵子吸引-体外受精・培養法 (OPU-IVF・IVP法) は、その適用により妊娠期間がやや延長し産子の出生時体重や難産率がやや増加する [3] もの、特定血統の牛胚を短期間に大量生産できることのみならず、卵管や子宮環境に問題がある繁殖障害牛や多排卵誘起ホルモン処理に反応しない牛に適用して、移植可能な胚を生産できる治療代替的手法としても有効である (表1)。今回我々は、地域のホルスタイン種乳牛の改良に資するためカナダから導入したものの、繁殖障害で淘汰予定であった1頭にOPU-IVF・IVP法を適用し、産子を得ることを試みた。

材料および方法

供試牛は、大野村農村青年クラブホルスタイン改良組合所有のホルスタイン種経産牛1頭 (平成9年生まれ, 1産) で、産後6回の多排卵処理や3回の人工授精, あるいは放牧地での

交配などの成績が不良で淘汰予定であった。本牛を平成15年7月に岩手大学農学部附属御明神牧場に移動して約5ヶ月間飼養しOPUを実施した。OPUは、超音波診断装置 (アロカ, SSD-900) に7.5MHzの探触子を装着し、吸引針に17GのCOVA Needle (ミサワ医科工業) を、吸引ポンプにModel FV4 (富士平工業) を用い、吸引圧70~80mmHgの条件下で実施した。回収液にはエンブリオテック (日本全薬工業) にノボヘパリン (10単位/ml、アベンティス ファーマ) と抗生物質 (ストレプトマイシン硫酸塩 100 μ g/ml、ペニシリンGカリウム 100単位/ml、ナカライ) を加えて用いた。メッシュ付きシャーレ (ニプロ医工、セルコレクト) を用いて回収した未成熟卵子は、形態によってAからDランクに区分けし、機能性ペプチド研究所の方法 [4] に準拠して体外成熟, 受精, 発生を行なった。すなわち、培養シャーレ (リプロC-1) のウエルに200 μ lの成熟培地 (IVMD

1) 岩手支会 岩手大学農学部附属寒冷フィールドサイエンス教育研究センター

2) 岩手県大野村農村青年クラブ 3) いわてくじ農協 4) 久慈農業改良普及センター

表1 経膈生体内卵子吸引一体外受精・培養（OPU-IVF・IVP）法の特徴

長 所	短 所
<ul style="list-style-type: none"> ・ 特定血統牛胚の大量生産（週2回の連続適用可能） （3ヶ月で多排卵処理の3～13倍の胚生産が可能） ・ 性周期に関係なく適用可能 （スケジュールの柔軟さ） ・ ホルモン剤を使わなくとも良いのでドナーに負担が少ない ・ 適用対象牛の広範さ 妊娠牛，若齢・高齢牛でも適用可 繁殖障害牛でも適用可能 （多排卵処理のホルモン剤に反応しない，子宮・卵管系に障害がある場合も胚生産できる場合がある） 肥育雌牛にも利用可能 （枝肉成績が判明した後に成績優秀な牛の胚を移植して後継牛を得られる） ・ 育種に応用可能（種雄牛候補の作成） ・ 稀少精液の有効活用 ・ 血統登録可能 	<p>（体外受精・培養法の一般的な課題と一部重複する）</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 設備，備品，技術者に対する投資，必要経費が大きい ・ 複合した熟練技術力・労力が必要である ・ 培養設備などの面からステーション方式にならざるを得ない ・ 種雄牛，卵子ドナー牛によって発育率に差がある ・ 産子生産率が低い 凍結・融解後の生存率がやや低い 受胎率がやや低い 流産率がやや高い ・ 奇形・過大子・難産の割合がやや高い ・ 分娩徴候不良，妊娠期間の延長 ・ 虚弱子 ・ ドナー牛に繁殖障害の可能性

表2 OPU-IVF・IVP成績

回収日	回収卵子数	ランク別回収卵子数				種雄牛	移植可能胚数	
		A	B	C	D			
03/07/04	6	0	0	3	3	種雄牛2	0	
03/07/18	8	1	2	2	3	種雄牛3	0	
03/08/11	6	0	0	5	1	黒毛和種*1	3	
03/08/29	2	0	11	7	4	種雄牛1	6	
03/09/22	8	1	1	1	5	種雄牛1	3	
03/10/06	1	6	0	3	9	3(透明帯1)	種雄牛1	3
03/10/20	1	0	2	3	3	2	種雄牛1	3
03/10/28	7	2	5	0	0	0	種雄牛4	0
03/11/13	1	3	3	4	3	3	種雄牛5*2	0
03/11/28	4	0	1	1	2	2	種雄牛5*2	0
03/12/09	7	1	1	1	4	4	種雄牛4*2	1
03/12/18	9	0	0	4	3	3(透明帯2)	種雄牛4*2	1
合計13回	1	1	6	A-Cランク	合計80	合計	20	

* 1：供試牛卵子の発育能を確認するため，体外受精成績が明らかな黒毛和種精液で体外受精した。

* 2：凍結精液洗浄条件を改変。

101) を入れ，100 μ lのミネラルオイルを重層し，38.5 $^{\circ}$ C，5% CO₂，95% 空気で約20時間成熟培養した。凍結精液は媒精液（IVF100）で2回の遠心分離（3000rpm，5min）により，あるいは後に改良を加え，同じ遠心分離条件で1回目をリン酸緩衝液（PBS）で，2回目を媒精液で洗浄後，100 μ lドロップ中で最終濃度1,000万sperm/mlの精子により約6時間媒精した。ホルスタイン種凍結精液は国内生産のものを1種，輸入精液を4種用いた。供試牛卵子の

発育能を検証するため，一部黒毛和種精液も利用した。媒精終了後は，200 μ lの発生培地（機能性ペプチド研，IVD101）にて，38.5 $^{\circ}$ C，5% O₂，5% CO₂，90% 空気です約1週間培養を継続した。発生した移植可能胚はクライオトップ法〔2〕でガラス化凍結した。一部の胚はLAMP法〔1〕で性判別を行った。凍結胚は雫石町の当牧場で融解し，35 $^{\circ}$ Cの温湯中で約3時間運搬し，性周期同期化処置により準備した大野村の受胎牛に移植した。

成 績

合計13回のOPUで116個の卵子を回収し、このうち形態的に体外培養できるAからCランクのものは80個（69.0%）であった。ペプチド研法において、国産凍結精液（種雄牛1）を用いたときの体外胚発生率は、15/41（A-C）（36.6%）で良好だったが、輸入精液（種雄牛2, 3, 4）では発生しなかった（0/15）。そこで、凍結精液の洗浄方法を、媒精液による2回洗浄からPBSと媒精液による洗浄に改良したところ、輸入精液（種雄牛4）でも移植可能胚が得られた（2/7, 28.6%）。移植可能胚数は合計20個生産でき、A-Cランク培養適卵子の25.0%であった（表2）。黒毛和種精液で体外受精して生産した3個を除く17個の移植可能胚のうち、8個を性判別したところ5個が雌胚であった。ガラス化凍結・融解後12個の胚（内5個は雌胚）を11頭の受胎牛に移植したところ、3頭（27.3%）では移植後の初回発情が遅延したものの受胎に至らなかった。

考 察

いわゆる繁殖障害牛でも卵巣に正常な卵胞が発育するものも多く、OPU-IVF・IVP法を用いることにより産子を得られることが示された。採取したA-Cランク未成熟卵子に対して、得られた移植可能胚の割合は25.0%（F1胚を含む）でやや低かった。これは体外受精に用いた種雄牛によって、胚発生率に大きな相違があったことの影響が大きかったと考えられた。また、各研究機関等で実施されているIVF・IVP方法がそのまま適用できず、条件を検討しなければならない場合があることが示された。本試験では移植後の初回発情が遅延した例もあったが受胎に至らなかった。本試験では凍結・融解後の胚生存性を優先して、ガラス化凍結法を採用した結果、融解後の凍結保護剤除去操作が必要なことから、雫石町の御明神牧場で融解し、移植用ストローに充填して、約35℃の温湯中で約3

時間運搬し、大野村で発情同期化した受胎牛に移植した。この胚輸送中の振動等が悪影響を及ぼしたことも考えられる。特に、性判別のために胚の一部を採材し、回復が不十分なまま新鮮胚運搬した可能性があり、悪影響が大きくて受胎に至らなかったと思われた。振動に対する対応策等によっては産子を得る可能性が考えられる。一方で、生産された牛胚に外見上異常は見あらず、胚の発育能そのものに障害が存在したか否かは定かでなかった。繁殖障害牛由来体外受精・生産胚の正常性についてはさらに詳細な検討が必要であると思われた。

総じて、地域の基幹牛として期待されながら、多排卵処理や人工授精成績が優れず惜しまれながら廃用となる例も散見されるので、有用な雌牛ではOPU-IVF・IVP法を適用する価値があると考えられた。

（本報告は、2004年産業動物獣医学会（東北）で発表した内容に一部加筆したものである。）

引用文献

- [1] 陰山聡一, 平山博樹: 日本胚移植学雑誌 25, 136-140 (2003)
- [2] Kuwayama M., Kato O.: J Assist Reprod Genet 17, 477 (2000)
- [3] van Wagtenonk-de Leeuw A. M., Aerts B. J. G., den Daas J. H. G.: Theriogenology 49, 883-894 (1998)
- [4] Yamashita S., Satoh T., Hoshil H.: Theriogenology, 45, 197 (1996)