

牛の体外受精技術

— 種雄牛による受精率および発生率の違い —

岡田 綾子・森本一隆・栗原 昭宏

要 約

体外受精技術における培養系の確立のための基礎的データの収集を目的として、鳥取県所有黒毛和種種雄牛9頭の凍結精液を用いて体外受精を行い、種雄牛による受精率および移植可能胚発生率の違いを調査した。

- 1 種雄牛により、受精率および発生率に差が認められた。
- 2 受精卵が移植可能胚まで発育する割合にも、種雄牛により大きく変動が見られた。

緒 言

体外受精技術は、家畜の生体または屠体の卵巣から未成熟卵子を採取し、人工的に成熟、受精させ、移植可能なステージまで発育させる技術である。

牛の体外受精技術は、核移植など、胚の発生工学研究のための基礎的技術として非常に重要である。また、廃用雌牛の卵巣を有効利用することで、肥育素牛の増産を図ることができる。さらに、経膈採卵法¹⁾を用いれば、生体から性周期に関係なく採卵を行うことができ、妊娠牛からの胚生産も可能となり、優良雌牛の胚を効率的に得られるため、雌側からの遺伝的改良速度の大幅な上昇が期待できる。

このような背景もあって体外受精に関する試験は各地で行われている。そこで今回当場においても、屠体卵巣由来の未成熟卵子を用いた体外受精技術の培養系確立のため、媒精条件などに関する基礎的なデータを集めることを目的として、供試する凍結精液の、種雄牛による受精率及び発生率の違いを比較したので報告する。

材料および方法

1 供試材料

精液：鳥取県所有検定済み黒毛和種種雄牛9頭の凍結精液

糸北鶴、糸北土井、糸新鶴、第7茂鶴

— 糸桜系

豊松、豊富、第2東天、第7東天、高森

— 気高系

卵子：鳥取県食肉センターで屠殺された黒毛和種、ホルスタイン種、交雑種などの卵巣由来未成熟卵子

2 方 法

1) 未成熟卵子の体外成熟

卵巣をペニシリン10万単位・ストレプトマイシン100mg加滅菌生理食塩水(室温)に入れて屠場より持ち帰り、余分な卵管、脂肪などを取り除いて滅菌生理食塩水中にプールし、恒温槽で37度に保った。19G針を取り付けた注射器に、あらかじめ3%新生子牛血清(GIBCO社製)加ダルベッコの修正リン酸緩衝塩類溶液(日水製薬)を1ml程度吸っておき、これを用いて、卵巣表面の直径8mm以下の小卵胞より、卵胞液を卵子と共に吸引した〔吸引法〕(写真1)。

採取した未成熟卵子のうち、卵丘細胞が透明帯のまわりに緊密に付着しており、卵子の細胞質に変性の認められないもの(写真2)を実体顕微鏡下で選別して試験に供した。完全な裸化卵子、卵丘細胞が膨化した卵子(蜘蛛の巣状卵子)、細胞質の異常なものは除いた。

35mmシャーレ(FALCON)に5%ドナー牛血清(DS; 当試験場の供卵牛で、採卵成績が極めて良好であった個体の採卵当日の血清)加25mM HEPES緩衝TCM199(199培地; GIBCO)で100μlまたは600μlのドロップを作り、ミネラルオイルで被覆した。これに未成熟卵子を約20個または80個/ドロップ入れ、5%CO₂、38.5℃の条件下で20時間成熟培養した。

2) 精子処理および媒精

凍結精液は37℃の温湯で融解し、10mMカフェイン・4IUヘパリン加Brackett and Oliphant液²⁾(BO液; 精子洗浄液)を約6ml加えて遠心分離(1800rpm、5分間)する操作を2回行い、精子を洗浄した。次に精子浮遊液1ml中の精子数を血球計算盤で計数し、精子洗浄液および20mg/ml牛血清アルブミン(BSA; SIGMA)加BO液を加え最終的な精子濃度を6×10⁶個/mlに調整した。

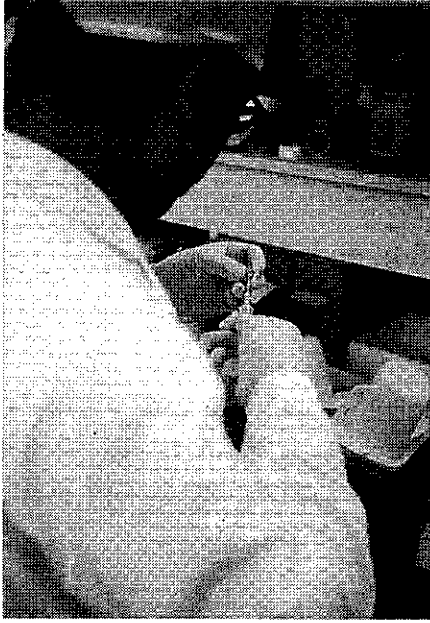


写真1 吸引風景

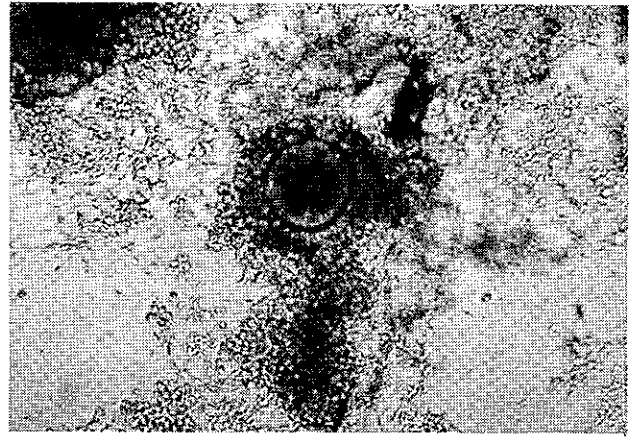


写真3 媒精

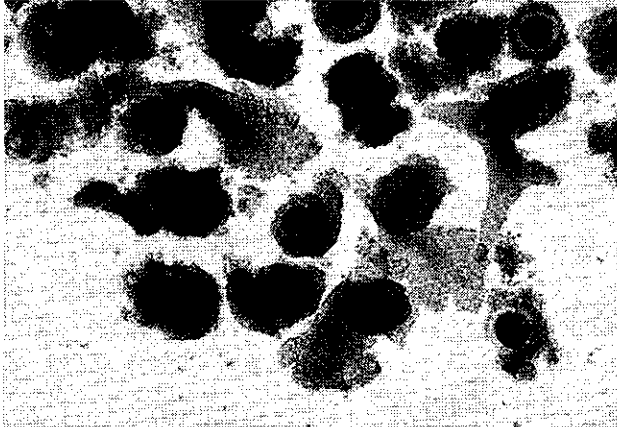


写真2 未成熟卵子

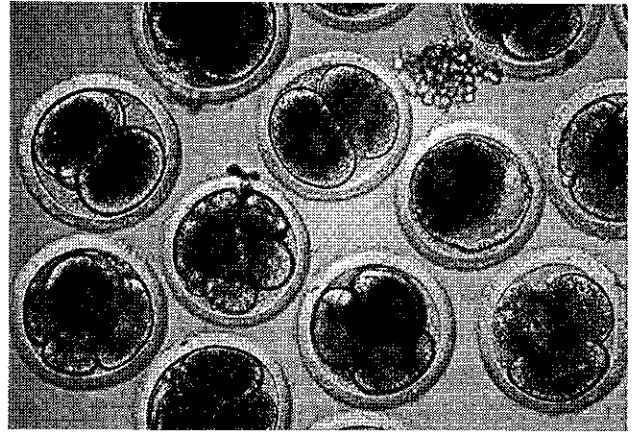


写真4 2～8細胞期胚

この精子浮遊液で35mmシャーレに100 μ lの媒精用ドロップを作り、5%CO₂、38.5℃で約15分間前培養した。

このドロップに、成熟培養後の卵丘細胞が膨潤化した卵子を10mg/mlBSA加BO液で洗浄し、20個/ドロップの割合で移し入れ、5%CO₂、38.5℃で5時間媒精（体外受精）を行った（写真3）。

3) 発生培養および初期発生検査

媒精終了後、卵子を5%DS加199培地に移して付着した精子をピPETTINGで洗い落とした。新しい5%DS加199培地で100 μ lのドロップを作り、5%CO₂、38.5℃の条件下で発生培養を行った。卵子に付着した卵丘細胞は完全に落とさず、共培養とした。

媒精48時間後に、シートした卵丘細胞に取り囲まれた胚を卵丘細胞から剥離すると共に、胚の発育状況を観察し、2細胞以上に分割している卵子（写真4）の割合（受精率）を求めた。

4) 継続培養および移植可能胚発生率検査

以後48時間ごとに発生状況を観察し、7から8日間培

養した。なお培地は検卵の際に半量ずつ交換した。

媒精後6から8日目に、後期桑実胚以降の移植可能胚まで発生したものの割合を発生率として計算した（写真5、6）。

5) 各種雄牛の比較

種雄牛ごとに受精率、発生率および受精卵が移植可能胚まで発育する割合（発育率）を調べ、比較した。

有意差の検定は χ^2 検定で行った。

結果および考察

結果を表1に示す。アルファベットの違いが有意差を表す。

試験全体で、屠体由来卵巣を198個使用し、994個の卵子を試験に供した（1卵巣当たり平均5.02個）。受精卵351個（平均1.77個）、移植可能胚193個（平均0.97個）を得た。全体の受精率は35.3%、移植可能胚発生率は19.4%であった。

各種雄牛の受精率を図1に、移植可能胚への発生率を図2に、受精卵から移植可能胚への発育率を図3に示す（異符号間に有意差あり）。

このように、成熟培養、媒精、発生培養などの諸条件を一にした場合、種雄牛により受精率および移植可能

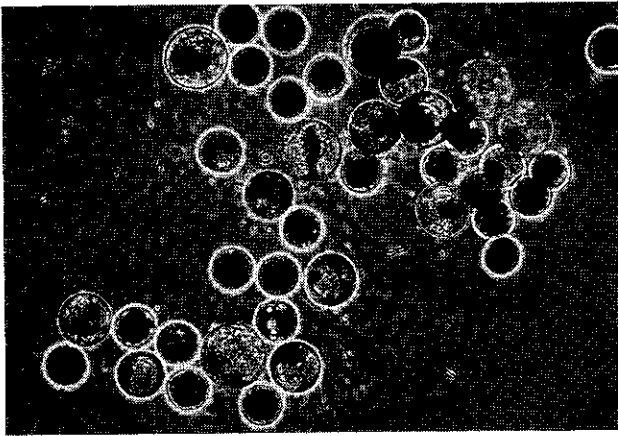


写真5 胚盤胞、拡張期胚盤胞
背景は卵丘細胞がシートしたもの

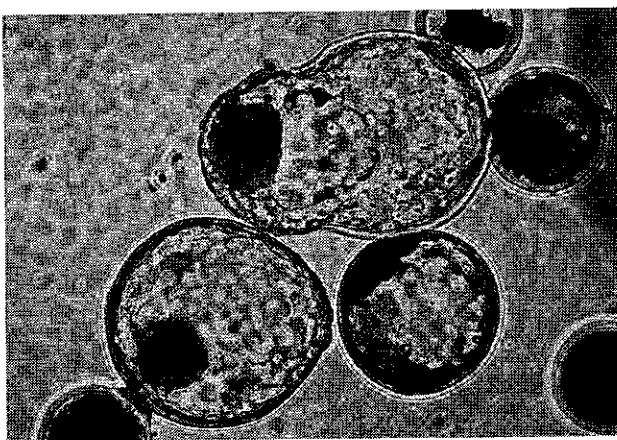


写真6 拡張期胚盤胞と脱出胚盤胞

胚発生率に差が認められた。種雄牛によって精子性状が異なり、体外受精後の受精率に個体差がみられたことはこれまでの報告と一致している³⁾⁴⁾。

生体内では、射出された精子は雌の生殖道内で修正を受け、卵子を受精させる能力を得る〔受精能獲得〕。体外受精ではこの過程も体外で行われるが、牛精子の受精能獲得誘起には、高イオン強度処理、イオノフォア処理、洗浄またはヘパリン処理など様々な方法が採られている。今回は精子活性化物質としてのカフェインとヘパリンを併用して精子洗浄を行ったが、受精率の低かった種雄牛では、今回の試験で用いた精子処理方法が、その精子の受精能獲得に有効でなかったと考えられる。凍結融解後の精子の活性には差を認めていないが、種雄牛によっては前培養後に活性が著しく低下したものもあり、前培養にも種雄牛個体により至適条件が存在すると思われる。また、今回は媒精48時間後に2細胞卵以降まで発生している卵子の割合を受精率として計算しており、実際は精子が卵子内に侵入していても分割しなかったものも存在すると考えられ、初期発生培養方法についても検討する余地があると思われる。

表1に示すように、受精率が低い個体では発生率も低

表1 各種雄牛の体外受精結果

種雄牛	卵子数 (個)	受精卵 数(個)	受精率 (%)	発生卵 数(個)	発生率 (%)	発育率 (%)
糸北鶴	108	56	51.9a	42	38.9a	75.0a
高森	69	35	50.7a	13	18.8bc	37.1c
第2東天	63	29	46.0a	11	17.5bc	37.9bc
豊松	306	127	41.5a	74	24.2b	58.3bc
第7茂鶴	53	19	35.8ab	6	11.3c	31.6c
糸北土井	180	50	27.8b	21	11.7c	42.0bc
第7東天	86	18	20.9bc	12	14.0c	66.7ab
豊富	29	5	17.2bc	3	10.3c	60.0abc
糸新鶴	100	12	12.0c	11	11.0c	91.7a
計	994	351	35.3	193	19.4	55.0

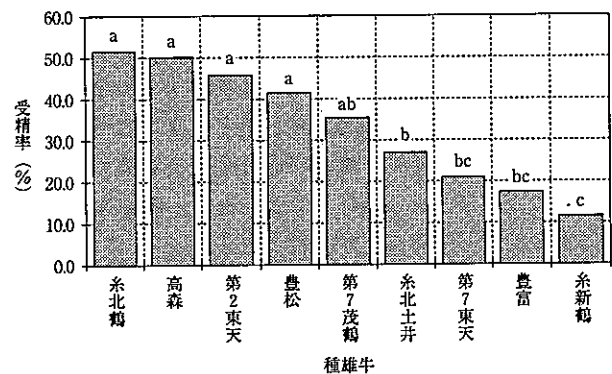


図1 各種雄牛の受精率

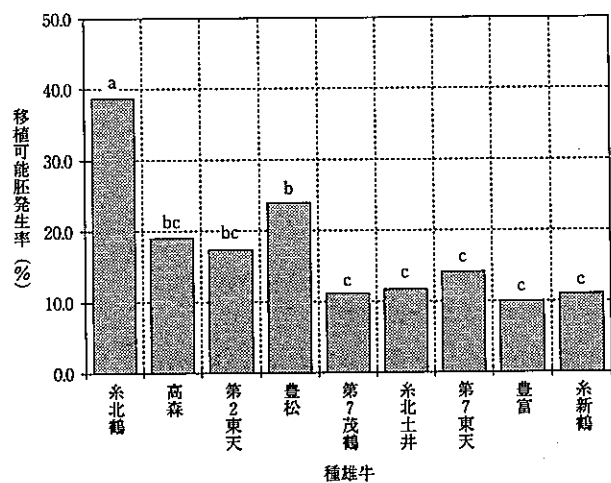


図2 各種雄牛の移植可能胚発生率

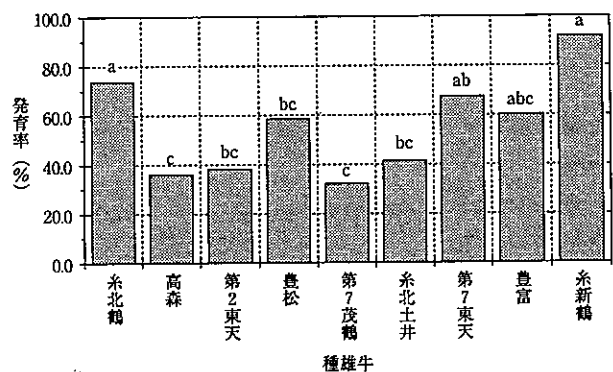


図3 各種雄牛の発育率

くなる傾向はあるものの、受精率と移植可能胚発生率には一定の関係が認められなかった。受精卵の内、移植可能胚まで発生するものの割合（発育率）にも種雄牛によりばらつきがあった（図3）。しかし、福島らは体外受精の受精率には種雄牛による個体差があるが、その受精率は4細胞期以上への発生能とは関連が無く、発生能力は胚の細胞質の能力に支配されるとしており³⁾、今回の結果のように受精率が高くても移植可能なステージまで発生しないものが存在したことは、発生培養法にも問題が残されたことを示している。培地の変更（CR1aa）、牛胎児血清の使用、培養条件（低O₂分圧等）など発生培養法についての検討も必要である。

種雄牛個体による体外受精成績の差を小さくするには、精子の洗浄法、キサンチン誘導体などの精子活性物質、多精子受精の発生を抑える精子処理方法および媒精時間の検討など、個々の種雄牛に適した条件の設定が必要と思われる。今回の試験では全体的に受精率がかなり低かったが（35.3%）、精子処理方法や、媒精条件の改善により、受精率の向上が期待される。

種雄牛個体により、精子性状が異なり、これがフィールドにおける人工授精での受胎率に影響を与えていると思われるが、体外受精においても、胚発生率に精子性状の違いが影響を与えており³⁾、人工授精における受胎率と体外受精での胚の発生率には相関性があるといわれている。しかし、今回の成績は、フィールドでの受胎率とは関連が認められなかった。この結果をみる限り、野外で使用する目的の凍結精液について、体外受精の成績をもってその受胎能の指標とするのは困難であると思われる。今回の結果からは、受精率、発生率ともに糸北鶴が最も良い成績を示し、この条件で体外受精を行う場合、今回供試した精液では糸北鶴のものが最も適しているということがいえるに過ぎない。

今回は媒精の至適条件設定のための基礎的なデータを得た。

謝 辞

最後に、卵巣の採取にご協力いただいた鳥取県食肉衛生検査所職員の皆様に深謝する。

引 用 文 献

- 1) 藤谷泰裕ら：日本畜産学会報、66(2)；1023-1030、1995
- 2) Brackett, B.G. and Oliphant, G. : Biol, Reprod., 12; 260-274, 1975
- 3) 福島護之ら：兵庫県立中央農業技術センター研究報告〔畜産編〕24号；21-24、1988
- 4) 立川進ら：徳島県肉畜試験場研究報告、第17号；1-9、1990

- 5) 高橋典子ら：広島県立畜産試験場研究報告、第10号；1-4、1994