

ウシ体外受精胚の胚盤胞発生率に及ぼす卵巣の保存温度の影響

米村 功・大下雄三

要 約

ウシ体外受精に用いる卵巣はBSE検査のため、一時保存が必要となっており、卵巣の24時間保存を可能とするために、10、15、20及び25の4区分の保存温度を検討した。その結果、卵巣保存温度が15及び20の場合に10及び25の場合より有意に高い胚の発生率を示した。卵巣保存温度は15及び20が適当と考えた。

緒 言

ウシ体外受精技術は、と畜場由来の卵巣から良質な体外受精胚を作出を可能とし、最近では製品化されマニュアルの確立した体外受精胚の生産系も構築され、凍結保存での利用も可能となり、農家での肥育素牛生産手法として、また生物工学実験材料として活用されている。一方、食肉処理場でのBSE検査開始に伴って、検査結果が陰性と判明するまで採取した卵巣を持ち出せなくなった。当県の食肉処理場での牛のと畜は主に午後実施されるため、卵巣を持ち出せる時刻は夜間となり、その後の体外受精の作業が連日にわたって深夜作業となってしまっていた。そこで、体外受精卵を昼間の作業で作出可能とするために、既往の研究¹⁾²⁾³⁾を参考として、卵巣をと畜時刻から翌日の朝までの約21時間から24時間保存するための卵巣保存温度を検討した。

材 料 及 び 方 法

1) 卵巣の採取

試験に供した卵巣は鳥取県食肉センターでと畜された黒毛和種雌牛、交雑種雌牛及びホルスタイン種雌牛から採取した。

2) 卵巣の保存

採取卵巣の保存温度は10、15、20及び25の4区分で保存した。卵巣は生理食塩水で1回洗浄した後、抗生物質(生食500ml当たり硫酸カナマイシン100mg力価)を含む生理食塩水中で翌日AM9:00までの21時間から24時間保存した。保存はレジャー用の保温保冷器具にサーモスタットを組み合わせた簡易な恒温器を試作し、温度制御能力を確認し試験に利用した。

3) 体外受精方法

機能性ペプチド研究所製の「エンブリオパック」非共培養完全セットを用いて、「裸化受精卵無血清培養法(低酸素培養)Ver.1.2⁴⁾」により実施した。

4) 体外受精用精液

体外受精用精液は、試験用には胚盤胞発生率が安定している⁵⁾豊松号の凍結精液を基本に用い、一部移植に用いる場合には糸北鶴号の凍結精液も用いた。

5) 調査項目

体外受精後7日目及び8日目に胚盤胞期に達した胚の数量及び胚盤胞の発生率を調査した。

結 果 及 び 考 察

卵巣の保存温度別の胚盤胞発生率を表1に示した。保存温度別の胚盤胞の発生率においては15℃及び20℃で保存した場合が23.2%及び21.7%と、10℃及び25℃で保存した場合の2.6%及び2.7%よりも有意 ($P<0.01$)に胚盤胞発生率が上まわっていた。

これらのことより、卵巣の保存温度の選択は、明らかに15℃及び20℃で保存した場合が、10℃及び25℃で保存した場合よりも有効と考えた。

表1 卵巣の保存温度別の胚盤胞発生率

卵巣 保存温度	供試 卵子数	胚盤胞数	胚盤胞 発生率	統計*
10	195	5	2.6%	B
15	410	95	23.2%	A
20	286	62	21.7%	A
25	220	6	2.7%	B

*：異種文字間に統計的有意差 ($P<0.01$)

卵巣の保存温度における既往の報告や私信では、本研究より高温な約35℃の場合保存後の卵巣から採取した卵胞卵の半分以上が死滅しており卵巣からも強い腐敗臭があったとされている。このことから高温側にさらに至適な温度域が有る可能性は低いと考える。

一方、10℃及び15℃で保存した卵巣から採取した卵子の分割率と8細胞期胚率は、保存しない卵巣からの採取卵子と差がなく、摂氏5度及び摂氏20度で保存した場合に比べて高い傾向にある、との情報もある。これらは、10℃の温度での保存成績のにおいて本研究の結果と異なっている。いずれにしても15℃での保存を否定する情報が少ないことから、卵巣保存の至適な温度域は

15℃から20℃の範囲にある可能性が高いと考えた。

謝 辞

本研究の実施に当たり、株式会社鳥取県食肉センターには卵巣の提供を得た。また鳥取県食肉衛生検査所の方々には卵巣の採取、卵巣の一時処理及び保存等において多大な協力を戴いた、ここに深く感謝する。

参 考 文 献

- 1)安部茂樹ら、牛体外受精の発生に及ぼす牛卵巣の生理的食塩水中での20～24時間保存の影響、日本胚移植学雑誌、18,2,106-112(1996)
- 2)根本聡実ら、食肉処理場で低温保存したウシ卵巣卵子による体外受精胚の作出、東日本受精卵移植技術研究会報 18.24-25(2003)
- 3)成田真知ら、と場法改正によるウシ卵巣保存処理の変更と体外受精成績、東日本受精卵移植技術研究会報 19.24-25(2004)
- 4)(株)機能性ペプチド研究所製「エンブリオパック」裸化受精卵無血清培養法(低酸素培養)Ver.1.2(1997)
- 5)岡田ら、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 鳥取畜試研報 27,1-4(1998)