

超音波誘導経膈採卵由来体外受精胚を用いたウシ性判別産子の作出

横田昌己・宮地利江・近藤守人

Production of Calves with Predicted sex using In-vitro Matured/Fertilized Bovine Embryos from Ultrasound-Guided Transvaginal Ovum Pick Up (OPU)

Masami YOKOTA, Rie MIYACHI and Morito KONDOU

要 約

ホルスタイン種乳用牛において超音波誘導経膈採卵 (Ovum Pick Up:以下 OPU) 技術を利用した体外受精 (In Vitro Fertilization: 以下 IVF) によりウシ胚を生産し、胚の性判別技術との組み合わせによる効率的な子牛生産を目的として、OPU-IVF の胚生産性、性判別率、性判別胚の受胎性について検討した。

1 回の OPU 操作で回収できる卵子数は、平均 8.4 個であり、胚盤胞発生率は 26.7 % であった。月に 2 回 OPU を行うと年間で約 201.6 個回収でき、約 53 個の胚盤胞を確保できるものと考えられる。當場での過剰排卵処理 (Superovulatory treatment: 以下 SOv) による正常胚回収数は年間平均 20 個/頭であることから、OPU は SOv に匹敵する胚確保の方法であり、さらに SOv 等のホルモン処理に反応が鈍く、後継牛あるいは胚の確保が困難な雌牛に対して有効な胚生産方法であると考えられた。

性判別判定率は 76.0 % で當場の SOv 胚の判定率 88.7 % と比較して低かった。

7 個の雌胚を受胎牛に新鮮 1 胚を移植したところ 4 頭が受胎し、分娩した。子牛の性別は 3 頭が雌で胚の性判別結果と一致したが、1 頭で性別の不一致が認められた。

緒 言

近年、胚移植技術が進歩するに従い、IVF 技術による子牛生産が盛んに行われるようになった。しかしながら従来の食肉処理場で採取された卵巣から回収した卵子を用いた IVF では、母牛の特定が困難であり、そのため生産子牛の子牛登記が非常に難しい。また、個体別に処理をしても、屠体卵巣を用いるため 1 頭の牛から得られる卵子数に制限があり、効率的な胚生産が困難な状況にあった。1988 年に Pieterse らが報告⁸⁾して以来、OPU は生体から繰り返し卵子を採取できる技術として設定条件や採卵間隔等について様々な研究機関で研究されてきた^{1)~3),5)}。これを利用することにより、容易に個体別の IVF が可能となり、さらに 1 頭の牛から回収できる卵子数も多くなる。當場でも既報⁷⁾の通り、若

狭牛 (黒毛和種) についてこの技術に取り組み、複数頭の産仔を誕生させることに成功し、IVF 産仔でも子牛登記が可能になった。

酪農経営においては、高能力 (高泌乳) 牛の血統を受け継ぐ後継雌牛を確保することが経営上、非常に重要である。しかし、現在のところ十分に確保されていない。高泌乳牛は多量の泌乳という代謝上の負荷をになっており、繁殖障害の発生率が高い。そのため通常の人工授精での後継牛の確保が困難な場合が多い。また、ホルモン製剤を用いる SOv は反応が低く、体内受精胚の確保が困難な場合もある。それらの牛について OPU の技術を利用することにより、高泌乳牛由来胚の生産、さらには後継牛の確保につながるものと考えられる。

一方、胚の性判別技術は近年多くの研究機関で実施されており、當場においても既報⁶⁾の通

り複数頭の性別産子を生産している。この技術により、肉用牛では産肉効率の良い雄牛の生産、乳用牛では高泌乳牛からの優良後継牛の確保、牛群の改良促進等が可能となる。

これらの技術を組み合わせて利用することにより、経営にあった牛群管理と経営の効率化が図られる。

そこで今回はホルスタイン種乳用牛を供卵牛に用いて、OPU-IVF 成績、OPU-IVF 胚の性別成績、雌胚の新鮮胚移植成績について検討した。

試験方法

1 OPU 法

供卵牛は当該繋養のホルスタイン種乳用牛 5 頭を用いた。ホルモン製剤処理等は行わず、1 週間あるいは 2 週間間隔で OPU を実施した。卵子吸引には回収効率の高いダブルルーメン needles⁹⁾を用いた。超音波診断装置 (アロカ SSD-1200) に吸引針ガイドを装着した同機専用の経膈プローブ (7.5MHz) を接続したものおよび吸引針 (COOK-IVF (オーストラリア) 製ダブルルーメン needles) に吸引ポンプ (富士平工業) を接続したものを用いた。吸引圧は 90 ~ 95mmHg に設定した。灌流液は最終濃度 10IU/ml のノボヘパリンを添加した 1 % 非動化牛胎仔血清 (FCS:三晃純薬) 加修正ダルベッコ PBS (D-PBS) を使用した。回収チューブ内での血液の凝固を防止するために約 3 分間ごとに灌流液で吸引針およびチューブ内の洗浄を行いながら、画像上に確認できるすべての卵胞を吸引するように努めた。

OPU 操作終了後に卵胞吸引液を Emcon フィルターに通し、血液等を洗い流した後、格子状に線の入った 90mm シャーレに卵胞吸引液を移し、実体顕微鏡下で卵子を検索した。回収された卵子について、細胞質の色調、顆粒膜細胞の付着密度等によって A ~ E の 5 段階 (表 1) に品質を評価し、分類した。

2 体外受精法

OPU により回収した全ての卵子は 5 % FCS 加 TCM199 (GIBCO) 培地にて、38.5 °C、5 % CO₂、95 % 空気の気相条件下で 20 時間成熟培養した。媒精は融解した凍結精液をカフェイン (最終濃度 5mM) とノボヘパリン (最終濃度 4IU/ml) を添

表 1 OPU 回収卵子の形態による 5 段階評価

- a : 卵母細胞の細胞質の形態、色調ともに良好で顆粒膜細胞の付着が密 (ほぼ全体を覆っている)
- b : 卵母細胞の細胞質の形態、色調ともに良好で顆粒膜細胞の付着がやや粗 (周囲 1/3 以上を覆っている)
- c : 卵母細胞の細胞質の形態、色調ともに良好で顆粒膜細胞の付着が粗 (周囲 1/3 以下) および裸化卵子
- d : 顆粒膜細胞が膨潤化 (クモの巣状)
- e : 卵母細胞の細胞質の形態、色調が異常

加した Gamete Preparation Medium (GPM:セローノ社) あるいは IVF100 (機能性ペプチド研) で 2 回洗浄後、精子の濃度を 600 万/ml に調整して精子懸濁液とし、GPM の場合 5 時間、IVF100 では、6 時間それぞれ 38.5 °C、5 % CO₂、95 % 空気の気相条件下で媒精を行った。発生培養は、5 % FCS 加 CR1aa 培地にて 38.5 °C、5 % CO₂、5 % O₂、90 % N₂ の気相条件下で 7 ~ 8 日間培養した。成熟培養液および発生培養液の量は松井の報告⁷⁾に準じて 1 卵子あたり 5 μl とした。発生培養後 48 時間目に卵割検査を行い、7 日目から胚盤胞の発生を観察した。

これらの方法で発生した胚盤胞について以下の試験を行った。

(1) 試験 1

40 回の OPU 操作全てについて回収卵子数、卵割率、発生率を調べた。

(2) 試験 2

胚盤胞期へ発生した一部の胚について Polymerase Chain Reaction (PCR) による性別判定を行い、判定率 (雄または雌と判定できた率)、雌雄の比率を調べた。また、雌と判定された一部の胚について当該繋養のホルスタイン種受胎牛に 1 胚移植を行った。

3 PCR 法を用いた性別判定方法

7 日目および 8 日目に発生した胚盤胞を ITAGAKI らの方法⁴⁾に準じて、微分干渉顕微鏡付属のマイクロマニピレーターにセットした金属製の刃 (BIO-CUT BLADES:FEATHER 社) により内細胞塊を避け、栄養膜の一部の細胞 (10 ~ 20 個) を切断採取し、性別判定用のサンプルと

した。性判別には市販キットである XY セレクター（伊藤ハム）を用い、添付マニュアルの通りにプライマーおよび酵素を操作し、Thermal Cycler（PERKIN ELMER 社 Gene Amp PCR system 2400）にセットし、95℃・1分（1回）、97℃・5秒→50℃・5秒→72℃・5秒（44回繰り返し）のプログラムにて PCR を行い、DNA の増幅を行った。その後、30%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を 25 分間行い、エチジウムブロマイド（ナカライ）で 15 分間染色した後、紫外線照射下で雄特異または雌雄共通バンドにより性判別を行った。一方の内細胞塊を含むものは切断後直ちに 0.1mM βメルカプトエタノール（β-ME:Sigma）と 0.4mg/ml リノール酸アルブミン（LAA:Sigma）を加えた 20% FCS 加 TCM199 の修復培養液にて 20～24 時間培養し、胞胚腔を再形成したものを移植サンプルとした。

結果および考察

(1) 試験 1

全 40 回 OPU を行い、総回収卵子数は 337 個で 1 回あたりの平均回収卵子数は 8.4 個であった。そのうち A,B ランクのもの 205 個で総回収数の約 60.8% であった。卵割率は、49.0%（165/337）で、胚盤胞発生率は 26.7%（90/337）であった（表 2）。卵子の段階でランクによる選別を行う通常の IVF と比較して、卵割率、発生率ともに低かった。そこで選別を行った場合と同様に A,B ランクのみに置き換えると、卵割率は 80.5%（165/205）で発生率は 44.0%（90/205）であり、通常の IVF とほぼ同様な結果になった。

表 2 OPU 成績

回収 卵子数	A,B ランク 回収数 (%)	卵割数 (%)	発生数 (%)
337 (Ave 8.4/回)	205 (60.8)	165 (49.0)	90 (26.7)

1 回の OPU 操作で回収できる卵子数は、平均 8.4 個であり、月に 2 回 OPU を行うとして 1 年間で $8.4 \times 24 = 201.6$ 個回収でき、胚盤胞発生率 26.7% で考えると 53.8 個の胚盤胞を確保できるものと考えられる。当场でこれまでに行ったホルスタイン種乳用牛の SOv による正常卵回収

数は平均 5.0 個であり、年間 4 回行うと 20 個の胚盤胞を確保できることになる。このことから、OPU は SOv に匹敵または上回る胚確保の方法であるため、SOv 等のホルモン処理に反応が鈍く、後継牛あるいは胚の確保が困難な繁殖牛に対しても有効な胚生産方法であることが示された。

(2) 試験 2

①性判別成績

発生した胚盤胞のうち 50 個について性判別を行った。雌雄の比率は雄が 50.0%（25/50）で雌が 26.0%（13/50）、判定不能だったものが 24.0%（12/50）であった（表 3）。性判別判定率は 76.0% で当场の SOv 胚の判定率 88.7% と比較して低かった。既報の通り⁽¹⁰⁾IVF 胚と SOv 胚の細胞数には差がなく発育にも品質にも変わりがないことから、この原因は牛由来物質を多用している体外培養環境が問題である可能性が考えられる。

OPU では年間 53.8 個/頭の胚盤胞を確保可能であり、雌の判別率が 26.0% とすると $53.8 \times 0.260 = 14.0$ 個/頭の雌胚が確保可能である。一方 SOv 胚では年間 $20 \times 0.383 = 7.7$ 個/頭の雌胚が確保可能である。これは OPU が 1 頭の牛から繰り返し卵子を採取できる技術であるという利点を十分に活用している結果であると考えられる。しかし、OPU 胚において雌胚の比率が低かった。SOv 胚の雄の比率が 50.4% で OPU 胚での比率と変わらないことから、判定精度を高くすることにより、SOv 胚と同等（SOv 雌胚率 38.3%）になるものと考えられ、年間確保雌胚数は増えると考えられる。

表 3 性判別成績

供試胚数	雄胚数 (%)	雌胚数 (%)	判定不能 (%)
50	25 (50.0)	13 (26.0)	12 (24.0)

(2) 移植成績

雌と判定したうちの 7 個の胚を当场繫養のホルスタイン種受胎牛延べ 7 頭にそれぞれ 1 胚を新鮮胚移植した。30 日目に超音波診断装置を用いて早期妊娠診断を行ったところ 4 頭で受胎を確認した（受胎率 57.1%）（表 4）。

これら 4 頭はすでに分娩し、性別は 3 頭が雌

表 4 移植成績

移植頭数	受胎頭数	受胎率
7	4	57.1

であり、胚の性別結果と一致した。しかし 1 頭で性別の不一致が認められた。

当场で体内受精胚を用いて性別を行ってきたがこのように性別結果と異なる子牛が産まれた事例はない。しかしながら、他県でも少数ながら性別の不一致についての報告がある。これに加え、OPU 胚の性別の成功率も低いことからこの技術を普及するためには、IVF 胚における性別技術の精度を向上させることが重要課題であると考えられる。現在の性別技術は細胞の採取から試薬の調整等に極めて緻密な手技を要するため技術者の熟練が必要である。そのためこれらの技術をより簡便にすることが重要である。具体的には PCR 用細胞の採取時のミスをなくすための採取方法、酵素やプライマーの調整等の DNA 増幅に関わる技術の改善が必要である。また、牛由来成分（血清等）によるコンタミネーションを防ぐために性別に適した体外培養技術を確立することが必要である。

引用文献

- (1) 古舘誠・船内克俊・湊芳明:超音波診断装置を利用した黒毛和種供卵牛からの連続経膈採卵と体外受精について:第 13 回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会講演要旨,14,60-61, 1998.
- (2) Gibbons JR,Beal WE,Krisher RL,Faber EG,Pearson RE and Gwazdauskas FCG.:Effects of once versus twice weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development:Theriogenology.42,405,1994.
- (3) Hashimoto S,Takakura R,Kishi M,Sudo T,Minami N and Yamada M.:Effect of aspiration and needle diameter on the recovery rate of bovine cumulus-oocyte complexes by transvaginal aspiration ,Theriogenology.49,40,1998.
- (4) Itagaki Y,Sato S,Shitanaka Y,Kudo T,Yamaguchi Y,Sutou S.:Sexing of bovine embryos with malespecific repetitive DNA by polymerase chain reaction:Sexing of bovine embryos and production of calves with predicted sex:Journal of Reproduction and Development.39,65-72,1993
- (5) 木伏雅彦・福島護之・野田昌伸:経膈 採卵法における連結チューブの長さ、吸引圧およびフラッシング量がウシ卵胞卵子の採取効率に及ぼす影響:兵庫県農業技術センター研究報告〔畜産編〕.35,5-8,1999.
- (6) 近藤守人・横田昌己・宮地利江・松井司 :PCR 法を利用したウシ胚の性別と分娩成績 ,日本畜産学会北陸支部会報.79,31-33
- (7) 松井司(1999):牛胚移植関連技術の実用化に向けて、超音波診断装置を用いたウシ生体からの卵胞卵子の採取と体外受精:日本畜産学会北陸支部会報.79,1-5,1999.
- (8) Pieterse MC,Kappen KA,Kruijff Th AM and Tavene MAM.:Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries:Theriogenology.30,751-762,1988.
- (9) 山本広憲:経膈採卵の実用化に向けて:第 13 回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会講演要旨.14,11-14,1998.
- (10) 横田昌己・宮地利江・近藤守人:超音波誘導経膈採卵由来体外受精胚を用いた雌雄別産子の作出:福井県畜産試験場研究報告.15,27-31 ,2001.

Production of Calves with Predicted sex using In-vitro Matured/Fertilized Bovine Embryos from Ultrasound-Guided Transvaginal Ovum Pick Up (OPU)

Masami YOKOTA,Rie MIYACHI,Morito KONDOU

In holstein dairy cows, we studied productivity of in-vitro Matured/fertilized bovine embryos (IVF) using ultrasound-guided transvaginal ovum pick up (OPU), rates of sexing and pregnancy rates of sexing embryos for the purpose of efficient production of calves by combination of OPU-IVF and sexing of embryos.

The mean number of recovered bovine oocytes by once OPU were 8.4 and percentage of embryos developed to the stage of blastocyst were 26.7%. Twice monthly OPU, the number of recovered oocytes were about 201.6 in a year. Therefore we think that we can secure about 53 blastocysts. The mean number of recovered normal embryos on superovulatory treatment (SOv) in our station were about 20 per a cow in a year. These results indicate that OPU was equal to SOv. Therefore we have thought that OPU is effective technique for production embryos of cows which get poor response to SOv and it is difficult to secure calves and embryos from which.

Rates of sexing of OPU-IVF embryos (76.0%) were lower than SOv embryos in our station (88.7%).

seven embryos of predicted female were transferred recipient cows, and these four were pregnant. One of them had been parturition. Sex of three calves corresponded with sexing result of embryos. But one calf was not correspond with sexing result.