

< 学術報告 > 日本胚移植研究会報 (2003)

岡山県における経膈採卵の現状と課題

有安則夫・坂部吉彦*・中原 仁**・水木 剛***・小田頼政

Current state and problem of OPU in Okayama Prefecture

Norio ARIYASU, Yoshihiko SAKABE, Hitoshi NAKAHARA, Takeshi MIZUKI and Yorimasa ODA

要 約

平成 5 年度からスーパーカウと呼ばれる高能力乳用牛（ホルスタイン種）をアメリカから導入し、後継牛とともに供胚牛として活用してきたが、高齢化に伴う優良胚の採胚数の低下や通常の過剰排卵処理に反応しない牛もあり、対応が求められていた。

そこで、当センターでは、平成 11 年度から経膈採卵技術により、採胚不良牛からの優良胚の安定供給を図っており¹⁾、採取される正常卵子数も年々向上している。

1 回収卵子数の向上

吸引システムの改良により、平成 11 年度には平均 3.54 個であった回収卵子数が、平成 14 年度には 16.03 個へ増加し、吸引システムの変更が回収卵子数の増加に結びついていると考えられた。しかし、採率率は改善が認められなかった。

2 体外受精成績の推移

1 回当たりの体外受精成績は年々向上しており、それにともない胚盤胞発生数の大幅な増加が認められた。同様に、分割率及び胚盤胞発生率についても、平成 13 年度にはそれぞれ 80 % 及び、56 % にまで向上した。

3 移植成績

体外胚の性判別後の受胎率は平均で 59.5 % であり、受胎性に問題はないと思われた。しかしながら、全体の 20 % で流産、8 % で死産が確認された。発生率等に個体差は見られるものの、経膈採卵は成績不良牛からの優良胚の確保に有用な技術であることが示された。今後は、当センター内にとどまらず、農家の庭先での経膈採卵の実施等、さらなる活用を考えるとともに、山積している課題を解決し、後継牛の作出に活かしていきたいと考える。

キーワード： 牛、体外受精、経膈採卵

緒 言

岡山県は乳用牛 26,000 頭を擁する酪農県であり、早くから胚移植技術による牛群整備に力を注いでいる。岡山県総合畜産センター（以下、当センター）では、平成 5 年度からスーパーカウと呼ばれる高能力乳用牛（ホルスタイン種）をアメリカから導入し、後継牛とともに供胚牛として活用してきた。

現在、年間約 120 個の雌胚を酪農家に譲渡しているが、希望過多に譲渡が追いついていない。あわせて、スーパーカウの高齢化に伴う優良胚の採胚数の低下や通常の過剰排卵処理に反応しない牛もあり、対応が求められていた。

そこで、当センターでは、平成 11 年度から経膈採卵技術により、採胚不良牛からの優良胚の安定供給を図っている¹⁾。採取される正常卵子数も年々向上し、性判別後の受胎率も約 60 % と

安定してきたことから、平成 14 年度からは酪農家への譲渡を開始しており、その成果について概説する。

材料及び方法

1 供試牛

当センター繁殖のスーパーカウのうち、採胚不良牛 8 頭を用いた（試験期間：平成 11 ~ 12 年度）。供試牛の供試前の採胚成績（平成 6 ~ 10 年度）は表 1 のとおりである。

表1 供試前の採胚成績 (平成6~10年度)

供試牛	採胚回数	採胚数	正常胚数
A	9	4.4±1.7	3.0±1.9
B	4	6.0±2.6	0
C	8	7.3±4.0	3.6±3.3
D	10	6.9±9.1	6.1±7.6
E	14	4.6±3.6	1.9±2.7
F	5	2.0±1.4	1.0±1.6
G	2	0.5±0.5	0
H	10	4.5±4.6	1.1±1.5
供試牛計	62	5.0±5.0	2.6±4.1

(参考)
供試牛を除く
センターの
乳用牛全体

200	8.3±7.6	5.1±5.6
-----	---------	---------

*MEAN±SE

2 経膈採卵

超音波診断装置は SSD-1200CV (Aloka)、プローブはコンベックス型 UST-9109-7.5 (Aloka) を用いた。採卵針は 7 cm のシングル短針 (FHK) にポリエチレン製誘導管 (FHK) を連結し、誘導管から回収瓶までは内径 2 mm、全長 150 cm のシリコンチューブにより接続した。血液凝固を防止するため、採卵針から回収瓶までは、乳酸加リンゲル液に 1 % 子牛血清、抗生物質及びノボヘパリンを加えた液でリンスした。そして、吸引圧を 60 mmHg に設定した吸引装置 KMAR-5000 (COOK) により、卵胞液とともに卵子を回収瓶に吸引採取した。なお、卵胞の直径が 3 ~ 5 mm のものを吸引の対象とした。

経膈採卵は 7 日間隔の連続採卵を基本とし、小卵胞数が減少するまで行った。

3 体外受精

回収した未成熟卵子は卵丘細胞の付着量と細胞の質により A (卵丘細胞 1/2 以上付着)、B (卵丘細胞 1/2 以下付着)、C (裸化卵子)、D (細胞質の変性、膨化卵子) の 4 ランクに分類し²⁾、A から C ランクまでを正常卵子とした。これら正常卵子は、38.5 °C、5 % CO₂、95 % 空気、湿度飽和状態の炭酸ガス培養器内で、培地 IVD-101 (機能性ペプチド研) を用い 22 時間の成熟培養を行った。

その後、Kobayashi ら³⁾の方法に準じて次のとおり体外受精を行った。融解した凍結精液を受精培地 IVF-100 (機能性ペプチド研) で 2 回遠心洗浄 (1,200 回転、5 分間) 後、精子濃度 1×10^8 sperm/ml に調整した精子浮遊液 100 µl を受精培地ドロップとし、その中に成熟卵子を 10 個ずつ導入して媒精を行った。媒精 6 時間後に卵子周囲の卵丘細胞及び精子を取り除き、5 % 牛胎児血清を添加した CR1aa 培地で 38.5 °C、5 % CO₂、5 % O₂、90 % 空気、湿度飽和状態で発生培養を行った。発生培養

72 時間後に無血清培地 IVD-101 (機能性ペプチド研) に培地を交換し、胚の発生状態の調査を継続した。

4 移植

媒精 7 日後に胚盤胞あるいは拡張胚盤胞まで発育した胚を PCR 法により性判別し、雌胚を当センター繋養のホルスタイン種に移植した。受胎牛は予め同期化し、黄体側子宮角に頸管経由法で新鮮 1 胚移植を行った。

結果及び考察

供試牛の経膈採卵成績は表 2 のとおり、経膈採卵 1 回あたりの回収卵子数は平均 3.6 個、うち正常卵子数は 3.1 個であった。回収卵子の内訳では C ランク卵が最も多く回収された。通常、吸引圧を上げると回収率が高くなる反面、裸化率も高くなると言われている^{4, 5)}。しかし、本試験では吸引圧を一般的に用いられているより低く設定したにも関わらず裸化卵子の回収数が高かった。これは、誘導管と回収瓶を繋ぐシリコンチューブが 150 cm と長かったために、物理的負荷により裸化率が上昇したのではないかと考える。

表2 平均回収卵子数及び正常卵数

供試牛	採卵回数	採卵数	正常卵数
A	37	1.8±2.2	1.6±2.0
B	6	6.7±3.8	6.0±3.8
C	26	2.3±1.9	2.2±1.8
D	35	3.1±3.0	2.3±2.3
E	36	3.8±3.5	3.3±3.1
F	19	5.5±4.3	5.0±3.9
G	24	6.1±4.7	5.5±4.0
H	32	3.6±3.2	3.2±3.1
計	215	3.6±3.6	3.1±3.2

*MEAN±SE

体外受精成績は表 3 のとおり。分割率は平均 71.0 %、胚盤胞発生率は 45.3 % であった。通常の過剰排卵処理では正常胚が得られなかった B 及び G 号牛も含め全ての供試牛から移植可能な胚が作出され、本法が採胚不良牛からの胚獲得の有効な手段であることが示された。

体外胚の移植及び分娩状況について、表 4 に示した。性判別後の受胎率は平均で 59.5 % であり、受胎性に問題はないと思われた。しかしながら、全体の 20 % にあたる 5 頭で流産、8 % にあたる 2 頭で死産が確認された。

表3 体外発生成績

供試牛	供試卵数	分割数及び分割率(%)	胚盤胞発生数及び発生率(%)
A	64	50(78.1)	38(59.5)
B	32	23(71.9)	9(28.1)
C	57	40(70.2)	29(50.9)
D	82	49(59.8)	25(30.5)
E	112	66(58.9)	39(34.8)
F	98	81(82.7)	49(50.0)
G	131	103(78.6)	79(60.3)
H	99	67(67.7)	38(38.4)
体外受精 1回あたりの平均	3.3	2.4(71.0)	1.5(45.3)

*MEAN±SE

表4 経膈採卵由来胚の受胎・分娩状況

供試牛	移植頭数	受胎頭数及び受胎率(%)	流産頭数	分娩頭数
A	3	2(66.7)	0	2
C	4	4(100.0)	2	2
D	5	3(60.0)	2	1
E	6	3(50.0)	0	3
G	10	4(40.0)	1	3
H	14	9(64.3)	2	7
計	42	25(59.5)	7	18

流産の内訳は、移植後 50 日程度で胎児の娩出が確認されたものが 2 例、移植後 100 日に胎児の娩出が確認されたものが 1 例、移植後 100 日前後に発情の回帰により流産が判明したものが 1 例、移植後 250 日で胎児の娩出が確認されたものが 1 例であった。一般的に言われている流産率と比較して高率であるが、今回の発生状況には傾向が認められず、因果関係については検討の必要がある。

一方、分娩した 18 頭のうち 17 頭は雌胚の移植であり、いずれも正常分娩であった。残り 1 頭は性不明胚の移植を行っており、雄産子が分娩された。産子の平均体重等については表 5 のとおりであり、雌産子で生時体重が平均 46.4 kg と標準発育値 40.0 kg (社団法人 日本ホルスタイン登録協会) と比較して、やや過大であった。また、雄産子については妊娠期間の延長と生時体重の増加がみられた。

表5 産子の妊娠期間及び生時体重

産子性	分娩頭数	妊娠期間(日)	生時体重(kg)
雌	17	281.4±5.1	46.4±5.2
雄	1	295.0	66.0
(参考) 雌	-	-	40.0±5.8

*日本ホルスタイン登録協会 平成7年度

**MEAN±SE

体外胚産子の生時体重の増加については過去に数例報告^{6,10)}されており、体外培養系への血清添加が原因の一つとして考えられているが、原因は究明されていない。過大産子は分娩事故につながりやすいことから、ホルスタイン種由来体外胚の移植は、生時体重が小さな雌胚についてのみ行うことが肝要である。

また、経膈採卵による卵巣や周辺組織への影響については、癒着の発生¹¹⁾や、その後の過剰排卵処理による採胚成績の低下などが報告^{12,14)}されている。そこで、今回試験に用いた 8 頭のうち経膈採卵が 20 回を超える供試牛 4 頭について試験と殺を行い、卵巣の癒着等について調査した。その結果、卵巣の癒着は認められなかったが、いずれも卵巣表面に繊維芽組織による皮膜の形成が認められた。なお、今回は経膈採卵終了直後に試験と殺を行っており、その後の過剰排卵処理による採胚性については未検討である。

平成 13 年度以降は供試牛を増頭して、引き続き試験に取り組んでおり、平成 14 年度までの回収卵子数の推移等について取りまとめを行った。

(1) 回収卵子数及びランクの推移

前述のように、平成 12 年度までは回収卵子数が少数であったことや、裸化率が高かったことから、吸引システムの改良を行った。平成 13 年度は吸引圧を 60mmHg から 100mmHg へ、誘導管からのシリコンチューブ長を 150cm から 100cm に変更した。これらの改良により、回収卵子数の増加が認められた。また平成 14 年度から採卵針を動物用採卵針 (ミサワ医科工業) に変更したところ、回収卵子数の有意な増加が認められた (図 1)。供試牛の増頭による卵巣条件の違いもあるが、吸引システムの変更が回収卵子数の増加に結びついていると考えられた。しかし、裸化率は改善が認められなかった。

(2) 体外受精成績の推移

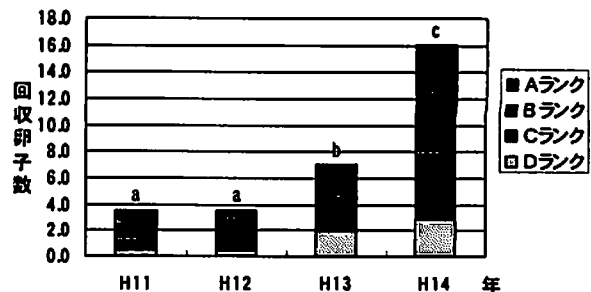


図1 回収卵子数及びランクの推移

異年同月に有意差あり

1 回当たりの体外受精成績は図 2 に示すとおり、年々向上している。特に平成 14 年度については回収卵子数の増加もあり、胚盤胞発生数の大幅な増加が認められる。同様に、分

割合及び胚盤胞発生率についても、平成13年度にはそれぞれ80%及び、56%にまで向上した。しかしながら、平成14年度には分割率で約10%、胚盤胞発生率で約20%、成績の低下が認められている。これは、一部の精液の受精率が著しく低かったことによると考える。

(3) 移植成績

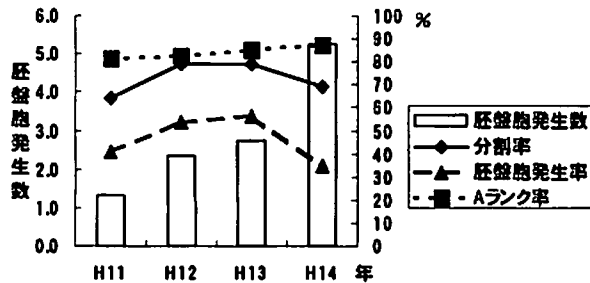


図2 体外受精成績

平成14年度からは、本法による雌胚を県内酪農家へ譲渡している。26頭に移植、13頭で受胎が確認され、受胎率は50.0%であった。しかしながら、全体の23%にあたる3頭で流産が確認された。流産の内訳は、移植後50日程度で胎児の娩出が確認されたものが2例、移植後100日前後に発情の回帰により流産が判明したものが1例であった。

受胎率は当センターでの試験成績と比較して低い数値であった。これは分娩事故防止のため、経産牛を受胎牛にしたことによるとと思われる。

以上述べたように、経膈採卵により採胚不良牛から胚の確保が可能となった。しかしながら、次の点が課題として残されている。

①回収卵子数の増加

現状では超音波画像上で確認される小卵胞のほとんどが回収されていることから、卵巣内の小卵胞そのものの増加を図る必要がある。これには、経膈採卵前の大卵胞除去、あるいは脂肪酸カルシウムなどの飼料添加剤の投与が考えられ、一部については既に検討を開始している。

②体外受精成績の向上

現状の体外受精成績は、分割率が約75%、胚盤胞発生率が約45%であり、他の報告と比較しても高い成績と思われる。しかし、個体による発生率のムラが見られ、改善の必要がある。

③受胎率の向上

受胎率を向上させるとともに流産率の低減を図る必要がある。特に流産率については、体外培養系について見直しを図る必要がある。

また、新たな試みとしてインターフェロン τ 等の妊娠維持物質を投与することによる妊娠の維持を図る方法も考えられる。

④体外胚の性別別後の保存

現在、性別別後の超低温保存をガラス化保存により行っているが、その受胎率は15%程度と新鮮胚移植と比較して著しく低い(未発表)。このため、体外胚の利用を大幅に制限する結果を招いている。これについては耐凍剤や平衡時間について、さらなる検討を行う必要がある。

このように解決すべき課題が山積しているが、新たな試みとして平成14年度からは、県内酪農家繁養の成績不良牛(ホルスタイン種)からの後継牛の作出に、経膈採卵による取り組みを開始している¹⁾。平成14年度は4頭について約3週間、当センターへ受託繁養し、この間に経膈採卵及び体外受精を行い、経膈採卵1回あたり、回収卵子数29.1個、うち正常卵子数21.3個、胚盤胞発生数8.0個という成績を得ている。その発生率等については、個体差があるものの、全ての供試牛から移植可能胚及び後継牛作出に至っており、有効な手段と考える。

経膈採卵は成績不良牛からの優良胚の確保に有用な技術であることが示された。今後は、当センター内にとどまらず、器具機材を農家に搬入して庭先での経膈採卵の実施等、さらなる活用を考えるとともに、山積している課題を解決し、後継牛の作出に活かしていきたいと考える。

引用文献

- 1) 坂部吉彦・有安則夫・小田頼政・中原仁(2001)：経膈採卵を利用した体外受精卵生産システムの確立。岡山県総合畜産センター研究報告、12号:21-23.
- 2) 日本家畜人工授精師協会(1993)：家畜人工授精講習会テキスト(家畜体外受精卵移植編)：93-94.
- 3) Kobayashi K, Takagi Y, Satoh T, Hoshi H and Oikawa T (1992)：Development of early bovine embryos to the blastocyst stage in serum-free conditioned medium from bovine granulosa cells. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 28A:255-259.
- 4) 木伏雅彦・福島護之・野田昌伸(1999)：経膈採卵法における連結チューブの長さ、吸引圧及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.
- 5) 小林修司・今井敬・堂地修・高橋博人・小島敏之(1996)：吸引装置を用いたウシ卵巣からの卵子採取、特に吸引圧が回収卵子数及び卵子の形態に及ぼす影響。東日本家畜受精卵移植技術研究会大会講演要旨:40-41.
- 6) 山本広憲(1998)：経膈採卵の実用化に向けて、

- 東日本家畜受精卵移植技術研究会大会講演要旨:11-14.
- 7) 内海恭三(1996)：体外受精卵由来ウシ産子の生時体重の調査成績.西日本胚移植研究会講演要旨:23.
- 8) 沼辺孝・及川俊徳・菊地武・堀内俊孝(2001)：共培養および非共培養により作出された体外受精胚移植による黒毛和種生産子牛の生時体重と妊娠期間.日本獣医学雑誌,63 巻, 5 号:515-519.
- 9) 石田美保・堀登・松田達彦・田中孝一・小前博文・北満夫(2000)：個体別体外受精による黒毛和種の生産(第2報)－個体別体外受精による黒毛和種の生産効率および肥育成績－.石川県畜産総合センター研究報告,34 号:12-16.
- 10) 岩田尚孝・赤松真一・南直治郎(1998)：斉一な牛群を用いて作製した体外受精・体外発育卵と体内受精・体内発育卵に由来する子牛生時体重の比較.The Journal of Reproduction and Development,44 巻,6 号:33-38.
- 11) 松井司・横田昌己・中村和典・近藤守人(1997)：超音波ガイド・経膈法による連続採卵が牛の繁殖整理に及ぼす影響.東日本家畜受精卵移植技術研究会大会講演 要旨:32.
- 12) 今井敬・小西一之・岡田真人・後藤裕司・小林修司・宮沢彰・小島敏之・堂地修・高橋博人(1997)：ホルスタイン種乾乳牛における連続生体卵子吸引採取前後の過剰排卵処理成績.東日本家畜受精卵移植技術研究会大会講演要旨:26-27.
- 13) 一丸仁・福島彩・黒川洋介・長友邦夫(2000)：受精卵移植関連新技術の実証および普及に関する試験(第9報)－経膈採卵と過剰排卵処理法を組み合わせた効率的な受精卵生産システムの検討－.佐賀県畜産試験場試験研究成績書,37 号:12-19.
- 14) 伊藤博康・齋藤真希・齋藤朗子・青柳和重・小林正人・岡崎光幸(2000)：連続経膈採卵後の過剰排卵処理法の検討(第1報).山形県農業研究研修センター畜産研究部研究報告,47 号:84-84.
- 15) 有安則夫・坂部吉彦・水木剛・小田頼政(2003)：経膈採卵のフィールドへの応用.日本胚移植研究会講演要旨:49.塩谷康生・桑山正成・上田修二・斉藤秀一・太田均・花田章(1988)：家畜繁殖誌,34,39-43.