

17. 経膣採卵及び雌選別精液を用いた体外受精による 乳用後継牛生産の新たな取り組み

農林水産研究指導センター畜産研究部 豊後大野家畜保健衛生所¹⁾

○澤野貴之 安達聡¹⁾ 渡邊竜二 (病鑑) 矢崎竜

田中伸幸 倉原貴美 (病鑑) 藤田達男

【要旨】

経膣採卵(Ovum Pick-up; OPU)による卵子採取技術及び雌選別精液を用いた体外受精(In Vitro Fertilization; IVF)により後継牛生産が可能であるが、乳用牛では胚生産効率が低い。OPU 実施前に安息香酸エストラジオール(EB)含有 PRID 挿入と FSH(卵胞刺激ホルモン)による前処理を行うと、胚盤胞発生率は高値であった。そこで 2 頭の酪農家が飼養する延べ 12 頭の搾乳牛を用いて EB と FSH を利用した前処理後の OPU 由来の卵子と雌選別精液を用いた IVF による胚生産試験を行い 23.9%の胚盤胞発生率が得られた。生産した凍結卵を酪農家飼養の乳用牛 29 頭に移植した結果、7 頭受胎のうち 4 頭は正常分娩により雌産仔が得られた。本試験により、雌選別精液を活用した OPU-IVF 技術により高能力後継雌牛を生産することが可能であることが示された。

【背景】

近年、乳牛の人工授精受胎率が低下しており、後継牛確保が課題となっている。乳牛は過剰排卵処理に対する反応にばらつきがあるため、体内胚採取技術にも限界がある。高泌乳牛から後継牛を自家生産したいという酪農家からの要望は強い。そこで、Pieterse らが考案¹⁾した経膣採卵(Ovum Pick-up; OPU)と体外受精(In Vitro Fertilization; IVF)の技術を利用した後継牛生産の実証を本試験の目的とした。

OPU とは、超音波画像診断装置を見ながらウシの卵巢から卵子を採取するという新しい技術である。膣内にプローブを挿入し、直腸から卵巢を保持誘導して超音波画像に映る卵胞を採卵針で穿刺して卵子を採取する。採取した未成熟卵子の成熟培養後に IVF を行うと、7～8 日間の発生培養により胚盤胞が発生し移植に用いることができる。

乳用牛において OPU-IVF での胚生産効率は低いものの、胚生産効率向上のために OPU 採取卵子の品質を向上する手法として卵胞波調節と卵胞刺激の OPU 前処理が有効であると Imai らにより報告²⁾されている。しかし Imai らが前処理として行った大卵胞吸引除去(DFA)や FSH 漸減投与は作業が煩雑であるという課題がある。Hiraizumi らは体内受精卵採取前の過剰排卵処理時に FSH 皮下 1 回投与でも漸減投与と遜色ない成績が得られたことを報告³⁾している。また、PRID に付属する安息香酸エストラジオール(EB)は卵胞波を誘起する作用がある⁴⁾ことから、大卵胞吸引除去の代替処理として利用できる可能性が考えられる。そこで、試験 1 では OPU 前に卵胞波調節として、EB 含有 PRID 挿入と FSH 皮下 1 回投与による前処理の胚生産率向上効果について検討した。そして、試験 2 では県内酪農家で飼養されている高泌乳牛を用いて、OPU により

採取した卵子と雌選別精液を用いた IVF による胚生産試験と胚の移植試験を行い、胚生産成績および受胎・分娩成績を調査した。

なお、本試験の試験 1 は、神奈川、奈良、高知、山口、宮崎、大分の 6 県による受精卵移植共同試験内で実施した当県での成績である。

【試験方法】

1. 経膈採卵

試験 1 では当県畜産研究部飼養のホルスタイン種搾乳牛 3 頭、試験 2 では 2 戸の県内酪農家飼養のホルスタイン種搾乳牛延べ 12 頭を供試した。供試牛は保定し除糞後に 2%塩酸プロカイン（動物用塩プロ；共立製薬）で尾椎硬膜外麻酔を行い外陰部の洗浄消毒を行った。超音波画像診断装置（EUB405B；日立メディコ）に 6.5MHz の探索子を装着し、モニターを確認し大卵胞（直径 10mm 以上）、中卵胞（直径 5-10mm）、小卵胞（直径 5mm 以下）の数を確認後、ディスプレイ採卵針（ミサワ医科工業）により卵胞を吸引した。吸引にはフットペダル式吸引システム（クックメディカル社）を使用し吸引圧は 105 または 115mmHg とした。卵子回収用 50ml チューブは 38°C で保温し、1%非働化牛胎児血清（FCS；GIBCO）および 10U/ml ヘパリン（ノボヘパリン；持田製薬）を添加した乳酸加リンゲル液（ハルゼン V 注射液；日本全薬工業）を灌流液に用いた。

2. 成熟培養

成熟培養法は、Sakagami らによる方法⁵⁾⁶⁾を用いた。すなわち、0.02 AU/ml FSH（アントリン R10；共立製薬）、1 μg/ml Estradiol-17β（SIGMA）、0.2 mM ピルビン酸（SIGMA）、100 U/ml ペニシリン G（ペニシリン G カリウム；Meiji Seika ファルマ）、100 μg/ml ストレプトマイシン（硫酸ストレプトマイシン；Meiji Seika ファルマ）、5%FCS 添加 TCM-199（GIBCO）の 100μl ドロップを作成し流動パラフィンでカバーし 20～22 時間 38.5°C、5%CO₂ in air、湿潤の条件下で培養した。

3. 媒精

試験 1 では黒毛和種の精液を使用した。37°C で融解後に IVF100（機能性ペプチド研究所）で 2 回遠心洗浄した（2,000rpm、37°C）。精子濃度 5 x 10⁶/ml の 100μl IVF100 のドロップ内に卵子 15 個を入れ、6 時間 38.5°C、5%CO₂ in air、湿潤の条件下で媒精した。試験 2 では雌選別精液として海外輸入ホルスタイン種精液を使用した。雌選別精液を用いた媒精は家畜改良センター作成マニュアル⁷⁾に従って行った。すなわち、35°C の温湯中 45 秒間凍結融解した雌選別精液を 45%および 60%パーコール密度勾配液で分離し、IVF100 で洗浄した後、IVF100 のドロップ内で最終精子濃度を 5.0 × 10⁶/ml とし 6 時間 38.5°C、5%CO₂ in air、湿潤の条件下で媒精した。

4. 発生培養

発生培養法は、Nishino らによる方法⁶⁾⁸⁾を用いた。発生培養液として、2%BME（SIGMA）、1%MEM（GIBCO）、1 mg/ml PVA（Polyvinyl alcohol；SIGMA）、100 ng/ml EGF（上皮細胞成長因子；SIGMA）、50 ng/ml IGF- I（インスリン様成長因子- I；SIGMA）、5

$\mu\text{g/ml}$ トランスフェリン（機能性ペプチド研究所）、 5 ng/ml セレン（機能性ペプチド研究所）を添加した mSOF（機能性ペプチド研究所）を基礎培地とした。媒精終了後ピペッティングにより透明帯周囲の余分な卵丘細胞や精子を取り除き、mSOF のドロップ内で $38.5\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$ $5\%\text{O}_2$ in air、湿潤の条件下で培養した。ドロップの液量は 1 胚あたり $5\mu\text{l}$ 、5 胚以下の場合は $20\mu\text{l}$ とした。発生培養開始の 6 日後に培養液に 4mM グルコース（和光純薬）を添加した。

5. 受精卵の凍結

発生培養 7 または 8 日目に胚盤胞から拡張胚盤胞の間のステージの IETS (International Embryo Transfer Society, 国際受精卵移植学会) マニュアルの Code1 (正常な発育段階にあり、輪郭明瞭、正常ないしほぼ正常な形態を示し、変性部位が 15%以下) の受精卵を凍結した。 10% グリセリン (SIGMA)、 0.25M スクロース (和光純薬)、 20% FCS 含有修正 TCM-199 を凍結液とした。受精卵を 10% グリセリン、 20% FCS 含有修正 TCM-199 で 15 分間平衡した後、凍結液とともに 0.25ml プラスチックストローに充填した。ストローの冷却は無水エタノールを入れたプログラムフリーザー (ET-U5; チノー社) を用い、 $-6.0\text{ }^\circ\text{C}$ に達したフリーザーにストローをセットし、60 秒後に植氷。植氷後 8 分間 $-6.0\text{ }^\circ\text{C}$ に保持した後、毎分 $-0.33\text{ }^\circ\text{C}$ のスピードで $-25.0\text{ }^\circ\text{C}$ まで冷却し 5 分保持後に液体窒素内に投入した。

6. 凍結受精卵の移植

移植は発情同期化処理を行ったホルスタイン種乳用牛に対し行った。発情周期の任意の時期に PRID (あすかアニマルヘルス、本体シリコンラバー内にプロジェステロン 1.55mg 、カプセル内に EB 10mg 含有) を膈内挿入、その 7 日後に PRID 抜去しプロスタグランジン F2 α (ジノプロスト 25mg 、プロナルゴン F; ゴエティス) を筋肉内投与、その 9 日後に受精卵移植を行った。

凍結受精卵は液体窒素ボンベから出し大気中保持 10 秒後に $30\sim 35\text{ }^\circ\text{C}$ の温湯 10 秒で融解後に移植器モ 1 号 (ミサワ医科工業) にセットし、受胎牛の黄体側子宮角に移植を行った。

7. 試験デザイン

試験 1 (図 1)

卵子品質改善を目的に OPU 前処理方法の検討試験を行った。各試験区の前処理後に実施した OPU により採取した卵子由来の体外受精卵を生産し、卵子採取成績・受精卵生産成績を比較する試験とした。試験区設定として、1 区では発情周期の任意の時期に OPU を行い、その 4 日後 EB 含有 PRID を膈内挿入、その 4 日後に 20 AU FSH を 10 ml の生理食塩水に溶解し乳牛の頸部皮下 1 か所に投与し、その 2 日後に OPU を実施した。2 区では発情周期の任意の時期に OPU を行い、その 4 日後直径 6mm 以上の卵胞をすべて吸引し EB カプセルを除去した PRID を膈内挿入、その 2 日後に 20 AU FSH を 10 ml の生理食塩水に溶解し乳牛の頸部皮下 1 か所に投与し、その 2 日後に OPU

を実施した。3区では前処置なしで OPU を実施した。OPU により採取した卵子数は検卵時に調査した。卵子を成熟培養した後に媒精・発生培養を行い媒精 8 日後の胚盤胞発生率を調査した。

試験 2

試験 2 では OPU 前処理として、発情周期の任意の時期に EB 含有 PRID を腔内挿入、その 4 日後に 20 AU FSH を皮下投与した。

その 2 日後に OPU を実施し、現地で検卵後に上述の成熟培養液とともに卵子をストロー内に封入し、ストロー内の時間も含め 22 時間成熟培養を行った。媒精・発生培養を行い媒精 8 日後の胚盤胞発生率を調査した。また、媒精 7～8 日後に発生した Code 1 の受精卵を緩慢凍結し、2014 年 8～9 月に、同一酪農家飼育の乳用牛に移植した。妊娠診断は移植後 35 日目以降に超音波画像診断装置により判定した。

8. 統計処理

分散分析後に Tukey の HSD 検定を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。なお、%の値は、アークサイン変換をした後に検定を行った。

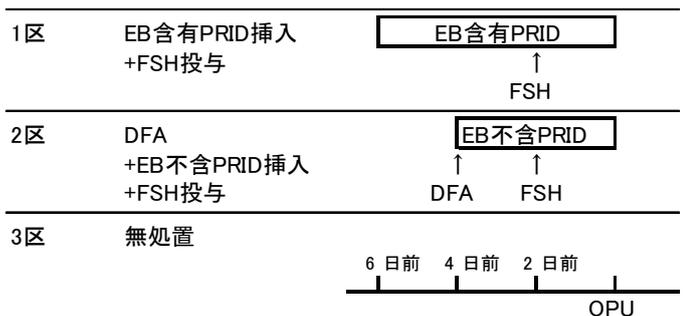
【結果及び考察】

試験 1 (表 1)

OPU 前処理として、実施 6 日前に EB 含有 PRID 腔内挿入 + 2 日前に FSH 投与(1区)並びに実施 4 日前に DFA + EB 不含 PRID 腔内挿入 + 2 日前に FSH 投与(2区)を行う試験区で

は、OPU 時の中卵胞数が有意に増加した。OPU により採取した卵子数は各試験区間で有意な差が認められなかったが、胚盤胞発生率は有意差はないものの 1区で高値であった。

OPU 前に主席卵胞を除去すると新しい卵胞波が生まれ発育卵胞の多くが正常卵子を育む²⁾。そして、直径 6mm より大きい卵胞から採取した卵子は、2～6mm の卵胞から採取した卵子と比較して胚発生率が高いとされている⁹⁾。本試験の 1区では、OPU 前の EB 含有 PRID + FSH 処置により卵子の品質が向上したため、胚盤胞発生率が高値であったと考えられる。EB の作用機序については、プロジェステロンと協調して働き LH(黄体形成ホルモン)および FSH 分泌が低下することで主席卵胞は退行し、新



※ OPU: 経腔採卵
EB: 安息香酸エストラジオール
PRID: 腔内留置型黄体ホルモン製剤
FSH: 卵胞刺激ホルモン(20AU/10ml生食皮下投与) DFA: 大卵胞吸引除去
供試牛3頭を用いて各試験区に1回ずつ供試

図1 OPU前処置方法検討試験の試験区設定

表1 OPU前処理方法検討試験における卵子採取および胚生産成績

	供試頭数	OPU時の卵胞数			採取卵子数	胚盤胞発生率(%)
		大	中	小		
1区	3	1.7	18.0 a	6.7	21.0	36.2
2区	3	2.0	14.0 a	9.0	19.3	27.9
3区	3	2.0	1.0 b	18.3	20.0	27.2

※ 大卵胞:直径10mm以上 中卵胞:5~10mm 小卵胞:5mm以下
胚盤胞発生率:媒精8日後の胚盤胞数/供試卵子数 a,b : $p < 0.05$

たな卵胞波が発生し正常卵子が発育すると考えられている¹⁰⁾。

ただし、1区で使用したEB含有PRIDは平成27年現在販売中止となっており、膈内留置型黄体ホルモン製剤としてCIDRが入手できる状況である。わが国の食品安全委員会においては、EB含有PRIDが食品を通じヒトの健康に与える影響は無視できるものと考えられるとリスク評価している¹¹⁾ものの、EUではEBの牛での使用が禁止されており、わが国においても今後使用制限/販売中止される可能性がある点には留意しておく必要がある。

試験2(表2、表3)

酪農家飼育の搾乳牛延べ12頭におけるOPUにより平均13.3個の卵子が採取され、胚発生数は2.7個、胚盤胞発生率は23.9%であった。Code 1の凍結受精卵を29頭の乳用牛に移植した結果、7頭受胎した(受胎率24.1%)。この産子はすべて雌であった。4頭は正常分娩したが、2頭は過大子による難産死(妊娠期間は268・275日)、1頭は受胎牛(産歴8産)の事故廃用であった。

近年、雌選別精液が市販化され約90%の確率で雌産子が得られることから後継牛生産の効率化が可能となる。性判別PCR時に行うサンプル採取では胚に損傷を与えるという問題点があるが、雌選別精液をIVFに用いることによりこの問題点を回避することが可能というメリットもある。また、試験2におけるOPU1頭あたりの胚発生数は2.7個であり、1か月に2回OPUを行うとすれば1年間で $2.7 \times 24 \times 0.9 = 58.32$ 個の雌胚を得られる計算となり、体内胚採取と比較して胚生産効率が高いことがわかる。ただし、胚生産方法に関しては更なる改善の余地があり、Matobaらは、体内成熟卵子をOPUにより採取し雌選別精液でIVFを行うことにより胚盤胞発生率34.8%という結果が得られたと報告¹¹⁾している。OPUで採取した未成熟卵子を体外成熟後にIVFを行う従来法と比較して、OPUで体内成熟卵子を採取しIVFを行う手法では効率的に胚生産できるものと考えられ、今後は体内成熟卵子を用いた胚生産についても検討していきたい。なお、平成27年現在、国内産の雌選別精液を体外受精に使用することは知的財産権により制限されており、体外受精に使用可能な雌選別精液は海外輸入精液のみとなっている点には注意が必要である。

受胎した受胎牛のうち事故廃用となったのは、産歴8産の経産牛(月齢129か月)であった。このことから、高齢牛への体外受精卵の移植は慎重に行うべきと考えられた。また、2頭で過大子難産による死産が認められたが、Takahashiらは、過大子発生率の高いホルスタイン種クローン胚産子の分娩前体重モニタリングにより過大子と予測された場合に、分娩誘起処置をすることで死産を防止できたと報告している¹³⁾。そこで我々は、今後体外胚移植を行う際には分娩管理や分娩監視を強化し、分娩予定日

表2 県内酪農家での実証試験

(OPU前処理+OPU-IVFによる胚生産成績)

供試頭数	採取 卵子数	胚盤胞 発生率(%)
12	13.3	23.9

表3 県内酪農家での実証試験

(凍結胚の移植および分娩成績)

移植頭数	受胎頭数	受胎率(%)	正常 分娩頭数
29	7	24.1	4

※県内2戸の酪農家で実施

移植時期は平成25年8~9月

分娩事故のうち、2頭は過大子による難産死
1頭は受胎牛の起立不能に伴う廃用

前の産子体重モニタリングと分娩誘起による分娩事故軽減効果があるか検討する予定である。

本試験で生産された凍結受精卵は夏季(8～9月)に乳用牛に移植し、受胎率は24.1%であった。全国平均の凍結体外受精卵受胎率の39%(農林水産省調べ)には及ばなかったが、前年同時期同農場での人工授精受胎率6.9%より大きく向上し、受精卵移植を行った意義は大きいと考えられる。そこで今後は体外受精卵の生産効率を向上させると共に、受精卵移植の受胎成績を向上させることにより、県内における体外受精卵移植の普及を促進していきたいと考えており、平成27年度から試験課題「酪農生産基盤強化に向けた黒毛和種体外受精卵生産技術の確立および乳牛の受胎環境改善方法の確立」の中で乳牛の繁殖成績向上対策に取り組む。

高泌乳牛からのOPU-IVFにより生産した胚を低能力牛に移植すれば、効率的な高能力後継牛生産が可能であり牛群の能力を改善することができる。OPU-IVFを利用した後継牛生産は、生産基盤強化に寄与する点で普及すべき技術であると考えられ、本試験で用いた手法の活用を図りたい。

【謝辞】

本研究の実施にあたりご指導・ご協力を頂きました独立行政法人家畜改良センター技術部の諸先生方、および各県の共同研究者の皆様に深謝いたします。

【引用文献】

- 1) Pieterse MC, Kappen KA, Kruijff TA, Taverne MA. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 30(4): 751-762. (1988)
- 2) 今井敬・大竹正樹・相川芳雄・松田秀雄・山之内忠幸・稲葉泰志・的場理子・杉村智史・橋谷田豊. 日本胚移植学雑誌 36(2):109-114. (2014)
- 3) Hiraizumi S, Nishinomiya H, Oikawa T, Sakagami N, Sano F, Nishino O, Kurahara T, Nishimoto N, Ishiyama O, Hasegawa Y, Hashiyada Y. Superovulatory response in Japanese Black cows receiving a single subcutaneous porcine follicle-stimulating hormone treatment or six intramuscular treatments over three days. *Theriogenology* 83(4): 466-473. (2015)
- 4) Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tribulo R, Tribulo H, Mapletoft RJ. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*. 57:53-72. (2002)
- 5) Sakagami N, Nishino O, Adachi S, Umeki H, Uchiyama H, Ichikawa K, Takeshita K, Kaneko E, Akiyama K, Kobayashi S, Tamada H. Improvement of preimplantation development of in vitro-fertilized bovine zygotes by glucose supplementation to a chemically defined medium. *J Vet Med Sci*. 76(10):1403-1405. (2014)
- 6) 安達聡・渡邊竜二・佐藤恭二・藤田達男. 経膈採卵-体外受精による良品質胚生産の検討. 平成23年度大分県農林水産研究指導センター畜産研究部試験成績報告書 41 (2012)

- 7) 的場理子・今井敬. 体内成熟卵子採取法マニュアル. 家畜改良センター. (2013)
- 8) 西野治・坂上信忠・竹下和久・恒石望太郎・安達聡・内山浩子・橋谷田豊. 無血清発生培地への成長因子・グルコース・トランスフェリン・セレンの添加がウシ胚の発生率および品質に及ぼす影響. 日本胚移植学雑誌 34(1):40. (2012)
- 9) Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Mol Reprod Dev.*37(1):48-53. (1994)
- 10) Burke CR, Day ML, Bunt CR, Macmillan KL. Use of a small dose of estradiol benzoate during diestrus to synchronize development of the ovulatory follicle in cattle. *J Anim Sci.* ;78(1):145-51. (2000)
- 11) 食品安全委員会. プロゲステロン及び安息香酸エストラジオールを有効成分とする牛の発情周期同調用膈内挿入剤の食品健康影響評価について. URL:<https://www.fsc.go.jp/hyouka/hy/hy-progesteron-hyouka.pdf> (2004)
- 12) Matoba S, Yoshioka H, Matsuda H, Sugimura S, Aikawa Y, Ohtake M, Hashiyada Y, Seta T, Nakagawa K, Lonergan P, Imai K. Optimizing production of in vivo-matured oocytes from superstimulated Holstein cows for in vitro production of embryos using X-sorted sperm. *J Dairy Sci.* 97(2):743-753. (2014)
- 13) Takahashi M, Goto T, Tsuchiya H, Ueki A, Kawahata K. Ultrasonographic monitoring of nuclear transferred fetal weight during the final stage of gestation in Holstein cows. *J Vet Med Sci.* 67(8):807-11. (2005)