

超音波誘導経膈採卵法 (Ovum Pick-Up ; OPU) 技術の確立

(1) と畜場卵巣由来卵胞卵を用いた培養試験および凍結方法の検討

西山朱音 建本秀樹* 平安山英登

I 要 約

経膈採卵 (OPU) 実施に先だって、基礎研究としてと殺された雌畜の卵巣を用いて 2 頭の県有種雄牛 (K および M) を用いて発生培養試験を行った。さらに発生培養した総胚盤胞期胚を 2 種類の凍結方法を用いて凍結し、融解後の再拡張率を観察することで凍結方法の検討を行った。

その結果は以下の通りであった。

1. 2 頭の種雄牛 K と M の凍結精液を用いた結果、Day2 の分割率は 64.3% と 78.6% で有意差はなかったが、胚盤胞発生率は 0% と 42.9% で有意差があった。
2. 卵割から胚盤胞期まで発生率の高かった種雄牛 M では、胚盤胞期胚発生率は Day6 で 7.9%、Day8 で 25.0% と観察された。さらに、総胚盤胞期胚の発生率は、46.1% であった。
3. 2 種類のガラス化凍結法を比較したところ、2step 法で 34.8%、3step 法で 20.0% の融解後再拡張率であり、2step 法で増加する傾向にあった。

II 緒 言

OPU と体外受精 (IVF) による体外受精胚生産は、子宮灌流による体内胚採卵法を代替する胚生産法として多くの研究者により開発されてきた^{1, 2)}。また、体内受精卵生産の際に必須の過剰排卵処置 (SOV) を必ずしも必要としないため、SOV に反応しない供卵牛 (繁殖障害等) や妊娠牛からも採卵が可能である³⁾ ことから、利用できる供卵牛の幅も広がる利点がある。

沖縄県は全国有数の肉用子牛生産地であり、高能力種雄牛の造成と育種価に優れた母牛群の整備が今後の課題となっている。そこで、OPU 技術を用いて優良雌牛から継続的に週に 1~2 回の頻度で採卵を行い、優良雄牛精子との IVF により、凍結保存に耐え得る良質な胚を生産できれば、効果的な優良牛の普及拡大ならびに遺伝資源の保護が容易になる。

しかし、IVF 卵は体内受精卵と比べて、細胞数が少ないこと⁴⁾ や凍結傷害に対する感受性が高いこと⁵⁾ が指摘されており様々な発生培養や凍結方法の検討がなされている。

そこで、本研究では OPU により採取された卵子を効率的に体外発生 (IVC) させ凍結保存する技術の確立を目的として、と殺由来の卵子を用いて体外成熟 (IVM) / IVF 由来胚の作出を行い 2 種類のガラス化凍結法を検討した。

III 材料および方法

1. 試験期間および試験場所

試験は 2021 年 7 月から 2021 年 11 月まで琉球大学農学部家畜繁殖学研究室にて培養実験を実施した。

2. 試験方法

1) 材料

株式会社沖縄県食肉センターでと殺された廃用雌牛卵巣を高圧蒸気滅菌済み 0.9% (w/v) 生理食塩水内で 30℃ に保ち輸送し、卵巣表面の直径が 3~8mm 以下の小卵胞から採取した卵子を用いた。

また、媒精に使用する凍結精液は、2 頭の県有種雄牛 K と M を用いた。

* 琉球大学農学部家畜繁殖学研究室

2) IVM

回収した卵丘細胞-卵子複合体 (COCs) は、TL-HEPES-PVA 溶液内で再選別および洗浄を行った。そして、IVM 培地ドロップ 100 μ l 毎に COCs を 16~20 個ずつ入れ、5%CO₂、95%空気、39°C で 21~22 時間の IVM 培養を行った。TL-HEPES-PVA 溶液および IVM 培地組成は、表 1 に示した。

表 1 TL-HEPES-PVA溶液およびIVM培地の組成

TL-HEPES-PVA溶液		IVM培地	
NaCl	114mM	Medium 199 HEPES Modification	
KCl	3.2mM	-Powder (M-2520; Sigma-Aldrich,	
NaH ₂ PO ₄	0.34mM	-St. Louis, MO, USA)	15mg/ml
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.5mM	NaHCO ₃	26.18mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2mM	New born calf serum (NCS)	10%(v/v)
NaHCO ₃	2mM	Cysteine	0.6mM
HEPES	10mM	LH	0.02U/ml
Na-pyruvate	0.2mM	FSH	0.04U/ml
Na-lactate	10mM	Penicillin G	100IU/ml
Penicillin G	100IU/ml	Streptomycin	50 μ g/ml
Streptomycin	50 μ g/ml		
PVA	0.01%(w/v)		

3) IVF および IVC

IVM 終了後、IVF 培地 (B0-IVF; IVF Bioscience, Cornwall, UK) 内で COCs を洗浄した後、IVF 培地ドロップ (100 μ l) に 15~20 個ずつ移した。いっぽう、0.5ml ストロウの牛凍結精液を融解し B0-SemenPrep (IVF Bioscience) に攪拌し遠心分離操作で 2 回洗浄し、精子濃度が約 2.3×10^6 /ml で COCs の入った IVF 培地ドロップに加えて媒精を行った。その後、5%CO₂、95%空気、39°C 条件下で 16~20 時間の共培養を行い、卵透明帯表面に付着している精子および卵丘細胞を受精卵より剝離し、裸化卵を IVC 培地 (B0-IVC; IVF Bioscience) の各ドロップ 50 μ l に 20~30 個ずつ移し、マルチガスインキュベーター (39°C, 5%O₂, 5%CO₂, 90%N₂) 内で IVC 培養を行った。

4) ガラス化凍結

ガラス化凍結培地には Basic medium (BM) を使用し、BM の組成は表 2 に示した。そして、IVC 培養 Day6 および Day7 の拡張胚盤胞期胚を、2 種類 (2step 凍結法と 3step 凍結法) のガラス化凍結法を用いて凍結した。

まず、2step 凍結法では、胚を平衡培地に移し、39°C で 3 分間維持した。平衡化後、胚をガラス化溶液①中で 2 回洗浄した。

いっぽう、3step 凍結法では、胚を平衡培地①に移し、39°C で 3 分間維持した。次に、平衡培地②に移し、再び 39°C で 3 分間維持した。平衡化後、胚をガラス化溶液②中で 2 回洗浄した。

そして、両凍結法の胚は、Cryotop (KITAZATO Co., 静岡) シート上に最小量のガラス化溶液と共に乗せ、40~50 秒以内に液体窒素中に直接投入した。それぞれで使用した凍結培地や溶液の組成は表 2 と表 3 に示した。

表 2 ガラス化凍結培地およびガラス化溶液の組成

ガラス化凍結培地 (BM)		ガラス化溶液①		ガラス化溶液②
Medium 199	15mg/ml	BM		
NaHCO ₃	26.18mM	Ethylene glycol	15%(v/v)	16.25% (v/v)
NCS	20%(v/v)	Dimethyl sulfoxide (DMSO)	15%(v/v)	16.25% (v/v)
Penicillin G	100IU/ml	Sucrose	0.5M	0.6 M
Streptomycin	50 μg/ml	Polyvinylpyrrolidone		50 mg/ml

表 3 平衡培地の組成

平衡培地	平衡培地①	平衡培地②
BM		
Ethylene glycol	7.5% (v/v)	3.75% (v/v)
DMSO	7.5% (v/v)	3.75% (v/v)

5) 融解

2step凍結法でガラス化凍結した胚の融解時には、Cryotopを37°Cの融解液①に迅速に浸して融解し、37°Cのホットプレート上で1分間静置した。その後、胚を37°Cの融解液②で3分間静置した。

いっぽう、3step凍結法でガラス化凍結した胚においては、39°Cの融解液①で融解し、39°Cで1分間静置した。その後、胚を39°Cの融解液②と融解液③でそれぞれ3分間静置した。

そして、両処理区の胚を39°CのBM中で5分間維持し、IVC培地で3回洗浄し、50 μlドロップのIVC培地に移し、マルチガスインキュベーター内で培養した。それぞれ融解液の組成は表4に示した。

表 4 融解液の組成

2step		3step	
融解液①	BM + 0.5 M Sucrose	融解液①	BM + 1 M Sucrose
融解液②	BM + 0.25 M Sucrose	融解液②	BM + 0.5 M Sucrose
		融解液③	BM + 0.25 M Sucrose

3. 調査項目

1) 種雄牛凍結精液別胚盤胞発生率

2頭の県有種雄牛凍結精液を用いてIVFを行い、各凍結精液の胚盤胞の発生率を調査した。

2) 総胚盤胞期胚発生率

IVF日をDay 0とし、Day 2 (IVF 40時間後)に分割率を、Day 5~8で胚盤胞期胚への発生を調査した。

3) 2種類の凍結法を用いた凍結後胚の再拡張率

2種類の凍結方法により凍結した胚を融解し、再拡張率(生存率)を調査した。評価は融解後16時間で行った。

4. 統計処理

得られたデータは平均±標準誤差(SE)で示した。統計処理は、統計解析ソフトRを用いて行った。Shapiro-Wilk normality testで正規性を確認した後、一因子の一般化線形モデル(Generalized Linear Model; GLM)とANOVA解析を行い、有意差が認められた場合にはTukey-Kramer testによる多重比較検定

で各処理間の有意差を検定した。いっぽう，%データはGLMに二項分布関数を適用してANOVA解析を行った上でノンパラメトリック型Tukey法により多重比較検定を行った。

IV 結 果

1. 種雄牛凍結精液別発生率

2頭の県有種雄牛凍結精液を用いてIVFを行い，各精子の胚発生能を調べた結果を表5に示した。IVFを行った日をDay0として，Day2の分割率においては，種雄牛Kと種雄牛Mでそれぞれ64.3と78.6%となり有意差は認められなかった。しかし，種雄牛KのIVF卵では胚盤胞期への発生が認められなかった。

いっぽう，種雄牛MはDay6から胚盤胞期への発生胚が観察され，Day8までの総胚盤胞期胚への発生率は42.9%を示し有意差が認められた。 $(p < 0.05)$ また，種雄牛Mの総胚盤胞期胚のうち14.3%がハッチングまで観察された。

表5 種雄牛別胚発生成績

種雄牛精液	COCs数	分割卵数 (%; 平均±SE)	胚盤胞期胚数(%; 平均±SE)			総胚盤胞期胚数 (%; 平均±SE)	孵化胚数 (%; 平均±SE)
			Day6	Day7	Day8		
K	14	9 (64.3±12.8)	0 (0.0±0.0)	0 (0.0±0.0)	0 (0.0±0.0)	0 (0.0±0.0)	0 (0.0±0.0)
M	14	11 (78.6±11.0)	1 (7.1±6.9)	0 (0.0±0.0)	5* (35.7±12.8)	6* (42.9±3.4)	2 (14.3±9.4)

注1) Day0=IVF

2)*: $p < 0.05$



写真1 種雄牛Mで作出した孵化胚

2. 総胚盤胞期胚発生率

2頭の凍結精液のうち発生率の高い，種雄牛Mの胚盤胞期胚への発生率の詳細を表6に示した。その結果，Day6において7.9%，Day7では13.2%，さらにはDay8では25.0%の発生率であった。そして，総胚盤胞期胚への発生率は46.1%であった。

表 6 種雄牛Mにおける胚発生成績

COC s 数	分割卵数 (% ; 平均±SE)	胚盤胞期胚数 (% ; 平均±SE)				総胚盤胞期胚数 (% ; 平均±SE)
		Day5	Day6	Day7	Day8	
76	69 (90.8±3.3)	0 (0±0)	6 (7.9±3.0)	10 (13.2±3.9)	19 (25.0±5.0)	35 (46.1±5.7)

注) Day0=IVF

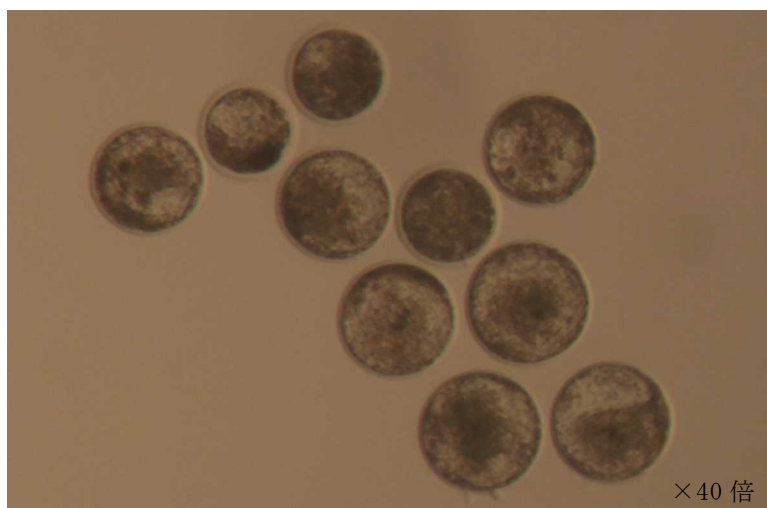


写真 2 種雄牛Mで作出した総胚盤胞期胚

3. 2 種類の凍結法 (2step 凍結法および 3step 凍結法) における融解後の再拡張率

最後に、2 種類のガラス化凍結法が胚盤胞期胚のガラス化凍結融解後の再拡張率(生存率)に及ぼす影響を表 7 に示した。その結果、2 step 凍結法が 3 step 凍結法と比較して凍結融解後の再拡張率が、統計的には差は無かったものの増加する傾向にあった。

表 7 凍結方法の検討

ガラス化凍結法	凍結胚数	融解後の再拡張胚数 (% ; 平均±SE)
2step	23	8 (34.8±9.9)
3step	20	4 (20.0±8.9)

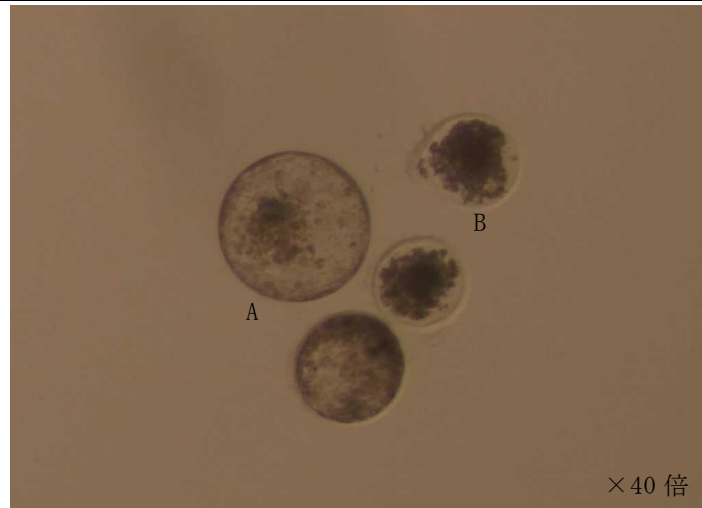


写真3 凍結後再拡張した胚(A)と死滅した胚(B)

V 考 察

沖縄県種雄牛凍結精液のうち、種雄牛MでDay 6からDay 8の期間での胚盤胞期胚への発生率が有意に高かった。この結果から、本試験ではIVFを行う際の凍結精液は種雄牛Mが適していると考えられた。この要因の1つとして、IVFによる胚盤胞発生数及び発生率は、個体により大きな差がある^{3)・6)}ことが挙げられる。また夏季の暑熱は家畜の繁殖性を低下させ、特に大型家畜は暑熱ストレスを強く受ける⁷⁾ことより凍結精液の品質の違いが考えられ、本試験で用いた種雄牛Kの精採月が9月であったことが発生率の低下を招いたもう1つの要因と考察される。

また、IVCを5%酸素濃度で行うことにより胚盤胞への発生率の向上と発生胚盤胞の細胞数が増加することが報告されており⁸⁾、本試験でも3種混合インキュベーター内で酸素分圧を5%に低下させた条件で行ったところ、46.1%の胚盤胞期胚への発生率が認められた。特に、Day 6とDay 7で約半数の胚盤胞期胚が得られた結果から、この培養条件下で作出した体外発生胚は高い発生能を有していると推察される。

さらに、2種類のガラス化凍結方法を用いて胚盤胞期胚のガラス化凍結融解後の再拡張率に及ぼす影響を調べた結果、2stepでのガラス化凍結法の方が3stepのガラス化凍結法と比較して凍結融解後の再拡張率が増加傾向にあった。しかし、2step法のガラス化凍結法であっても34.8%の再拡張率であり、この技術を用いて胚移植(ET)法により産子を高率に生産するためには、再拡張率を改善する必要がある。その為には、凍結前の胚盤胞期胚の品質の向上とその選別方法が重要となる。近年では、IVF胚の個別培養、タイムラプス・シネマトグラフィーによる観察および走査型電子化学顕微鏡による酸素消費量の測定を用いた研究^{9)・10)}などで、胚の発生動態がその後の発生能に及ぼすことが報告されている。これらの研究によれば、第一卵割までの時間やフラグメンテーションの有無、胚盤胞期での酸素消費量などの指標を加えることで、高受胎率が望める移植胚の選別ができるとされているため、以後の研究においても、この指標に準じた検討をする必要があると考えられる。

また、凍結保護剤にEthylene glycolとDMSOを用いたが、DMSOは細胞内への浸透性には優れているものの、その高い毒性が指摘されている¹¹⁾。ガラス化凍結時だけでなく緩慢凍結時も含めて、DMSOに代わる毒性の低い凍結保護剤の使用¹²⁾や、耐凍性を向上させる方法¹³⁾も今後はOPU技術実用化に向けて検討すべきと考える。

謝 辞

本研究を共同して実施していただいた、琉球大学農学部家畜繁殖学研究室の皆様へ深謝いたします。また、卵巣採取に協力していただきました株式会社沖縄県食肉センター職員の皆様に感謝申し上げます。

VI 引用文献

- 1) 坂口慎一・井口光国・小林直彦・藤谷泰裕・三溝成樹・内海恭三(1995)超音波診断装置を利用した繁殖不適和牛からの連続経膈採卵, 日本胚移植学会雑誌, **17**, 94-101
- 2) 今井敬・田川真人(2006)OPU-IVFによるウシ胚の作出, その効率と汎用性, 日本胚移植学会雑誌 **28**, 29-35
- 3) 秋山清・坂上信忠・仲澤慶紀(2009)経膈採卵と体外受精による牛胚の生産, 神奈川県畜産技術センター研究報告 **2**, 1-5
- 4) Iwasaki S. et al(1990)Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized in vitro and in vivo, *J. Reprod. Fertil*, **90**, 279-284
- 5) Pollard J. W. and S. P. Leibo(1994)Chilling sensitivity of mammalian embryos, *Theriogenology*, **41**, 101-106
- 6) 黒澤功(1993)牛の改良を目的とした体外受精, 群馬農業研究 C 畜産, **10**, 151-154
- 7) M. Sabés-Alsina, M. Wallgren, Y.C.B. Sjunnesson, T. Ntallaris, N. Lundeheim, M. López-Béjar, J.M. Morrell(2020)Effect of season on the in vitro fertilizing ability of frozen-thawed Spanish bovine spermatozoa, *Journal of Dairy Science*, **103**, 9525-9533
- 8) 高橋芳幸(1995)日本胚移植学会誌, **17**(1), 38-42
- 9) Satoshi Sugimura, Tomonori Akai, Yutaka Hashiyada, Tama's Somfai, Yasushi Inaba, Muneyuki Hirayama, Tadayuki Yamanouchi, Hideo Matsuda, Shuji Kobayashi, Yoshio Aikawa, Masaki Ohtake, Eiji Kobayashi, Kazuyuki Konishi, Kei Imai(2012)Promising System for Selecting Healthy In Vitro-Fertilized Embryos in Cattle, *PLoS One*, **7**(5), e36627
- 10) 中橋冬陽・小林大誠・山下秀幸(2019)ウシ体外受精胚生産における高品質胚の簡易判別技術の開発と培養液の改善, 千葉県畜産総合研究センター研究報告, **19**, 1-6
- 11) Monica C Wusteman, David E Pegg, Martin P Robinson, Li-Hong Wang(2002) Vitrification media: toxicity, permeability, and dielectric properties, *Cryobiology*, **44**(1), 24-37.
- 12) 堂地修, 今井敬(2016)エチレングリコールを用いた牛胚のダイレクト法の技術開発, 日本胚移植学雑誌, **38**(1), 23-27
- 13) 中橋冬陽・小林大誠・山下秀幸(2019) ウシ体外受精胚生産における高品質胚の簡易判別技術の開発と培養液の改善, 千葉県畜産総合研究センター研究報告, **19**, 1-6
- 14) ソムファイ タマス(2018)高受胎率が望める牛受精卵の体外生産・凍結保存・選抜技術の開発,
http://www.naro.affrc.go.jp/project/research_activities/laboratory/nilgs/045310.html

研究補助：仲程正巳