

OPU技術による体外受精卵の生産効率向上

川野辺章夫、星一美、大島藤太、稲葉浩子、新楽和孝、玉野慎也¹⁾、横尾圭一²⁾
1)玉野アニマルクリニック、2) 横尾家畜診療所

要 約

遺伝的能力に優れた乳用牛（優良牛）で、繁殖障害や体内胚生産性の極めて低い個体（繁殖障害牛）を対象に、OPU 前処置の FSH 投与が、採取される卵丘卵子複合体(COC)の品質、OPU-IVF 胚の発生及び受胎率に及ぼす影響について検討した。

採取された COC 数(個/頭)は、無処理:10.9、低単位 FSH 処理:16.0、卵胞刺激処理:17.0 で、卵胞刺激処理で増加する傾向があった (p<0.05)。COC 品質の G1 数(個/頭)は、無処理:2.7、低単位 FSH 処理:5.6、卵胞刺激処理:10.8 で、卵胞刺激処理により品質の高い COC が有意に増加した(p<0.01)。

胚盤胞の平均発生数(個/頭、発生率)は、無処理:2.1(19.7%)、低単位 FSH 処理:2.3(23.4%)、卵胞刺激処理:5.0(33.7%)で、卵胞刺激処理で有意に増加した(p<0.01)。

繁殖障害牛の臨床繁殖診断による症例別では、慢性的な卵巣嚢腫、卵胞発育障害の個体からは、どの前処置方法においても胚盤胞は得られなかった。

OPU-IVF 胚の新鮮胚移植成績は、無処理:4/13 頭(受胎率 30.8%)、卵胞刺激処理:15/26 頭(受胎率 57.7%)で、繁殖障害牛を対象とした OPU-IVF において、卵胞刺激処理を施すことにより、OPU-IVF 胚の生産効率及び受胎率を向上させることが示唆された。

目 的

遺伝的能力に優れた乳用牛（優良牛）を受精卵移植技術により効率的に増殖することは、牛群の生産性を飛躍的に向上させる有効な手段である。

しかしながら、生産現場においては、優良牛、特に高泌乳牛の繁殖障害や体内胚生産性の極めて低い個体（繁殖障害牛）が数多く存在し、優良牛の効率的増殖を阻害している。

このような現状から、繁殖障害牛の胚生産に有効とされる生体卵子吸引・体外受精技術(OPU-IVF)を活用した優良牛増殖技術の確立が期待されている。そこで、繁殖障害や体内胚生産が困難となった優良牛を対象とし、より効率的な OPU-IVF 胚の作出を目的に、OPU 前処置の FSH 投与が、採取される卵丘卵子複合体(COC)の品質、OPU-IVF 胚の発生及び受胎率に及ぼす影響について検討した。

材料及び方法

1. 供試牛：ホルスタイン種経産牛 29 頭（栃木県畜産酪農研究センター17 頭、栃木県内酪農家 12 頭）、（搾乳牛 5 頭、乾乳牛 24 頭）、延べ OPU 実施 57 回

(1) 繁殖障害の状況：年齢 6 才～12 才、長期不受胎(空胎期間 300 日～6 年間)、過去 2～3 回の過剰排卵処理による体内胚生産成績において正常胚数 1 個以下、正常胚率 5%以下

(2) 臨床繁殖診断所見

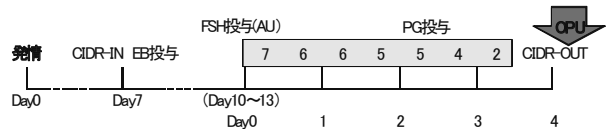
慢性的な卵巣嚢腫（卵胞及び黄体嚢腫）4 頭、卵胞発育障害（卵巣委縮及び静止）5 頭、生殖器の癒着（子宮・卵巣及び卵管采、子宮頸管）2 頭、原因不明（生殖器及び卵巣機能に異常なし）18 頭

2. 前処置方法（図 1）

●低単位FSH（10 AU） 第1卵胞波でOPU



●卵胞刺激処置(35 AU) 過剰排卵処理でOPU



(1) 無処理：発情周期の任意の時期（発情期を除く）に OPU を実施した。

(2) 低単位 FSH 処理：CIDR 留置、EB（安息香酸エストラジール）0.5ml を投与し、7 日後に CIDR 除去、PG（クロプロス

テノール or プロスタバット) 2ml 投与による発情誘起、あるいは自然発情の個体を供試し、発情開始から 48 時間後に FSH(アトリン R・10) 10AU を 1 回投与、FSH 投与後 48 時間後の第 1 卵胞波の時期に OPU を実施した。

(3) 卵胞刺激処理：上記同様に発情誘起あるいは自然発情の個体を供試し、発情日から 7 日目に CIDR 留置、EB0. 75ml 投与し、11 日目から FSH35AU を 4 日間にわたり漸減投与、FSH 投与開始 3 日目に PG3ml 投与、PG 投与 48 時間後に CIDR を除去して OPU を実施した。

3. OPU-IVF 方法

OPU は、ウシ生体卵子吸引・体外受精マニュアル(独家畜改良センター)に基づき実施し、採取された COC を形態に基づき Grade1~6 の 6 段階に分類した。

IVF は、卵子成熟培養:IVMD-101、媒精:IVF-100、発生培養(低酸素):IVD-101 により、「エンブリオパック」非共培養を用いた牛体外受精胚の作成(株機能性ペプチド研究所)に基づき実施、媒精後 7~8 日目の胚盤胞への発生を調査した。

結果及び考察

1. 卵胞数

OPU 実施時の超音波画像検査による卵胞の所見を表 1 及び図 2 に示した。大型卵胞数(個/頭)は、無処理:1.1±1.0、低単位 FSH 処理:2.0±1.3、卵胞刺激処理:4.6±4.4 で、卵胞刺激処理で増加する傾向があった(p<0.01)。中型卵胞数は、無処理:7.2±3.2、低単位 FSH 処理:17.3±11.4、卵胞刺激処理:25.3±15.6 で、卵胞刺激処理で増加する傾向があった(p<0.01)。小型卵胞数は、無処理:12.4±6.2、低単位 FSH 処理:15.6±14.5、卵胞刺激処理:5.3±4.2 で、卵胞刺激処理で減少する傾向があった(p<0.01)。卵胞総数は、無処理:20.8±9.2、低単位 FSH 処理:34.9±16.9、卵胞刺激処理:35.2±18.6 で、卵胞刺激処理で増加する傾向があった(p<0.05)。

表 1 OPU時の卵胞数

(単位:個/頭)

前処置	大型卵胞 (割合%)	中型卵胞 (割合%)	小型卵胞 (割合%)	合計
無処理 (n=27)	1.1±1.0 B (6.2%)	7.2±3.2 B (34.6%)	12.4±6.2 B (58.8%)	20.8±9.2 b
低単位FSH (n=7)	2.0±1.3 (9.0%)	17.3±11.4 (49.8%)	15.6±14.5 (41.2%)	34.9±16.9
卵胞刺激処置 (n=23)	4.6±4.4 A (15.3%)	25.3±15.6 A (69.9%)	5.3±4.2 A (20.4%)	35.2±18.6 a

2. 採取 COC の品質

採取した COC の品質について表 2 及び図 3 に示した。採取した COC 数(個/頭)は、無処理:10.9±8.2、低単位 FSH 処理:16.0±10.6、卵胞刺激処理:17.0±9.6 で、卵胞刺激処理で増加する傾向があった(p<0.05)。品質の高い G1 数は、無処理:2.7、低単位 FSH 処理:5.6、卵胞刺激処理:10.8 で、卵胞刺激処理により品質の高い COC が有意に増加した(p<0.01)。品質の低い G6 数は、無処理:2.2、低単位 FSH 処理:0.6、卵胞刺激処理:0.3 で、卵胞刺激処理で減少する傾向があった(p<0.05)。

表 2 COCの品質

前処置	採取COC数	G1	G2	G3	G4	G5	G6
		(割合%)					
無処理 (n=27)	10.9 b	2.7 B 19.4%	2.0 17.5%	2.1 17.4%	0.9 6.6%	1.1 14.4%	2.2 b 25.9%
低単位FSH (n=7)	16.0	5.6 35.8%	3.7 32.1%	4.7 24.9%	1.3 4.8%	0.3 1.2%	0.6 6.0%
卵胞刺激処置 (n=23)	17.0 a	10.8 A 62.1%	3.1 20.4%	1.4 8.5%	0.8 4.5%	0.4 2.5%	0.3 a 2.3%

3. OPU-IVF 成績

OPU-IVF 成績を表 3 に示した。

培養可能 COC 数(個/頭)は、無処理:7.6±7.1、低単位 FSH 処理:14.3±9.0、卵胞刺激処理:15.3±9.1 で、卵胞刺激処理により増加する傾向にあった(p<0.05)。卵割数(個/頭、卵割率)は、無処理:4.8±5.5(57.4%)、低単位 FSH 処理:6.9±5.1(42.6%)、卵胞刺激処理:8.7±4.9(58.0%) で、卵胞刺激処理により増加する傾向はあったが、有意差は認められなかった。

表 3 OPU-IVF成績

(単位:個/頭)

前処置	培養COC数	卵割数 (卵割率)	胚盤胞数 (発生率)
無処理 (n=27)	7.6±7.1 b	4.8±5.5 57.4%	2.1±2.8 B 19.7%
低単位FSH (n=7)	14.3±9.0	6.9±5.1 42.6%	2.3±2.8 23.4%
卵胞刺激処置 (n=23)	15.3±9.1 a	8.7±4.9 58.0%	5.0±3.8 A 33.7%

胚盤胞の平均発生数(個/頭、発生率)は、無処理:2.1±2.8 (19.7%)、低単位FSH処理:2.3±2.8 (23.4%)、卵胞刺激処理:5.0±3.8 (33.7%)で、卵胞刺激処理により有意に増加した(p<0.01)。

これらのことから、繁殖障害牛を対象とした OPU-IVF において、卵胞刺激処理を施すことにより、OPU-IVF 胚の生産効率を向上させることが示唆された。

4. 繁殖障害症例別の胚盤胞発生

繁殖障害牛の臨床繁殖診断による症例別胚盤胞発生数を表4に示した。慢性的な卵巣嚢腫、卵胞発育障害の個体9頭からは、どの前処置方法においても胚盤胞は得られなかった。生殖器の癒着2頭(n=4)における胚盤胞発生数(個/頭、発生率)は、無処理:3.5(28.5%)、卵胞刺激処理:5.0(38.3%)、合計:4.3(28.7%)であった。原因不明18頭(n=43)における胚盤胞発生数(個/頭、発生率)は、無処理:2.5(23.7%)、低単位FSH処理:2.7(27.2%)、卵胞刺激処理:5.1(35.7%)、合計:4.0(30.2%)であり、卵胞刺激処理により増加する傾向はあったが、有意差は認められなかった。

表4 繁殖障害症例別の胚盤胞発生

(単位:個/頭)

症例	無処理	低単位FSH (発生率)	卵胞刺激処理	合計
慢性卵巣嚢腫 (4頭)	0 (n=2)	—	0 (n=2)	0 (n=4)
卵胞発育障害 (5頭)	0 (n=3)	0 (n=1)	0 (n=2)	0 (n=6)
生殖器の癒着 (2頭)	3.5 (28.5%) (n=2)	—	5.0 (38.3%) (n=2)	4.3 (28.7%) (n=4)
原因不明 (18頭)	2.5 (23.7%) (n=20)	2.7 (27.2%) (n=6)	5.1 (35.7%) (n=17)	4.0 (30.2%) (n=43)

5. OPU-IVF 胚移植成績

OPU-IVF 胚の新鮮胚移植成績を表5に示した。無処理:4/13頭(受胎率30.8%)、卵胞刺激処理:15/26頭(受胎率57.7%)であり、卵胞刺激処理で受胎率が高くなる傾向があったことから、卵胞刺激処理を施すことにより、受胎率を向上させる可能性が示唆された。

表5 OPU-IVF胚移植成績(新鮮胚1胚移植)

前処置	受胎頭数/移植頭数(受胎率)
無処理	4/13頭 (30.8%)
低単位FSH	—
卵胞刺激処置	15/26頭 (57.7%)

(単位:個/頭)

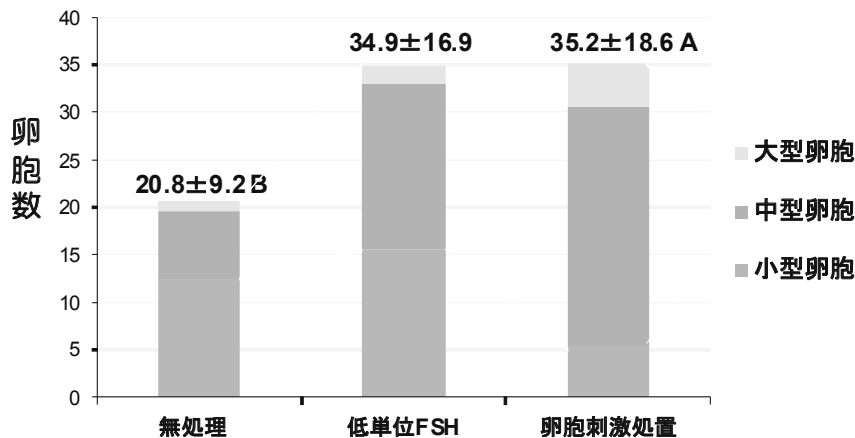


図2. 採取COC数

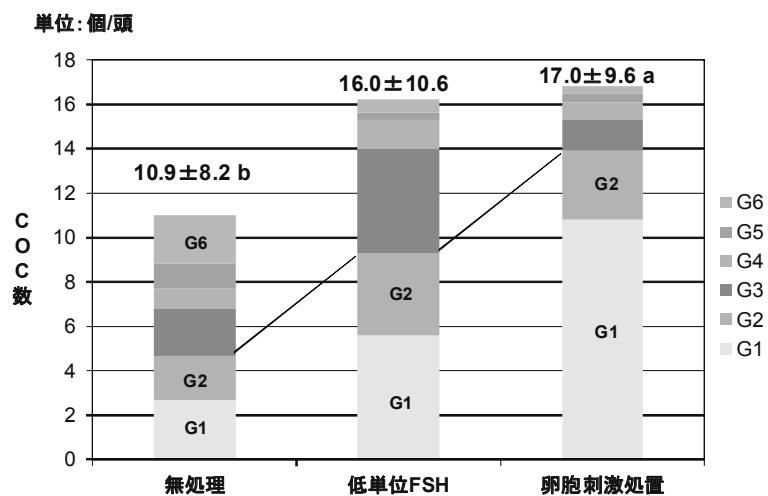


図3. 採取COCの品質

参考文献

- 1) Imai K *et al.* Reprod. Fert. Dev. , Vol. 20(1) : 182(2008).
- 2) 大竹正樹ら、第24回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会、要旨 p50-51(2009)
- 3) 今井敬、第26回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会、シンポジウム要旨 p20-21(2011)
- 4) 及川俊徳ら、第26回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会、要旨 p36-37(2011)
- 5) 川野辺章夫ら、第27回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会、要旨 p62-63(2012)