

## 【研究紹介】

## 畜産試験場における 経膣採卵—体外受精 (OPU-IVF) 技術の導入とその活用

吉野 仁美

北海道立総合研究機構畜産試験場 基盤研究部生物学グループ (〒081-0038 上川郡新得町字新得西5線39番地1)

## はじめに

北海道立総合研究機構畜産試験場生物学グループは、家畜繁殖およびゲノム育種の分野で研究を進めている。特に、近年では増頭手段としての受精卵の供給増加を目標とした研究に取り組んでいる。

近年の道内黒毛和種繁殖雌牛の減少により、市場での素牛価格は高止まり状態にあり、増頭のための黒毛和種受精卵の供給増加が強く求められている。日本ではこれまで受精卵作成技術の主流は過剰排卵処置と人工授精により体内受精させ、子宮内灌流によって回収するものであった。しかしここ数年経膣採卵 (Ovum Pick Up : OPU) を実施する機関が急速に増加しつつある。また米国やブラジル等では移植胚の約4割がOPU-体外受精 (In-Vitro Fertilization : IVF) により作成した体外受精卵となっている<sup>[1]</sup>。その要因としては、OPUによる卵子回収は週に2回の頻度でも可能であること、妊娠牛や初回発情前の育成牛など発情周期が定期的に回っていない牛に対しても利用可能であることなどから、過剰排卵処置—人工授精法と比較して汎用性が高く、効率の良い胚生産方法であることがあげられる<sup>[2]</sup>。

## OPU手順について

畜産試験場ではOPU技術を保有していなかったため、平成29年度に公益社団法人畜産技術協会が実施した畜産・酪農生産力強化対策事業 (平成28年度補正) によって貸与されたOPU機材を用いて、OPU技術の獲得を目指した。本文ではその経過および活用例、今後のOPU技術の改良に向けた研究について紹介する。

まず、基本的なOPU手順について紹介する。供試牛

を除糞、キシロカイン注射液2% (アストラゼネカ、大阪) にて尾椎硬膜外麻酔を実施後、外陰部を洗浄消毒して腔内に専用プローブ (本多電子、愛知) を挿入、直腸越しに卵巣を保持し、卵巣像を確認しながら、プローブ先端より採卵針 (ミサワ医科工業、茨城) を腔壁を穿孔して刺入し、卵胞内卵子を50 ml コニカルチューブ (CORNING, USA) に吸引採取する。卵子吸引は卵胞卵採取用吸引器 (富士平工業、東京) を用い、125~130 水銀柱ミリメートル (mmHg) (吸引量として18~22 ml /分) の吸引圧で行う。回収液は乳酸加リンゲル (扶桑薬品工業、大阪) に10単位/mlヘパリン (持田製薬、東京)、1%の子牛血清 (GIBCO, USA) および0.1%の抗生物質 (Meiji Seika ファルマ、東京) を加えたものを使用する。顕微鏡下で卵子を探索し、IVMD101 (機能性ペプチド研究所、山形) を用いて、22時間成熟培養する。体外受精にはIVF100 (機能性ペプチド研究所) を用い、手順については(独)家畜改良センター技術マニュアルに準ずる。発生培養は5%子牛血清添加CR1aaを用いて、個別培養ディッシュ (大日本印刷、東京) にて9日間培養する。なお、これら一連の技術は酪農学園大学農食環境学群循環農学類 動物生殖工学研究室の今井 敬教授にご教授頂いた。

卵子回収前に超音波画像にて計測した卵胞数の、約9割の卵子を回収できるようになるまでには約半年を要した。習得するうえで特に重要だと思ったポイントについて、僭越ながら以下にまとめたので、今後新たにOPUに取り組む獣医師の参考になれば幸いである。なお、筆者は新卒で採用された現在配属3年目の獣医師であり、大学時代に直腸検査技術はある程度習得していたことを参考までに申し添えておく。

連絡担当者：吉野 仁美 道総研畜産試験場 基盤研究部生物学グループ  
〒081-0038 上川郡新得町字新得西5線39番地1  
TEL : 0156-64-0617 FAX : 0156-64-3484 E-mail : yoshino-hitomi@hro.or.jp

開始時の牛への前処置で特に重要となってくるのは尾椎硬膜外麻酔である。筆者は黒毛和種牛を対象に普段OPUを行っているが、皮下脂肪が多い黒毛和種牛に対して、確実に硬膜外に麻酔を入れられるようになるまで、実はOPU習得までの時間と同程度に苦勞をした。麻酔が不十分なままOPUに供試すると、しっかりとした卵巣保持ができないのはもちろん、むりやり掴んで行うため、牛が痛がり動くためにうまくいかない原因となる。OPUでは一方の手でプローブを保持し、もう一方の手で卵巣を保持しているために術者の身体自由度が低い。そのため、牛にしっかりと局所麻酔をかけてから実施することが安全かつ確実にOPUを行ううえで大変重要である。

OPU時には、直腸内より卵巣を保持している手での細かな卵巣操作が必須である。超音波画面上の針の出る箇所（機種によってはガイドラインが示されているものもある）に、卵巣を回転させながら卵胞を近づけ、なるべく卵胞のみに針を刺すように強く意識することが重要である。卵巣を採卵針で串刺しにして遠くの卵胞内卵子を回収しようとする、回収液中に混入する血液量が多くなる。また、採卵針とコニカルチューブをつなぐチューブ内で血液が詰まってしまうリスクも高くなる。特に黄体周辺は血管が発達しているため、黄体を刺さないよう注意する必要がある。筆者はOPUを練習し始めて間もない時期に、卵巣をうまく回すことができずに腔のある黄体に針を貫通させ、その奥の卵胞内卵子を回収しようと試みたところ、黄体腔が画面上でどんどん広がってあせったことがあった。これは黄体で出血し、腔に血液が溜まっていったためと考えられる。このときは大事には至らなかったが、OPUは妊娠牛に対しても利用可能な技術であり、このようなことがあると流産を引き起こす可能性があるため特に注意が必要である。なお、卵巣を回す際には採卵針は腔部までしっかりと引っ込めておくことも重要である。採卵針の切れ味はかなり良いため、卵巣やその他臓器を傷つける原因になる。しかしながら、このとき、チューブ内の液が血液で固まっていない場合は針先は腔壁から抜かないようにしている。頻繁に針先を腔壁から抜いて作業をするとその都度腔壁を穿孔しなければならなくなり、牛が痛がり暴れ出すのが早くなる。

針の挿入方向に対して正面に指を置いて卵巣を保持し、針に押されても超音波画像がぶれないようにすることも重要である。始めた当時は指に針が刺さることを恐れてうまくできなかったが、これを習得後は針を押し進めて

も卵胞が画面上からずれて消えることがなくなった。結果、回収率もかなり上昇した。筆者が経過を思い起こして特にOPU初心者にとって大事であると感じたポイントは以上である。

## OPUを活用した事例

次にOPU技術習得後の畜産試験場内でOPUを活用した1事例について紹介する。畜産試験場には現在13歳齢の雌ヘレフォード種の牛が1頭飼養されている。遺伝資源保存が目的で飼養されているが、2年前より過剰排卵処理－人工授精法にて移植可能な体内受精卵が回収できなくなってきた。過剰排卵処理－人工授精法での採胚成績には牛の年齢が関与することが言われており、黒毛和種牛においては、11歳齢未満の牛を供胚牛とするのが良いという報告がある<sup>[3]</sup>。高齢牛では発情後の排卵時期が遅くなることも言われており、畜産試験場においてもこの牛では未受精卵の回収が目立ってきていた。そこで、昨年度より2カ月以上間隔を空けて3回、3種類のヘレフォード種精液をそれぞれ用いて、OPU-IVFによる体外受精卵の作成を試みたので報告する。なお、使用した精液はいずれも過剰排卵処理－人工授精法に使用した際には受精卵を回収できなかったものと同じロットの精液である。1回目はホルモン処理を行わずに任意の時期にOPUに供試し、これを無処理区とした。2回目はホルモン処理による卵胞品質および胚発生率の向上を目的に<sup>[4]</sup>、牛に前処理を行った。任意の時期にエストラジオール（エストラジオール注：共立製薬、東京）投与およびCIDR（ゾエティスジャパン、東京）を挿入し、Day 0とした。Day 4にFSH（アントリンR10・AI：共立製薬）を単回皮下投与、Day 6にPGF2 $\alpha$ （レジプロンC：あすか製薬、東京）を筋肉内投与し、Day 8でCIDR抜去およびOPUに供試した。FSH投与量はアントリンR10・AIの販売元である共立製薬が肉用牛の投与量として示している30アーマー単位（AU）を投与し30AU区とした。PGF2 $\alpha$ は黄体を退行させ、OPU時の作業効率を上げるために投与した。3回目は前処理を30AU区と同様に行い、FSH投与量については30AU区で卵胞発育が認められなかったため、乳用牛用として示されている40AU（40AU区）に変更した。その他の手順については前記したとおりである。発生培養8日目までに凍結可能胚（初期胚盤胞期胚以上）に発育したコード2（国際胚移植学会の定める品質基準に準ずる）以上の胚を、クライオトップ（KITAZATO、静岡）による超急速ガラス化保存法にて凍結保存した。

表1にOPU前に超音波検査にて確認した卵胞の大きさと卵胞数を示した。卵胞の区分は小卵胞：2～4mm、中卵胞：5～7mm、大卵胞：8mm以上とした。30AU区ではFSHによる卵胞発育効果は見られなかったが、40AU区では大卵胞の増加が確認できた。OPUで回収した卵子については坂口らの報告<sup>[5]</sup>に基づいて6段階評価にて品質評価を行なった(表2)。正常発育卵子はG1、G2とした。図1に回収卵子の品質割合を示した。30AU区において正常発育卵子であるG1、G2の割合が少なく、変性、退行卵子であるG5、G6の割合が多く含まれていた。ホルモン処理の効果が得られていないことに加え、任意の時期にOPUに供試していることから、OPU時の卵胞周期時期の影響によるものと考えられた。

表1. OPU前に計測した3試験区における大きさ別の卵胞数および黄体数

処理	大卵胞	中卵胞	小卵胞	黄体
	< 8 mm	5 - 7 mm	2 - 4 mm	
無処理区	1	2	30	2
30AU区*	1	2	18	2
40AU区*	4	1	30	1

\*FSHの投与量

表2. OPUによって得られた牛卵母細胞の形態的分類(品質)

分類	基準
G1	卵丘細胞が4層以上付着した卵子
G2	卵丘細胞が1～3層付着した卵子
G3	卵丘細胞の付着が1/3以下の卵子
G4	裸化卵子
G5	卵丘細胞がクモの巣状に膨化した卵子
G6	細胞質変性卵子

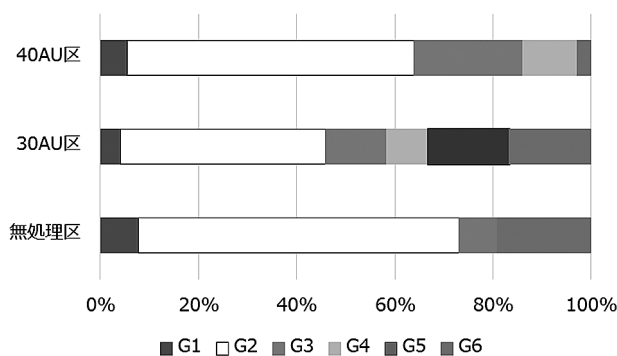


図1. 3試験区の回収卵子の品質

体外受精後の胚発生について表3に示した。無処理区において著しく分割率が低かった。体外受精では種雄牛の違いが受精率および発生率に及ぼす影響が大きいとされており<sup>[6]</sup>、精液による影響が考えられた。分割率(受

表3. 3試験区における回収卵子数と体外受精後の胚発生

処理	回収卵子数	分割胚 (%)	初期胚盤胞期以上の胚 (%)	凍結可能胚 (%)
無処理区	26	4 (15.4)	1 (3.8)	1 (3.8)
30AU区*	24	11 (45.8)	2 (8.3)	2 (8.3)
40AU区*	36	19 (52.8)	7 (19.4)	6 (16.7)
total	76	34 (39.5)	10 (11.6)	9 (10.5)

\*FSHの投与量

精率)が低かったため、その後の発生も低い割合で推移した。40AU区は3処理のなかで最も高い割合で移植可能胚が得られた。FSH投与量が十分であったので、卵胞発育が促されたことによるもの<sup>[1,7,8]</sup>と考えられた。今回の事例はそれぞれ1回のみ結果であり、かつ精液による影響を考慮していないため確かなことは言えないが、老齢牛においても適切なホルモン処理は卵胞発育を促進させ、移植可能胚の数を増やす効果があることが示唆された。

### 今後の展望

畜産試験場生物学グループで現在実施中の課題について紹介する。OPU-IVFの大きな課題として発生率が安定しないことがある<sup>[9]</sup>。今井らは、卵胞波の調節および卵胞発育処理を前処理として行うFollicle Growth Treatment (FGT)-OPU法(図2)により、高品質な卵子が得られ受精後の発生率も高くなると報告している<sup>[4]</sup>。我々は平成30～32年度経常研究において、黒毛和種牛を対象に、OPU法と比較してFGT-OPU法の利用が卵子品質および胚盤胞率の向上に効果的であることを検証すると共に、FGT-OPU法の簡易化を図る予定である。具体的には、昨年から販売されている共立製薬の「アントリンR10・A1」を用いて1回投与を行った場合に漸減投与でのFGT-OPU法と同等の効果が得られるのかを検証する。また、FGT-OPUプログラム内の主席卵胞の吸引除去について、エストラジオール投与での薬剤による除去に置き換えた場合の影響についても検証する。

体外受精時には使用する精液の違いも胚発生に大きく影響することが言われているが<sup>[6]</sup>、卵子側の品質を向上させることで、発生率を底上げできることが期待される。そこで、道内生産現場で実際に多く利用されている5種類程度の精液を用いて、使用精液の違いに関わらずFGT-OPU処理による効果が得られるのかを検討する。最終年度には作成した受精卵を用いての牛生産実証試験を行う。今後の研究の成果は随時公表予定であり、道内

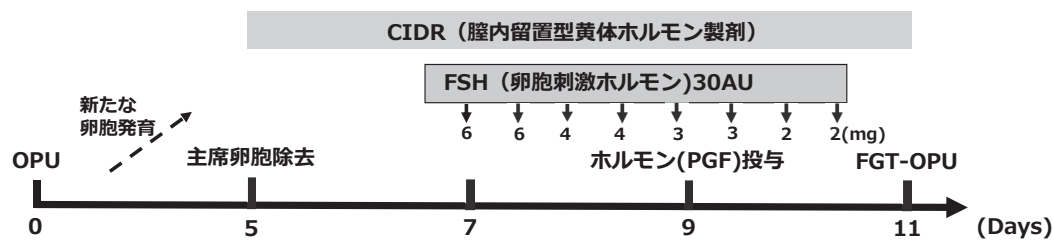


図2. FGT-OPU法

牛増頭対策の参考になれば幸いである。

## おわりに

本試験は公益社団法人畜産技術協会が実施する畜産・酪農生産力強化対策事業（平成28年度補正）の協力の下で遂行致しました。感謝申し上げます。また、この事業に伴い、畜産試験場では昨年度から年に1回の頻度で畜産技術協会が主催するOPU実務者技術研修を開催しています。昨年は平成29年12月21～22日に開催し、北海道・東北地方から8名の受講がありました。講師には酪農学園大学の今井 敬教授をお招きし、1日目は講義、体外受精研修、と畜場由来子宮を用いたOPU技術実習、2日目は生体を用いたOPU技術実習という日程で行いました。と畜場由来子宮を用いたOPU技術実習はわかりやすいと好評でした。

## 引用文献

- [1] 今井 敬：経膈採卵による胚生産技術の概要、臨床獣医、34(9)、12-17 (2016)
- [2] Imai K, Tagawa M, Yoshioka H, Matoba S, Narita M, Inaba Y, Aikawa Y, Ohtake M, Kobayashi S : The efficiency of embryo production by ovum pick-up and in vitro fertilization in cattle, J Reprod Dev, 52, S19-29 (2006)
- [3] 坂元克弥、村田宏之、山下秀幸、佐藤敦男、石田和昭：黒毛和種供胚牛の年齢と発情後7日目回収胚の発育ステージの関係、千葉県畜産総合研究センター研究報告、11、9-13 (2011)、(オンライン)、(<https://>

[www.pref.chiba.lg.jp/lab-chikusan/chikusan/kenkyuujuhou/documents/35p9.pdf](http://www.pref.chiba.lg.jp/lab-chikusan/chikusan/kenkyuujuhou/documents/35p9.pdf))

- [4] 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：卵胞波を調節した経膈採卵－体外受精による効率的な胚生産、日本胚移植学雑誌、36、109-114 (2015)
- [5] 坂口慎一、井口光国、小林直彦、藤谷泰裕、三浦成樹、内海恭三：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、日本胚移植学雑誌、17、94-101 (1995)
- [6] 岡本綾子、森本一隆、栗原昭宏、牛の体外受精技術－種雄牛による受精率および発生率の違い－、鳥取県畜産試験場試験研究結果報告、27、1-4 (1998)、(オンライン)、(<http://www.pref.tottori.lg.jp/secure/215264/27-1.pdf>)
- [7] 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, 48-53 (1994)
- [8] Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, Barnes F, Sirard MA: Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes, Biol Reprod, 66, 38-43 (2002)
- [9] 及川俊徳：超音波画像診断装置を用いた経膈採卵による体外受精胚の作出技術、臨床獣医、34(9)、18-22 (2016)