

氏 名(本籍) 塩 谷 康 生

学位の種類 博 士 (農 学)

学位記番号 農 第 4 0 1 号

学位授与年月日 平 成 2 年 10 月 18 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学位論文題目 体外受精を利用した子牛生産に関する研究

論文審査委員(主査) 教授 正 木 淳 二
教授 佐々木 康 之
教授 山 岸 敏 宏

論文内容要旨

本研究は、牛未成熟卵子を利用した体外受精で実証された子牛生産（花田ら、1986）を、現在行われている非手術的胚移植と組み合わせた畜産技術として確立させることを目標に、精子の処理から体外受精胚の利用まで追求した。すなわち、精子の受精能獲得誘起法として、牛凍結精子について、イオノフォア(A23187)処理と前培養処理の際の受精率を明らかにし、ヘパリン処理時のヘパリン濃度について検討し、効果的な方法を追求した。一方、卵子について卵丘細胞層との関連で発生能を検討するとともに、卵巢の採取法、性周期の時期別に分けた卵巢卵子の性状について明らかにした。さらに、体外受精後、牛子宮に非手術的に移植できる段階までの胚盤胞に発生させる方法について検討するとともに、得られた胚盤胞の正常性とその利用法を追求した。得られた結果は以下のとおりである。

1. 牛精子の受精能獲得処理

4頭の牛の射出凍結精子を用いて、体外で受精能を獲得させる処理を行い、体外成熟卵子に媒精し、受精率を調べることによってイオノフォア(A23187)処理の有効性を検討した。すなわち、牛血清アルブミンを除いた修正タイロード液（B0液、Brackett & Oliphant, 1975）にカフェインを10mM加えた液で精子を洗浄し、イオノフォア(A23187)を0.1 μ M, 1分間作用させ、牛血清アルブミンを20mg/mlに修正したB0液（BSA-B0液）で等量希釈して、媒精に用いた。一方、前培養法では洗浄後にイオノフォア(A23187)処理をせずに、BSA-B0液で等量希釈し、5時間前培養して媒精に用いた。4頭の種雄牛凍結精子において、イオノフォア(A23187)処理によって79～96%の精子侵入率が得られた。4頭のうち2頭は、前培養で83～92%の高い受精率が得られたが、2頭では14～33%と低い受精率であった。5時間の前培養法で80%以上の高い受精率を得るためには、5～8時間、卵子と精子を共培養することが好ましい。イオノフォア(A23187)処理法においては多くの精子で高い受精率が得られたが、精子の条件によって短時間で卵子に侵入する場合と、侵入に長時間要する場合があった（Table 1, 2, 3）。

3頭の牛凍結精子を、牛血清アルブミンを除いた修正タイロード液（B0液、Brackett & Oliphant, 1975）にカフェインを10mM加えた液で洗浄し、牛血清アルブミンを20mg/mlに修正したB0液にヘパリン（ノボヘパリン注）を1.25～5.0 μ l/ml加えた液で等量希釈後、15分後に媒精することによって、無添加区では35%と低い受精率の精子においても78～87

%の高い受精率が得られた。

牛体外受精においてはイオノフォア(A23187)処理、ヘパリン処理で高い受精率が得られるが、前培養法によっても高い受精率が得られる個体があることがわかった。高い受精率を得るためには、処理法と適当な媒精時間を設定することが重要である。

2. 牛未成熟卵子の採取と体外受精後の発生能

食肉処理場で集めた牛卵巣からの未成熟卵子の採取性と体外受精後の発生能について、性周期の時期との関連で検討した。76頭の牛について個体ごとに小卵胞から未成熟卵子を吸引採取した場合、1頭あたりの平均吸引数39.5個に対し、採取できた卵子は53.2%、さらに卵丘細胞層が付着し、体外受精に供試できた卵子は採取できた卵子の33.2%、1頭あたり7.0個であった。卵巣表面の小卵胞数は体外受精後の2~4細胞期胚への発生率には影響しなかった。149頭の牛卵巣について黄体の形状などから性周期を推定し、性周期ごとに卵巣を区分して吸引採取した場合、体外受精に用いることのできる卵子は1頭あたり5.5個で、新生黄体期、開花黄体期、退行黄体期、萎縮黄体期、嚢腫などの性周期の時期による差は明確ではなかった。どの時期の卵巣から得られた卵子も、家兎卵管に移植することによって胚盤胞へ発生した。

食肉処理場で集めた牛卵巣からは、性周期の時期と関係なく未成熟卵子が採取された。それを体外受精に用いることにより、胚盤胞へ発生することが明らかになった。

食肉処理場で集めた卵巣の小卵胞から未成熟卵子を吸引採取し、卵丘細胞層の付着状況によって区分し、体外成熟、体外受精後の発生率を調べた。実験には厚くかつ緊密な卵丘細胞層に囲まれたA型卵子、卵丘細胞層が薄くかつ剝離部分が多いB”型卵子、卵丘細胞層を欠くC型卵子を用いた。A型卵子、B”型卵子は成熟率がそれぞれ97.4、89.8%と高く、C型卵子の52.9%より高かった。A型卵子、B”型卵子の受精率もそれぞれ86.8、85.8%と高く、卵丘細胞層を欠くC型卵子は53.3%と低かった。A型卵子の63.7%は2細胞期以上に分割したが、B”型卵子は29.5%、C型卵子は17.7%と発生率が低かった(Table 4、5、6)。

以上の結果から、体外成熟、体外受精の実験においては、未成熟卵子を卵丘細胞層の付着状況によって区分することが重要と考えられた。

食肉処理場で処理される卵巣から未成熟卵子を採取するに際し、と畜直後に食肉処理場

において吸引採取し、39℃で培養しながら輸送した場合（と畜後、平均17分）と、38℃に温めた生理食塩水に卵巣を入れ、実験室に持ち帰って吸引採取した場合（と畜後、平均162分）について、体外成熟後の卵子の受精能やその後の発生能を検討した。体外成熟には吸引採取後の卵子を22時間培養し、体外受精には1頭の種雄牛の凍結精子を 12.5×10^6 /mlの濃度に調整して用いた。媒精60時間後に卵子の分割状況を検査し、8細胞期以上の胚を家兎卵管内で培養し、その後の胚盤胞への発生を調べた。食肉処理場採卵区の体外成熟卵の体外受精後の2細胞期以上への分割率は34.6%（465/1342）、実験室採卵区で30.6%（302/988）と食肉処理場採卵区で有意に高かった。8細胞期への発生は食肉処理場区で5.1%（69/1342）、実験室採卵区で5.2%（51/988）であった。家兎卵管に移植した8細胞期以上の胚のうち、食肉処理場区では56個中16（28.6%）個が胚盤胞へ発生したのに対し、実験室採卵区では回収卵42個中6個（14.3%）であった（Table 7,8）。

以上の結果から、未成熟卵子を採取して体外成熟、体外受精に用いる際には、2細胞期への発生率や胚盤胞への収量からみて、と畜後速やかに吸引採取して培養を開始することが望ましいことがわかった。

3. 体外受精卵の胚盤胞への発生条件

牛未成熟卵子を、TCM199に牛胎子血清を10%加えた培地で成熟培養後、受精能を獲得させた精子で媒精し、媒精6時間後に発生用培地に卵子を移して培養した。体外受精後の培養液としてHam's F10とTCM199を主体とする培地を用いて培養し、分割率および4細胞期胚への発生、さらに家兎卵管内での胚盤胞への発生について比較した。次いでTCM199で発生した4細胞期胚の家兎卵管への移植を媒精後40時間と50時間に行い、胚盤胞への発生を比較した。

実験1では体外受精後の培養液についてHEPES緩衝TCM199とHam's F10を主体とする培地について比較した。媒精40時間で発生率を検査し、この時点で偽妊娠家兎卵管に4細胞期胚を移植して5日後に回収し、胚盤胞への発生を調べた。TCM199では66.2%（307/464）が2細胞期以上に分割し、25.6%（119/464）が4細胞期に発生し、Ham's F10のそれぞれ43.5%（197/453）および17.7%（80/453）より有意に優れていた。TCM199およびHam's F10で発生した4細胞期胚は、家兎卵管内でそれぞれ49.3%（104/211）および44.0%（44/100）が胚盤胞に発生した。実験2ではTCM199を主体とする培地内で媒精後40時間培養し、発生した

4細胞期胚の半分はその時点で家兎卵管に移植し、残る半分はさらに10時間培養後家兎卵管に移植した。40時間で移植した場合は51.9%(14/27)が胚盤胞に発生したが、50時間の場合は16.7%(4/24)と有意に低下した(Table 9,10)。

これら媒精後40時間移植で得られた胚盤胞を凍結融解後移植した結果、14頭の受卵牛のうち6頭が受胎し、正常な子牛を7頭分娩した。

4. 子牛生産への応用

牛卵巣上の小卵胞を直径3mm以下と直径3～6mmに区分して未成熟卵子を採取し、25 mMol HEPES緩衝TCM199を主体とする培地で成熟させ、体外で受精能を獲得した精子を媒精した。媒精48時間で発生した4細胞期胚を家兎卵管に移植し、5日後に回収した。直径3～6mmの卵胞からは胚盤胞が得られなかったが、3mm以下の小卵胞から採取した92個中のうち5個が胚盤胞に発生した。このうち3個を1頭の受卵牛に移植した結果、3卵性の雌子牛が出生した。

体外受精によって作出した胚盤胞の利用法として、予め人工授精した受卵牛の黄体存在卵巣の反対側の子宮角に胚を移植し、肥育素牛用の双子を生産することを試みた。

家兎卵管内で発生した胚盤胞を8頭の受卵牛に移植した結果、6頭が受胎し、体外受精由来の3頭を含む7頭の子牛が生産された(Table 11)。体外培養によって発生させた胚盤胞を5頭の受卵牛に移植した結果、3頭が受胎し、体外受精由来の2頭を含む5頭の子牛が生産された(Table 12)。

以上の結果から、体外受精による胚盤胞を予め授精しておいた受卵牛に移植することによって、肥育用素牛の子牛生産に利用できることが明らかになった。

Table 1

In vitro fertilization rate of frozen bovine sperm treated by ionophore(A23187) and pre-incubation.

Bull	Sperm treatment			
	Pre-incubation		Ionophore	
	Penetration rate (penetrated/examined)	Poly*	Penetration rate (penetrated/examined)	Poly*
Tochh	83.3 (20/24)	2(10.0)	79.2 (19/24)	0
Satu	92.3 (24/26)	3(12.5)	95.5 (21/22)	3(14.3)
Yama	33.3 (8/24)	0	90.9 (20/22)	10(50.0)
Oo	14.3 (4/28)	0	87.5 (14/16)	11(78.6)

*:Polyspermy.

Table 2

Effect of sperm-oocyte co-culture period on in vitro fertilization rate of frozen bovine sperm treated by pre-incubation.

Bull	Fertilization rate (penetrated/examined)			
	Tochh		Satu	
Sperm concentration	18.75×10^6	12.5×10^6	18.75×10^6	12.5×10^6 /ml
Sperm-oocyte co-culture(hr)				
4	61.5(8/13)	68.4(13/19)	93.3(14/15)	23.1(3/13)
5	64.0(16/25)	55.6(15/27)	80.0(12/15)	85.7(12/14)
6	85.7(18/21)	52.2(12/23)	94.4(17/18)	60.0(9/15)
8	84.6(11/13)	82.4(28/34)	84.2(16/19)	89.5(17/19)
17	95.2(20/21)	85.3(29/34)	--	100.0(14/14)

Table 3

Effect of sperm-oocyte co-culture period on in vitro fertilization rate of frozen bovine sperm treated by ionophore(A23187).

Bull	Fertilization rate (penetrated/examined)			
	Tochh	Satu	Oo	Yama
Sperm concentration	12.5×10^6	18.75×10^6	18.75×10^6	12.5×10^6
Sperm-oocyte co-culture(hr)				
4	53.3(16/30)	3.6(1/28)	93.8(15/16)	42.9(6/14)
5	72.4(21/29)	0.0(0/21)	82.4(14/17)	63.6(7/11)
6	89.7(26/29)	8.7(2/23)	91.7(11/12)	90.0(9/10)
8	89.5(17/19)	23.8(5/21)	100.0(16/16)	91.7(11/12)
17	--	83.3(25/30)	--	92.3(12/13)
				92.3(12/13)
				86.7(13/15)
				93.3(14/15)
				100.0(17/17)
				100.0(16/16)
				77.8(14/18)

Table 4

In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes classified by cumulus cells.

	Class A	Class B''	Class C (naked)
No. of oocytes :A	39	118	85
Matured(unfertilized):B	5	15	21
Matured(fertilized) :C	33	91	24
Immature	0	8	21
Abnormal-degenerated	1	4	19
Rate of maturation:(B+C)/A	97.4% ^a	89.8% ^a	52.9% ^b
Fertilization rate:C/(B+C)	86.8% ^a	85.8% ^a	53.3% ^b

a, b : Figures within a line having different superscripts are significantly different(P<0.01).

Table 5

Examination of in vitro fertilization of bovine oocytes classified by cumulus cells.

	Class A	Class B''	Class C (naked)
Fertilized oocytes	33	91	24
Normal fertilization	29(87.9%) ^a	65(71.4%) ^a	7(29.2%) ^b
Polyspermy	4(12.1%)	13(14.3%)	0
Delayed male pronucleus	0	10(11.0%) ^a	16(66.7%) ^b
Both pronuclei delayed	0	0	1(4.2%)
Digny	0	3(3.3%)	0

a, b: Figures within the same line having different superscripts are significantly different(P<0.01).

Table 6

Cleavage capability of in vitro fertilized bovine oocytes classified by cumulus cells.

	Eggs cleaved/Oocytes cultured(%)
Class A	232/364(63.7%) ^a
Class B''	36/122(29.5%) ^b
Class C(naked)	28/158(17.7%) ^{b, c}

Figures with superscripts a, b (P<0.01) and b, c (P<0.05) are significantly different.

Table 7

In vitro development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro.

Oocyte aspiration	Trial	No. of oocytes	No. of cleaved * (% of cleaved)		No. of 8-cell stage (% of 8-cell stage)	
Slaughter-house	1	359	125	(34.8%)	14	(3.9%)
	2	260	99	(38.1%)	21	(8.1%)
	3	192	54	(28.1%)	6	(3.1%)
	4	271	112	(41.3%)	18	(6.6%)
	5	260	75	(28.8%)	10	(3.8%)
	Total	1342	465	(34.6%) ^a	69	(5.1%)
Laboratory	1	130	42	(32.2%)	4	(3.1%)
	2	335	118	(35.2%)	24	(7.2%)
	3	226	65	(28.8%)	9	(4.0%)
	4	120	22	(18.3%)	4	(3.3%)
	5	177	55	(31.1%)	10	(5.6%)
	Total	988	302	(30.6%) ^b	51	(5.2%)

*: Oocytes were examined under dissecting stereoscope after 60hrs of insemination by removing the cumulus cells.

a-b: Significant difference by χ^2 -test, $P < 0.05$.

Table 8

Development of 8-cell bovine embryos obtained after 60hrs of in vitro insemination and transferred to the rabbit oviduct during 5 days.

Oocyte aspiration	Trial	No. of embryos		Recovery rate	No. of blastocyst
		transferred	recovered		
Slaughter-house	1	14	7	50.0%	3
	2	21	19	90.5%	6
	3	6	6	100.0%	2
	4	18	16	88.9%	1
	5	10	8	80.0%	4
	Total	69	56	81.2%	16(28.6%)
Laboratory	1	4	4	100.0%	1
	2	24	24	100.0%	4
	3	9	5	55.6%	0
	4	4	1	25.0%	0
	5	10	8	80.0%	1
	Total	51	42	82.4%	6(14.3%)

Table 9

Fertilization and cleavage rate of in vitro matured and fertilized oocytes, cultured in TCM 199 supplemented with 10% fetal calf serum by 40 hours post-insemination in Exp. 2.

Trial	Fertilization rate*	40 hrs post-insemination	
		Cleaved	4-cell
1	12/12	35/60 (58.3%)	10(16.7%)
2	8/11(2)**	55/93 (59.1%)	10(10.8%)
3	9/11(1)	74/120(61.7%)	17(14.2%)
4	8/11(1)	83/133(62.4%)	22(16.5%)
Total		247/406(60.8%)	59(14.5%)

* : No. of oocytes penetrated/ Total no. of oocytes examined.

** (): No. of oocytes penetrated by more than one spermatozoa.

Cleaved : Embryos developed over 2-cell stage/Total no. of oocytes examined.

Table 10

Influence of the time of transfer of 4-cell embryos (developed by 40 hours post-insemination), to rabbit oviducts on the development to blastocyst.

Time of ET	Trial	Recovered/ET	Blastocyst.
40 hrs post-insemi.	1	4/5	2
	2	4/5	2
	3	8/9	4
	4	11/11	6
	Total	27/30(90.0%)	14(51.9%a)
50 hrs post-insem.	1	3/5	0
	2	5/5	0
	3	6/8	1
	4	10/11	3
	Total	24/29(82.8%)	4(16.7%b)

a-b: Significant difference by χ^2 -test, $P < 0.05$.

Table 11

Transfer result of bovine blastocyst derived from, in vitro fertilization of in vitro matured oocytes cultured in rabbit oviducts.

Recipient	Days after estrus	No. of bl. transferred	Fresh or frozen	Stage* (days)	Result**
263	8	2	Fresh	8	AI-calf
245	8	2	Fresh	8	AI-calf
261	7	2	Fresh	8	IVF-F, 51kg
908	8	1	Fresh	9	---
247	7	3	Frozen	8	IVF-M, 32kg AI-calf
275	7	3	Frozen	8	AI-calf
274	7	3	Frozen	8	IVF-M, 41kg
285	6	2	Frozen	8	--

*:days, insemination in vitro=1-day.

** :AI-calf, calf from artificial insemination.

IVF-F,M, female or male calf from transfer of in vitro fertilized oocyte and the figure is the birth weight.

All recipients were artificially inseminated beforehand.

bl.:Blastocysts.

Table 12

Transfer result of bovine blastocyst derived from in vitro fertilization of in vitro matured oocytes

Recipient	Days after estrus	No. of bl. transferred	Culture days*	Result**
328	8	1	9	IVF-M, 27kg & AI-calf
260	7	2	8	IVF-M, 40kg & AI-calf
264	6	2	8	--
330	8	2	7	--
327	8	2	7	AI-calf

*:days, insemination in vitro=1-day.

** :AI-calf, calf from artificial insemination.

IVF-M, male calf from transfer of in vitro fertilized oocyte and the figure is the birth weight.

All recipients were artificially inseminated beforehand.

bl.:Blastocysts.

審査結果の要旨

本研究は牛の未成熟卵子利用による体外受精を実際の子牛生産に結びつけるために行ったもので、技術の確立を主目的とした。このため、精子の前処理から体外受精後の胚の処理に至るまでの操作上の問題点を追及し、以下の諸点を明らかにした。

体外における牛精子の受精能獲得処理法としてイオノフォア（A23187）処理、前培養、ヘパリン処理の各効果を比較した。凍結保存した射出精子で検討した結果、イオノフォア処理およびヘパリン処理では一様に高受精率が得られたが、これらを加えない前培養法によっても高受精率をあげることのできる精子提供個体の存在が見いだされた。

食肉処理場で集めた牛卵巢を原材料とし、未成熟卵子の採取条件と体外受精後の発生能をしらべた。その結果、体外受精の可能な卵子は性周期の時期に関係なく採取できること、未成熟卵子は卵丘細胞層の付着状況によって区分する必要があること、屠殺後はできるだけ早く吸引採取して培養を開始する必要があることを明らかにした。

採取した牛成熟卵子を成熟培養後、体外受精に供して発生用培地に移し、胚盤胞への発生条件を検討した。その結果、TCM199主体とする発生用培地で40時間培養して得られた胚盤胞については、凍結融解後の移植によっても実用可能なレベルの妊娠率が得られ、正常な子牛が生産され得ることを実証した。これらの操作を組み合わせることにより、双子や三つ子の生産も不可能でないことを示した。また、体外受精によって作出した胚盤胞を予め人工受精した受卵牛の黄体存在卵巢の反対側子宮角に移植することにより、安価な肥育素牛の生産に利用できることを明らかにした。

以上、本論文は、牛の未成熟卵子を利用した体外受精技術が子牛生産に活用され得ることを明示したものであり、著者は農学博士の学位を授与されるに値すると判定した。