

[ 研究区分： 域課題解決研究 ]

研究テーマ： 優良な高泌乳牛の効率的な増産に関する研究：性判別精子を用いて雌胚を高率に作出できる新規な体外成熟技術の開発	
研究代表者： 生命環境学部 生命科学科 教授・堀内 俊孝	連絡先： toshi@pu-hiroshima.ac.jp
共同研究者： 助教・大田毅， 部長 山田 博道， 副主任研究員 日高 健雅， 研究員 松雪 暁子 (広島県立総合技術研究所 畜産技術センター)	
<b>【研究概要】</b> 高泌乳牛から経膈採卵 (OPU) により採取された未成熟卵子は，体外成熟 (IVM)・体外受精 (IVF)・胚移植 (ET) により子牛に発育する。しかし，IVM 卵子の発生能は低く，改善が望まれている。昨年度の和牛 OPU 卵子の研究では，IVM 培地への 10 $\mu$ M ジブチリル cAMP (dbcAMP) 添加は IVM 卵子の発生能を高め，受胎率を増加させた。本年度の泌乳期乳牛 OPU 卵子の研究では，IVM 培地への 25 $\mu$ M dbcAMP 添加は胚盤胞率を高めることを明らかにした。さらに，乳牛の性判別精子液を用いた効率的な体外受精と顕微授精による胚生産を確立した。	

### 【研究内容・成果】

(背景と目的)

乳牛から経膈採卵 (OPU) によって未成熟卵子を採取することが可能である。乳牛は，分娩後，約 10 ヶ月間は搾乳が行われ，搾乳後，約 2~3 ヶ月には人工授精により妊娠させることで，次回の泌乳の準備に入る。そのため，分娩後の数ヶ月の期間に OPU が行われることが多い。しかし，泌乳中に得られた未成熟卵子の体外成熟 (IVM) 後の発生能は著しく低く，IVM 技術の改善が必要である。さらに，乳牛では，後継牛となるのは雌牛のみであるため，性判別精子の効率的な利用による雌胚生産の確立が実用的である。

(実験計画)

平成 23 年度の和牛 OPU 卵子の IVM 研究から「低濃度 (10  $\mu$ M) dbcAMP の IVM 培地への添加により IVM 卵子の発生能は高まること」が明らかとなった。そこで，本年度は泌乳期乳牛から採取した未成熟卵子の IVM 培地への dbcAMP 添加が IVM 卵子の発生能に及ぼす影響を調べた。さらに，IVM 前処理として，フォルスコリン (FSK) と IBMX による cAMP 増加処理が IVM 卵子の発生能に及ぼす影響を調べた。

乳牛においては，性判別精子を使用することで，雌胚を作出できる。しかし，性判別精子の精液ストローの精子液量は少なく，運動精子の割合も低いため，効率的に体外受精 (IVF) や顕微授精 (ICSI) を行うため，微量精子液から運動精子を分離する方法を検討した。

(研究成果)

① 泌乳期 (分娩後 100 日まで) ホルスタイン種乳牛から OPU によって採取した未成熟卵子の IVM を行った。IVM 培地への 0, 10, 25  $\mu$ M dbcAMP を添加した IVM 卵子の IVF 後の卵割率は各 74.1%，64.5%，62.2% となり，有意な差はなかった。胚盤胞率は各 6.6%，11.0%，23.3% となり (図 1)，IVM 培地への 25  $\mu$ M dbcAMP 添加によって IVM 卵子の胚発生率は有意に増加した。

昨年度の和牛の OPU 卵子の IVM と異なり，対照区となる dbcAMP 無添加での胚盤胞率が低く，泌乳期での搾乳は腔形成時の卵子に何らかの影響があると考えられた。25  $\mu$ M の dbcAMP で IVM 卵子の発生能が改善されたことは，泌乳期乳牛では，卵丘細胞・卵子複合体 (COCs) の cAMP の基本量が低下しているのかもしれない。COCs の cAMP 濃度と IVM 卵子の発生能の関連性を明らかにすることが必要である。今回の結果から，品種や生理的

な条件により IVM 培地に添加する dbcAMP 濃度が異なることを示唆した。

- ② IVM 前処理として、未成熟卵子を 100  $\mu$ M FSK+100  $\mu$ M IBMX で 2 時間培養した。この実験では、と場卵巢からの未成熟卵子を使用した。FSK+IBMX の 2 時間培養の間、卵核胞崩壊 (GVBD) は抑制された。IVM は 10  $\mu$ M dbcAMP 添加で実施した。IVM 卵子は、IVF または ICSI によって受精させ、卵割率と胚盤胞への発生率を調べた。

IVF では、無処理区と FSK+IBMX 処理区の卵割率は各 80.3%、70.6% となり、有意な差はなかった。胚盤胞率は各 20.1%、35.2% となり、FSK+IBMX 処理区で有意に高くなった。ICSI でも、卵割率は各 84.0%と 76.3%となり、有意な差はなかった。胚盤胞率は各 20.7%、30.2%となり、FSK+IBMX の処理区で有意に高くなった。

- ③ 凍結精液から一部の精子液 (0.1 ml) 採取し、0.5 ml の 90% Percoll に上層し、1,000, 2,000, 3,000, 5,000, 10,000 rpm で 5 分間遠心した。精子生存指数は、各 62.7, 66.9, 65.0, 55.4, 41.0 となり、2000 rpm で最も高かった。2,000 rpm で 3, 5, 7, 10 分間の遠心による精子生存指数は各 52.0, 66.9, 53.9, 50.8 となり、5 分間で最も高くなった。微量遠心法で運動精子を分離し、IVF を行ったときの胚盤胞率は 40.0% となり、通常法の 33.3% と同様であった。
- ④ 性判別精子を用いたフィールドでの応用を検討した。国内流通の性判別精液 A では、微量精子分離法で得られた運動精子を ICSI することで、卵割率 100%、胚盤胞率 36.4% となった。乳牛からの OPU では、輸入牛の性判別精子 B と C を使用して IVF を行ったが、卵割率は 42.9%、10.6%、8 細胞期胚率は各 23.8%、2.1%、胚盤胞率は 7.1%、0% となり、胚発生率は著しく低かった。性判別精子 C については、ICSI を実施し、卵割率は 78.6% と有意に増加したが、8 細胞期胚率 14.3%、胚盤胞率 0% となり、胚発生率は低かった。輸入牛の性判別精液は、個体毎のばらつきが大きく、ICSI でのチェックは重要と思われた。

本研究での 2 年間の成果は、広島県のウシ体外受精胚生産・移植事業 (広島牛受精卵供給システム整備事業) において、広島牛受精卵供給システムの IVM に 10  $\mu$ M dbcAMP が添加され、IVF 胚の生産が実施されるようになったことである。泌乳期乳牛の OPU では、25  $\mu$ M dbcAMP 添加の有効性が明らかとなった。性判別精子を用いた雌胚生産では、流通する性判別精子の品質の問題もあり、ICSI による性判別精子の事前評価が必要と考えられた。

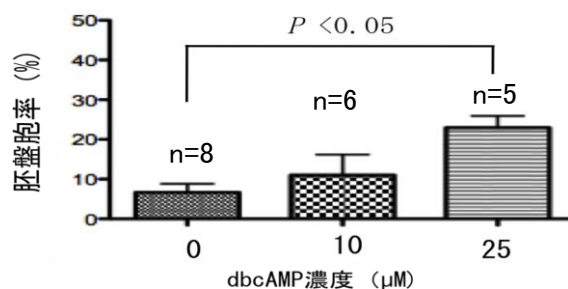


図 1. 乳牛 OPU 卵子の IVM 培地への dbcAMP 添加が IVF 後の胚盤胞率に及ぼす影響

(成果発表)

1. 可兒他. 第 30 回日本受精着床学会(大阪), 2012.8.30-31, 講演要旨 O-27.
2. 日高他. 第 19 回日本胚移植研究会(富山), 2012.9.27-28, 演題 20, P.25.
3. 堀内他. 第 105 回日本繁殖生物学会(筑波), 2012.9.5-8, 講演要旨 P-64.
4. 日高他. 第 116 回日本畜産学会(広島), 2013.3.28-29, 講演要旨.
5. 日高他. 第 20 回日本胚移植研究会(札幌), 2013.8.12-13, (発表登録済).
6. 堀内他. 第 106 回日本繁殖生物学会(東京), 2013.9.12-13, (発表登録済).