

令和2年度 成績概要書

課題コード(研究区分) : 3101-214601 (経常(一般)研究)

1. 研究課題名と成果の要点

- 1) 研究成果名 : 卵胞発育処理による牛経腔採卵-体外受精胚の効率的生産技術
(研究課題名 : 卵胞発育処理(FGT)による経腔採卵-体外受精(OPU-IVF)由来受精卵の効率的生産)
- 2) キーワード : 経腔採卵、体外受精、胚移植、卵胞発育処理、安息香酸エストラジオール
- 3) 成果の要約 : 経腔採卵-体外受精(OPU-IVF)の前処理として卵胞発育処理を行うことで、OPU-IVF胚の作出効率を1.5倍程度向上でき、新鮮移植では約50%の実用的な受胎率が得られる。前処理のうち、OPUによる主席卵胞除去を安息香酸エストラジオールの筋肉内投与に代替することで作業や牛への負担を軽減できる。

2. 研究機関名

- 1) 担当機関・部・グループ・担当者名 : 畜試・肉牛研究部・生物工学G・研究主任 藤井 貴志、畜産研究部・家畜衛生G

3. 研究期間 : 平成30年度～令和2年度(2018～2020年度)

4. 研究概要

1) 研究の背景

経腔採卵-体外受精(OPU-IVF)技術は、同一供卵牛から短期間に繰り返し胚を生産できる他、若齢牛、高齢牛および繁殖障害牛など過剰排卵処理-人工授精による体内受精胚生産が困難な個体からの胚生産も可能である。卵胞波の調節^{*1}および卵胞刺激^{*2}をOPUの前処理として行う卵胞発育処理(Follicle growth treatment、FGT)-OPU法により、胚生産成績が向上することが報告されており、効率的なOPU-IVF胚の作出法として生産現場での活用が期待される。一方、卵胞波調節のための主席卵胞の吸引除去や卵胞刺激ホルモン(FSH)の漸減投与^{*3}は、作業が煩雑かつ牛への負担が大きく、それらの簡易化が求められている。

2) 研究の目的

FGT-OPU法を活用した牛IVF胚生産技術の有用性を検証するとともに、その簡易化技術を開発する。

5. 研究内容

1) FGT-OPU法を活用したIVF胚生産技術の有用性の検証

- ・ねらい : FGT-OPU法によるIVF胚生産効率向上効果を検証するとともに、OPU-IVF胚の新鮮移植における受胎率を調査する。
- ・試験項目等 : 試験区 : 対照区(FGTを実施しない区)、漸減区(OPUにより主席卵胞を吸引除去して卵胞波を調節し、FSHを1日2回、3日間にわたり漸減投与してFGTを実施した区)、胚生産方法 : 独立行政法人家畜改良センターの「牛生体卵子吸引・体外受精マニュアル」を参考に実施、胚の体外培養には個別管理培養ディッシュを使用、解析項目 : 道総研畜試の黒毛和種ドナー牛のべ7頭の対照区および漸減区のOPU-IVF(対照区と漸減区で1セット)における採卵成績(回収卵子数、回収卵子の品質、培養胚数)およびIVF後の胚発生成績(受精後2日目の分割胚数、受精後7日目の胚盤胞数)、道総研畜試、A農場(ホルスタイン種)およびB農場(黒毛和種)において対照区および漸減区で作出した胚盤胞(受精後7～8日目)の新鮮移植における受胎率

2) FGT-OPU法の簡易化技術の検討

- ・ねらい : 1)の検証をさらに例数を増やして行うとともに、FGT-OPU法におけるFSH投与および主席卵胞除去作業の簡易化が、胚生産効率に及ぼす影響を明らかにする。
- ・試験項目等 : 供試牛 : 道総研畜試の黒毛和種15頭(反復供試)、試験区 : 対照区(5.研究内容1)と同様)、漸減区(5.研究内容1)と同様)、単回区(OPUにより主席卵胞を吸引除去して卵胞波を調節し、FSHを徐放剤^{*4}とともに頸部皮下に1回投与してFGTを実施した区)、EB漸減区(安息香酸エストラジオールの筋肉内投与により卵胞波を調節し、FSHを漸減区と同様に投与してFGTを実施した区)、胚生産方法 : 5.研究内容1)と同様、解析項目 : 各試験区の採卵成績およびIVF後の胚発生成績

6. 成果概要

- 1)-(1)対照区および漸減区計7セットのOPU-IVFのうち、4セットでは、対照区と比較して漸減区で胚盤胞数が増加した(増加率100%～400%)。一方、1セットでは対照区および漸減区ともに胚盤胞は得られず、2セットでは、対照区と比較して漸減区で胚盤胞数が減少した(減少率20%～54.5%) (表1)。試験全体で作出した胚盤胞数は、対照区で22個、漸減区で33個と、FGT-OPU法により合計11個多くの胚盤胞を生産することができ、FGT-OPU法は、効率的なOPU-IVF胚生産法として有用であることが示唆された。
- 1)-(2)試験全体のOPU-IVF胚の受胎率は45.2%(19/42)であり、実用的な受胎率が得られた。試験区別にみた場合、対照区および漸減区における受胎率は、それぞれ27.3%(3/11)および51.6%(16/31)であり、漸減区は対照区と比較して24.3ポイント高かった(表2)。
- 2) 漸減区における回収卵子数は、対照区と比較して有意に低かったが、高品質卵子数、培養胚数および分割胚数は対照区と差はなく、胚盤胞数は対照区と比較して有意に高かった。FSH投与を簡易化した単回区の培養胚数、分割胚数および胚盤胞数は漸減区と比較して有意に低かった。一方、卵胞波調節のための主席卵胞除去を簡易化したEB漸減区における回収卵子数、高品質卵子数、培養胚数および分割胚数は、漸減区と比較して有意に低かったが、胚盤胞数は、対照区よりも有意に高く、漸減区と同等であった(表3)。
以上より、FGT-OPU法はOPU-IVF胚の生産効率を向上させる有用な方法であることを示した。また、卵胞波調節のためのOPUによる主席卵胞の吸引除去作業は、EBの筋肉内投与に代替可能であり、作業や牛への負担が少ない省力的なFGT-OPU法として活用できると考えられた。

<具体的データ>

表 1. FGT が OPU-IVF における採卵および胚生産成績に及ぼす影響

OPU No.	ドナー	種雄牛	処理区	回収卵子数	高品質卵子 ¹⁾ 数(% ²⁾)	培養胚数(% ²⁾)	分割胚数(% ³⁾)	胚盤胞数(% ³⁾)
1	A	a	対照区 ⁴⁾	47	31 (66.0)	33 (70.2)	27 (81.8)	2 (6.1)
			漸減区 ⁵⁾	27	23 (85.2)	25 (92.6)	19 (76.0)	9 (36.0)
2	A	b	対照区	25	19 (76.0)	21 (84.0)	13 (61.9)	5 (23.8)
			漸減区	18	15 (83.3)	14 (77.8)	10 (71.4)	4 (28.6)
3	A	c	対照区	41	32 (78.0)	39 (95.1)	32 (82.1)	11 (28.2)
			漸減区	25	25 (100.0)	25 (100.0)	19 (76.0)	5 (20.0)
4	B	d	対照区	14	13 (92.9)	13 (92.9)	8 (61.5)	0 (0)
			漸減区	7	7 (100.0)	3 (42.9)	3 (100.0)	0 (0)
5	B	e	対照区	20	11 (55.0)	13 (65.0)	10 (76.9)	1 (7.7)
			漸減区	9	7 (77.8)	9 (100.0)	8 (88.9)	2 (22.2)
6	C	f	対照区	20	8 (40.0)	10 (50.0)	8 (80.0)	2 (20.0)
			漸減区	21	17 (81.0)	19 (90.5)	14 (73.7)	10 (52.6)
7	D	g	対照区	20	16 (80.0)	19 (95.0)	5 (26.3)	1 (5.3)
			漸減区	27	22 (81.5)	26 (96.3)	9 (34.6)	3 (11.5)
合計			対照区	187	130 (69.5)	148 (79.1)	103 (69.6)	22 (14.9)
			漸減区	134	116 (86.6)	121 (90.3)	82 (67.8)	33 (27.3)

¹⁾卵丘細胞層が1層以上付着し、卵細胞質に変性がない卵子 ²⁾分母：回収卵子数
³⁾分母：培養胚数 ⁴⁾対照区：FGT を実施しない区
⁵⁾漸減区：OPU により主席卵胞を吸引除去し、FSH を漸減投与して FGT を実施した区

表 2. OPU-IVF 胚の移植成績

試験農場	胚の品種	試験区	移植胚数	受胎頭数(%)
道総研畜試	黒毛和種	対照区 ¹⁾	4	1 (25.0)
		漸減区 ²⁾	19	8 (42.1)
A農場	ホルスタイン種	対照区	5	1 (20.0)
		漸減区	4	4 (100)
B農場	黒毛和種	対照区	2	1 (50.0)
		漸減区	8	4 (50.0)
合計		対照区	11	3 (27.3)
		漸減区	31	16 (51.6)

¹⁾ 対照区：FGT を実施しない区
²⁾ 漸減区：OPU により主席卵胞を吸引除去し、FSH を漸減投与して FGT を実施した区

表 3. FSH 投与および主席卵胞除去作業の簡易化が OPU-IVF における採卵および胚生産成績に及ぼす影響

試験区	のべOPU実施頭数	回収卵子数	高品質卵子 ¹⁾ 数(% ²⁾)	培養胚数(% ²⁾)	分割胚数(% ³⁾)	胚盤胞数(% ³⁾)
対照区 ⁴⁾	50	35.9±3.5 ^a	25.4±2.6 ^a (70.6)	28.3±2.9 ^a (78.7)	20.9±2.1 ^a (73.8)	4.2±0.7 ^b (14.8)
漸減区 ⁵⁾	25	27.4±3.4 ^b	22.4±2.5 ^{ab} (81.7)	25.2±3.0 ^a (92.3)	20.4±2.4 ^a (80.8)	7.0±1.2 ^a (27.9)
単回区 ⁶⁾	25	24.7±2.8 ^{bc}	19.5±2.4 ^{bc} (79.0)	21.0±2.5 ^b (85.0)	17.2±2.2 ^b (82.1)	3.8±0.8 ^b (18.3)
EB漸減区 ⁷⁾	20	23.6±2.2 ^c	19.6±1.9 ^c (83.0)	20.6±1.9 ^b (87.3)	15.7±1.7 ^b (76.2)	6.2±1.3 ^a (29.9)

¹⁾ 卵丘細胞層が1層以上付着し、卵細胞質に変性がない卵子 ²⁾ 分母：回収卵子数 ³⁾ 分母：培養胚数
⁴⁾ 対照区：FGT を実施しない区 ⁵⁾ 漸減区：OPU により主席卵胞を吸引除去し、FSH を漸減投与して FGT を実施した区
⁶⁾ 単回区：OPU により主席卵胞を吸引除去し、FSH を徐放剤とともに頸部皮下に1回投与して FGT を実施した区
⁷⁾ EB 漸減区：安息香酸エストロジオールの筋肉内投与により卵胞波を調節し、FSH を漸減区と同様に投与して FGT を実施した区
 数値は平均値±標準誤差 統計解析は、試験処理(試験区)を固定効果、供試牛(各個体)を変量効果として、一般化線形混合モデルにより実施し、Tukey 法により多重比較検定を行った 異文字間に有意差あり (P<0.05)

7. 成果の活用策

1) 成果の活用面と留意点

- ・道内の OPU を実施する機関が、効率的かつ省力的に OPU-IVF 胚を作出するために活用する。
- ・安息香酸エストロジオールは、休薬期間に留意する。

2) 残された問題とその対応

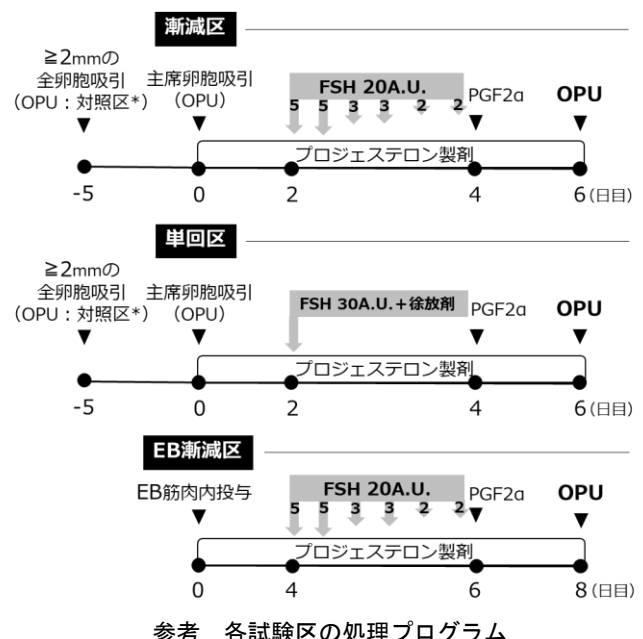
FSH 投与の簡易化については、今後もさらなる検討が必要である。

8. 研究成果の発表等

第3回日本胚移植技術研究会大会 (2019年、8月)

用語解説

- *¹⁾ 卵胞波の調節：発情と発情の間に見られる2~3回の波のような卵胞の発育の消長を卵胞波という。卵巣に存在する最も大きな卵胞(主席卵胞)を吸引除去またはホルモン剤により退行させ、新たな卵胞群の発育を開始させることで卵胞波を調節する。
- *²⁾ 卵胞刺激：卵胞刺激ホルモン(FSH)を投与し、卵胞発育を促す処理。卵胞波調節と同調することで、効果的に卵胞を発育させられる。
- *³⁾ FSHの漸減投与：FSHを約半日間隔で数日間かけて量を減らしながら頻回投与する方法。
- *⁴⁾ 徐放剤：薬物を徐々に放出するよう製剤学的な工夫を施した薬剤。



参考 各試験区の処理プログラム
 * -5日目におけるOPU(無処理)を対照区とした