

## 令和2年度 成績概要書

課題コード(研究区分) : 3101-214601 (経常研究)

### 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ウシ経腔採卵-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) の前処置として卵胞発育処理等を行うことで、OPU-IVF 胚の生産効率を向上できる。前処置のうち、OPU による主席卵胞の除去作業は、安息香酸エストラジオールの筋肉内投与に代替可能であり、本代替法により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<sup>1)</sup>および卵胞発育処理<sup>2)</sup>(FGT, Follicle growth treatment)をOPUの前処置として行う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FGTのための卵胞刺激ホルモン (FSH) の漸減投与<sup>3)</sup>は、作業が煩雑かつ牛への負担が大きく、それらの簡易化技術の開発が求められている。

#### 2) 研究の目的

FGT-OPU法を活用した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法によるウシIVF胚生産効率向上効果を検証する。
- ・試験項目等 : 解析項目 : 道総研畜試(黒毛和種)にて実施した無処理区(対照区)およびFGT-OPU区(漸減区)のOPU-IVF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)の新鮮移植成績(受胎率)

#### 2) FGT-OPU法の簡易化技術の検討

- ・ねらい : FGT-OPU法におけるFSH投与および主席卵胞吸引除去の簡易化が、胚生産効率に及ぼす影響を明らかにし、FGT-OPU法の簡易化技術を示す。
- ・試験項目等 : 供試牛 : 黒毛和種15頭を反復して供試(道総研畜試)、解析項目 : FGT-OPU法において、FSHの漸減投与(1日2回[約半日間隔]、3日間、計6回)を、徐放剤<sup>4)</sup>を用いた皮下1回投与(単回区)に、またOPUによる主席卵胞の吸引除去を、安息香酸エストラジオール(EB)の筋肉内投与(EB漸減区)に代替した場合の採卵成績およびIVF後の胚発生成績

### 6. 成果概要

- 1)-1 対照区および漸減区各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個であり、FGT-OPU法により11個多くの胚盤胞を生産することができた。
- 1)-2 試験全体のOPU-IVF胚の受胎率は45.2% (19/42)であった。試験全体の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、漸減区の受胎率は、対照区と比較して24.3ポイント高かった(表2)。  
以上より、FGT-OPU法は、OPU-IVF由来胚/子牛の生産性を向上させる有効な手法であることを示した。また、FGT-OPU法により作出された胚は、対照区の胚と比較して、受胎性が高い可能性が示された。
- 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かった。漸減区における胚盤胞数は対照区と比較して有意に高く、FGT-OPU法の有用性を確認した。FSH投与を簡易化した単回区における培養胚数、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、卵胞波調節のためのOPUによる主席卵胞の吸引除去は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 処理が 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 <sup>1)</sup> 数(% <sup>2)</sup> )	培養胚数(% <sup>2)</sup> )	分割胚数(% <sup>3)</sup> )	胚盤胞数(% <sup>3)</sup> )
1	A a	対照区 <sup>4)</sup>	47	31 (66.0)	33	27 (81.8)	2 (6.1)
		漸減区 <sup>5)</sup>	27	23 (85.2)	25	13 (76.0)	9 (36.0)
2	A b	対照区	25	19 (76.0)	21	13 (61.9)	5 (23.8)
		漸減区	18	15 (83.3)	14	10 (71.4)	4 (28.6)
3	A c	対照区	41	32 (78.0)	39	32 (82.1)	11 (28.2)
		漸減区	25	25 (100)	25	19 (76.0)	5 (20.0)
4	B d	対照区	14	13 (92.9)	13	8 (61.5)	0 (0%)
		漸減区	7	7 (100)	3	3 (100)	0 (0%)
5	B e	対照区	20	11 (55.0)	13	10 (76.9)	1 (7.7)
		漸減区	9	7 (77.8)	9	8 (88.9)	2 (22.2)
6	C f	対照区	20	8 (40.0)	10	8 (80.0)	2 (20.0)
		漸減区	21	17 (81.0)	19	14 (73.7)	10 (52.6)
7	D g	対照区	20	16 (80.0)	19	5 (26.3)	1 (5.3)
		漸減区	27	22 (81.5)	26	9 (34.6)	3 (11.5)
合計		対照区	187	130 (70.0)	148	103 (69.6)	22 (14.9)
		漸減区	134	116 (86.6)	121	76 (62.8)	33 (27.3)

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 <sup>1)</sup>	4	1 (25.0)
		漸減区 <sup>2)</sup>	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)

<sup>1)</sup> 対照区：無処理区

<sup>2)</sup> 漸減区：OPUにより主席卵胞を吸引除去し、FSHを漸減投与した区

<sup>1)</sup>卵丘細胞層が1層以上附着し、卵細胞質に変性がない卵子 <sup>2)</sup>分母：回収卵子数 <sup>3)</sup>分母：培養胚数

<sup>4)</sup>対照区：無処理区 <sup>5)</sup>漸減区：OPUにより主席卵胞を吸引除去し、FSHを漸減投与した区

表 3. FSH 投与および主席卵胞除去の簡易化が 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	延べOPU実施頭数	回収卵子数	高品質卵子数(%)	培養胚数(%)	分割胚数(%)	胚盤胞数(%)
対照区 <sup>1)</sup>	50	35.9±3.5 <sup>a</sup>	25.4±2.6 <sup>a</sup> (70.6)	28.3±2.9 <sup>a</sup> (86.2)	20.9±2.1 <sup>a</sup> (73.8)	4.2±0.7 <sup>b</sup> (14.8)
漸減区 <sup>2)</sup>	25	27.4±3.4 <sup>b</sup>	22.4±2.5 <sup>ab</sup> (81.7)	25.2±3.0 <sup>a</sup> (93.3)	20.4±2.4 <sup>a</sup> (80.8)	7.0±1.2 <sup>a</sup> (27.9)
単回区 <sup>3)</sup>	25	24.7±2.8 <sup>bc</sup>	19.5±2.4 <sup>bc</sup> (79.0)	21.0±2.5 <sup>b</sup> (92.9)	17.2±2.2 <sup>b</sup> (82.1)	3.8±0.8 <sup>b</sup> (18.3)
EB漸減区 <sup>4)</sup>	20	23.6±2.2 <sup>c</sup>	19.6±1.9 <sup>c</sup> (83.0)	20.6±1.9 <sup>b</sup> (90.0)	15.7±1.7 <sup>b</sup> (76.2)	6.2±1.3 <sup>a</sup> (29.9)

<sup>1)</sup> 対照区：無処理区 <sup>2)</sup> 漸減区：OPUにより主席卵胞を吸引除去し、FSHを漸減投与した区

<sup>3)</sup> 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回投与した区

<sup>4)</sup> 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主席卵胞を退行させ、FSHを漸減投与した区

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、一般化線形混合モデルにより実施した 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。
- ・OPU-IVF の一連の作業は、独立行政法人家畜改良センターの「ウシ生体卵子吸引・体外受精マニュアル」を参考に実施し、胚の体外培養には、個別管理培養ディッシュを用いた。

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）

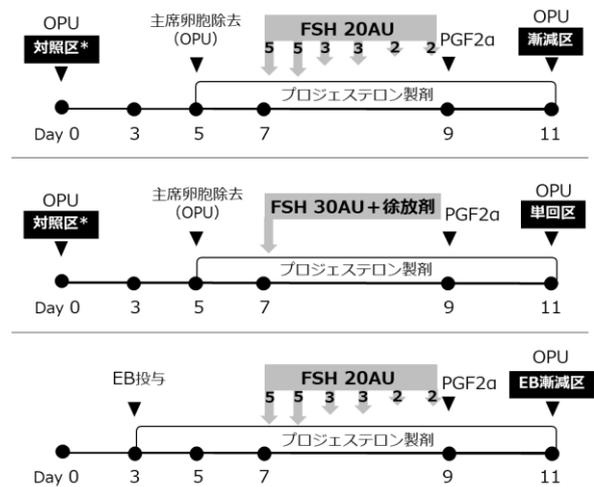
用語解説

<sup>\*1</sup> 卵胞波の調節：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。

<sup>\*2</sup> 卵胞発育処理：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。

<sup>\*3</sup> 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。

<sup>\*4</sup> 徐放剤：薬物を徐々に放出するように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

\* 対照区は漸減区および単回区の最初の無処置の OPU とした