

# 試験研究成果普及情報

部門	酪農・肉牛	対象	普及
課題名: 受精卵移植技術マニュアル(11) 細胞質内注入法による牛体外受精技術の改良			
[要約]これまで、凍結精液の体外受精能には個体差があるため、乳用種への利用は制限されていた。ヒトの不妊治療に利用されている細胞質内精子注入(ICSI)法を牛体外受精に導入することによって、体外受精効率を高めることに成功した。この開発により、体外受精が農家の乳用牛や和牛の育種改良手段に活用できると期待される。			
キーワード(専門区分) バイテク(研究対象) 家畜類-乳用牛、肉用牛 (フリーキーワード) バイオテクノロジー、生物工学、胚、体外受精、顕微授精			
実施機関名(主査) 千葉県畜産総合研究センター 生産技術部 生物工学研究室 (協力機関) 明治大学農学部生殖工学研究室、千葉県農業共済組合連合会、山武農業高校 (実施期間) 2000-2001年度			

## [目的及び背景]

体外受精の安定した成績を得るため、生産に先だって、事前の精液性能調査が行われている。和牛では、事前の調査に合格した一部の精液だけが体外受精に用いられている。しかし、改良目標や利用する精液は、ホルスタイン雌牛の性能や農家の経営形態によって異なる。また、経済効果や人気が高いホルスタイン精液は入手しづらく、体外受精に必要な有効精子数(1千万個/ml)に満たない性状の精子も存在する(表1)。これらのことから、全ての精液が体外受精に利用することは出来なかった。特に、ホルスタイン種精液の事前の性能調査は困難な状況にあり、方法の改善が求められていた。

## [成果内容]

1. 微細ピペットを用いて体外成熟未受精卵細胞質内に精子を手順に従って注入することにより、体外受精に不向きな性状の精子でも胚生産を可能にする。
2. この技術は、交配する種雄牛の個体差を緩和できるので、胚の生産性が高まる(表2)。生体の経膈的採卵時の体外受精にも利用可能と考えられる。
3. その他の胚移植技術(雌雄判別精子の利用、野生動物種の保護)との融合により、精液の有効活用の可能性が高まる。

## [留意事項]

1. 顕微授精操作中に卵に必要以上のダメージを与えると卵子が死滅するので、専用機器の取り扱いの練習を要する。
2. 注入された精液には卵を活性化することが出来ないため、卵に人為的な活性化を与える必要がある。活性化方法の改良により、発生率はさらに高まると考えられる。
3. 運動精子を注入した卵は高率な発生が期待できるが、現時点では、非運動精子や死滅精子を注入した卵は発生しない。
4. 新鮮卵巣由来の卵子で同等の成果が期待できる。

[普及対象地域] 県下全域

[行政上の措置] 実施にあたっては、人工授精所の開設届が必要となる。

[普及状況]

[成果の概要]

精液種類(頭数)	輸入(8)		国産(4)	
	M±SD	min-max	M±SD	min-max
凍結融解後 精子数*	4.0±0.9	2.3-5.0	18±3.7	13-22
生存率(%)	75±6	68-86	72±4	67-76
精子洗浄後 精子数*	0.56±0.24	0.17-0.96	2.5±0.86	1.2-3.2
生存率(%)	34±15	15-62	45±11	34-59
懸濁液量(ml)	0.51±0.21	0.12-0.84	2.1±0.86	1.0-2.7

\* ×10<sup>7</sup>

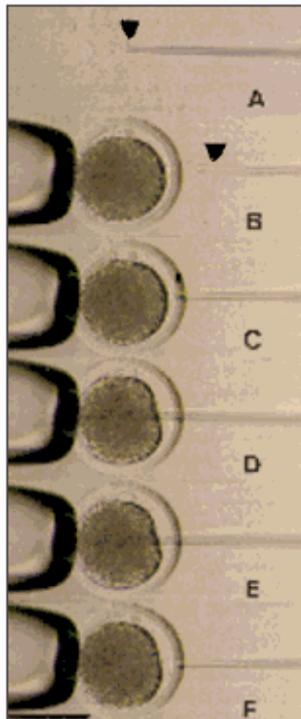


表2 牛ICSI胚の体外発生能

処置方法	処置 胚数	体外での発生能(%)		
		2細胞	胚盤胞	移植可能胚
IVF	235	107 (46)	36 (15) <sup>d</sup>	11 (5) <sup>b</sup>
ICSI+活性化	53	32 (60)	16 (30) <sup>c</sup>	10 (19) <sup>a</sup>
ICSI(活性化無)	52	24 (46)	6 (12) <sup>d</sup>	0 (0) <sup>b</sup>

abcd a>b 0.01, c>d 0.05

<手順>

- A B) ピペット先端で運動精子(▼)を捕え、ピペット内に吸引する。  
 C) 左側のピペットで保持した卵の透明帯をピエゾの振動で破った後、卵の深部に、精子を吸引したピペットを挿入する。  
 D) ピエゾの振動を与えることにより、卵細胞膜を破る。  
 E) 卵細胞質内に精子を注入する。  
 F) ピペットを卵から引き抜く。

1時間で30個程度の精子を卵細胞質内に注入できる。

[発表及び関連文献]

1. Yanagida K, et. al., Human Reprod 1998; 14: 448-453.
2. Ogura A, et. al., J. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95: 5611-5615.
3. Horiuchi et al., Theriogenology 2000; 53: 393
4. 牛島仁. 平成13年度試験研究成果発表会資料: 18-22.