

ウシ体外受精胚生産における高品質胚の簡易判別技術の開発と培養液の改善

中橋冬陽・小林大誠・山下秀幸*

Development of the Simple Discrimination Technology to Pick High Quality Embryos Up and Improvement of the Oocyte Maturation Medium

Nakahashi Fuyuharu, Kobayashi Hiroshige and Yamashita Hideyuki*

要 約

牛卵巢より牛卵子卵丘細胞複合体を採取し体外受精による胚生産を行い、卵割様式の分類に基づいて受胎率の高い胚の簡易判別技術を検証した。媒精開始後27時間および30時間において卵割様式を分類し胚盤胞発生率や受胎率を比較したところ、媒精開始後27時間における卵割様式で正常卵割として分類した胚では、胚盤胞発生率が高く良質胚の判別が可能であった。一方、媒精開始後30時間の分類では胚盤胞発生率に有意差が認められなかった。また、受胎率は正常卵割と非正常卵割で差が認められなかった。

採取した卵子の体外培養において成熟培地へcAMPやIGF-1を加えて、胚盤胞発生率の向上が可能か検討した結果、成熟培地へのcAMP添加では、胚の簡易判別において良質胚の割合が無添加に比べ有意に高まった。一方、cAMPとIGF-1を組み合わせる培地に添加しても、胚盤胞発生率はcAMPやIGF-1を単独使用した場合と同等の成績であり、無添加と比較しても差が認められなかった。

緒 言

酪農現場では低い受胎率が問題となっており、乳牛における胚移植の受胎率は40～50%程度（堂地2018）と、受胎率の改善が求められている。

卵子の成熟培養において、ホルモンのセカンドメッセンジャーであるcyclic adenosine monophosphate (cAMP)の添加により、卵子は減数分裂の特異的なステージで停止を維持し、胚盤胞発生率を高め、受胎率も向上すると報告されている（舟橋1998、堀内ら2011、河村2011）。また、成熟培養にインスリン様成長因子であるinsulin-like growth factor-1 (IGF-1)を添加することで、胚の直径、呼吸量および細胞数が増加し（坂上ら2013）、胚盤胞発生率が高くなるとの報告もある（安達ら2018）。

これまで繁殖性改善のために様々な技術が考案され、経時的に胚の成長を記録することで、胚の成長の正常性を観察することができ、受胎率の高い胚を選別できる可能性を示している（佐東ら2016、曾我ら2018、Sugimuraら2012）。

そこで、これらの技術を組み合わせることにより、受

胎率の高い胚を媒精開始後の早い段階に、簡易に判別する技術を検討した。また、培養液を改善することにより受胎率の高い胚をより多く作出するための方法について検討した。

材料および方法

1. 試験期間

試験は2015年～2017年にかけて実施した。試験1は2015年に供試数461検体、試験2は2015年～2017年に移植数33検体、試験3は2016年に供試数181検体、試験4は2017年に供試数457検体を用いて実施した。

2. 卵割様式による簡易判別

(1) 媒精開始後27時間における簡易判別による胚盤胞発生率の比較（試験1）

当所繁養のホルスタイン種成雌牛28頭を用いて経膈採卵（ovum pick up:OPU）により、卵子卵丘細胞複合体（cumulus oocyte complex:COC）を採取し体外受精（in vitro fertilization:IVF）を実施した。

ア COCの採取

OPUはウシ生体卵子吸引・体外受精技術マニュアル（小林2007）に準じて、超音波診断装置（HS-1500;本多電子(株)）、経膈プローブ（HCV-3710MV;本多電子(株)）、ディスプレイザブル採卵針（17G

令和元年8月31日受付

* 元 千葉県畜産総合研究センター

×490mm;ミサワ医科工業(株)、吸引システム(K-MAR-5115;クック社)を用いて実施した。卵巣内の大・中・小卵胞数、黄体数を確認した後、2mm以上の卵胞を穿刺し、吸引圧105mmHgで卵胞液を遠沈管(339657;Thermo FisherScientific)に吸引採取した。洗浄液は、0.1mg力価/ml硫酸ストレプトマイシン(MeijiSeika ファルマ(株))、100単位/mlペニシリンGカリウム(Meiji Seika ファルマ(株))、10単位/mlヘパリン(持田製薬(株))および1%ウシ血清(Thermo FisherScientific)を添加した乳酸加リンゲル液(ハルゼン;日本全薬工業(株))を用いた。

採取したCOCは、ウシ生体卵子吸引・体外受精技術マニュアル(小林2007)に準じて、卵丘細胞が3層以上あり透明帯周囲全体に付着しているものをAランク、卵丘細胞が2層以上または透明帯周囲に1/3以上付着しているものをBランク、裸化卵子をCランク、卵丘細胞が膨化しているものをDランクにそれぞれランク分けし、試験にはAランクのCOCを用いた。

イ 成熟培養

成熟培養から発生培養は、「エンブリオバック」非共培養を用いた牛体外受精胚の作成((株)機能性ペプチド研究所)に準じて実施した。成熟培養は、1卵子あたり10 μ lの共培養用培養液(IVMD-101;(株)機能性ペプチド研究所)のドロップをシャーレ(351008;Falcon)に作製し、ミネラルオ

イル(M5310;Sigma)で被覆して実施した(38.5 $^{\circ}$ C、5%CO₂、in air、22時間)。

ウ 媒精

媒精は融解した凍結精液を媒精液(IVF-100;(株)機能性ペプチド研究所)で最終濃度5 \times 10⁶個/mlになるように精子濃度を調整してシャーレ(Nunclon153066;Thermo Fisher Scientific)を用いて実施した(38.5 $^{\circ}$ C、5%CO₂、in air、6時間)。

エ 発生培養

COCは、培養の前段階に部分的な卵丘細胞の剥離を実施した。胚の発生培養は、IVMD-101を用いて6穴プレート(リプロC-1プレート;(株)機能性ペプチド研究所)に1胚あたり10 μ lのドロップを作製し、培養を行った(38.5 $^{\circ}$ C、5%CO₂、in air)。

オ 卵割様式による正常卵割の分類と胚盤胞発生率の調査

媒精開始後27時間に顕微鏡下で胚を観察し、均等に2分割し、フラグメント(卵割時に細胞質が断片化したもの)がなく、胚の細胞質が均一なものを正常卵割、媒精開始後2日目以降に分割を認めたものを非正常卵割と分類した。それ以外の分割を認めなかったものを未受精卵、細胞内が不整なものを変性卵とした(図1)。発生培養1日目に胚を裸化し、4~5日目に培養液の半量を交換した後、媒精開始後9日目までの胚盤胞発生率を調査した。

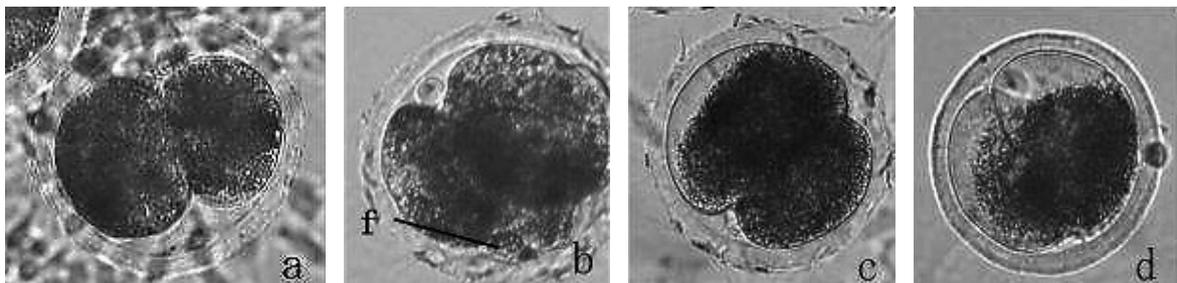


図1 卵割様式

a: 正常卵割

b~d: 非正常卵割 (b: フラグメントあり、c: 不均等2分割、d: 卵質不均一) フラグメント(f)とは卵割時に細胞質が断片化したものを指す。

(2) 媒精開始後27時間における簡易判別による受胎率の比較(試験2)

試験1で作出した正常卵割22検体と非正常卵割11検体について、0.3mol/Lトレハロースを添加した牛胚凍結保存液((株)機能性ペプチド研究所)を用いて緩慢凍結した胚を用いた。融解後ホルスタイン種雌牛に移植して受胎成績を調査し、正常卵割および非正常卵割の受胎率を調査した。

3. 成熟培地の改善

(1) 成熟培地へのcAMP添加による効果の検証(試験3)

ホルスタイン種雌牛の屠体卵巣を屠畜場より20 $^{\circ}$ Cの生理食塩水(光製薬(株))中で2時間運搬後、19G注射針(NN-1938S;テルモ(株))と10mlシリンジ(SS-10ESZ;テルモ(株))を用いて穿刺吸引法によりCOCを採取し、試験にはウシ生体卵子吸引・体外受精技術マニュアルにおけるAランクのCOCを用いた。成熟培養には、牛アルブミン粉末(Bovine serum albumin:BSA;積水化学工業(株))4mg/ml、FSH(アントリンR・10;共立製薬(株))0.02A.U./ml、0.1mg力価/ml硫酸ストレプトマイシン100単

位/ml、ペニシリンGカリウム10単位/ml、ヘパリン、上皮増殖因子 (epidermal growth factor : EGF ; Sigma) 10ng/mlをそれぞれ添加したMedium199 (Thermo Fisher Scientific) を基礎培養液として用いた。試験は、基礎培養液にcAMP (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) 30 μ mol/Lを添加したcAMP区91検体と無添加の対照区90検体の2区と比較とした。

成熟培養 (38.5 $^{\circ}$ C、5%CO₂、in air、22時間) 後、凍結精液を用いて、試験1と同様に媒精を実施し、その後、発生培養の前段階には、部分的な卵丘細胞の剥離を実施した。

なお、発生培養は38.5 $^{\circ}$ C、5%CO₂、5%O₂、90%N₂の低酸素条件下で裸化受精卵培養液 (IVD-101; (株)機能性ペプチド研究所) により、個別培養ディッシュ (LinKID micro25;大日本印刷 (株)) を用いて実施した。媒精開始後27時間の卵割様式については試験1と同様に分類し、媒精開始後8日目までの胚盤胞発生率を調査した。

(2) 成熟培地への添加剤の組合せによる効果の検証 (試験4)

ホルスタイン種雌牛およびF1雌牛の屠体卵巣から試験3と同様にCOCを採取した。

試験にはウシ生体卵子吸引・体外受精技術マニュアルにおけるAランクおよびBランクを用いた。

成熟培養は添加剤により次の4区とした。

- ・ IGF-1区 (111検体) : 基礎培養液にIGF-1 (Merck KGaA) を50 μ g/L添加
- ・ cAMP区 (117検体) : 基礎培養液にcAMPを30 μ mol/L添加
- ・ 組合せ区 (115検体) : 基礎培養液にcAMPを30 μ mol/LとIGF-1を10 μ g/ml添加
- ・ 対照区 (114検体) : 基礎培養液のみ

試験3と同様に成熟培養、媒精、発生培養を実施した。なお、発生培養の前段階での部分的な卵丘細胞の剥離は行わなかった。卵割様式の確認を媒精開始後30時間に試験1と同様に行い、分類し、媒精開始後8日目までの胚盤胞発生率を調査した。

4. 統計処理

データの統計処理は、フィッシャーの正確確率検定で行った。試験4についてはカイ2乗検定も併せて実施した。

結 果

1. 卵割様式の簡易判別技術の検討

(1) 媒精開始後27時間における簡易判別による胚盤胞発生率の比較 (試験1)

媒精開始後27時間の卵割様式別の胚盤胞発生率は、正常卵割が18.4% (37/201)、非正常卵割が12.2% (28/230) であり、正常卵割が非正常卵割と比較して有意に高値であった (表1)。

(2) 媒精開始後27時間における簡易判別による受胎率の比較 (試験2)

媒精開始後27時間の卵割様式別の受胎率は、正常卵割が22.7% (5/22)、非正常卵割が27.3% (3/11) であり、正常卵割が非正常卵割と比較して低値であったが、有意差は認められなかった (表2)。

2. 成熟培地の改善

(1) 成熟培地へのcAMP添加による効果の検証 (試験3)

媒精開始後27時間の卵割様式別の正常卵割の割合は、cAMP区が30.8% (28/91) で、対照区が10.0% (9/90) であり、cAMP区が対照区と比較して有意に高値であった (表3)。

表1 媒精開始後27時間の卵割様式別の胚盤胞発生率 (試験1)

| 卵割様式 | 胚盤胞発生 | |
|---------------|-------|--------|
| | 数 (個) | 率 (%) |
| 正常卵割 (n=201) | 37 | 18.4 a |
| 非正常卵割 (n=230) | 28 | 12.2 b |

縦列異符号間に有意差あり (P<0.05)

表2 媒精開始後27時間の卵割様式別の受胎率 (試験2)

| 卵割様式 | 受胎 | |
|--------------|-------|-------|
| | 数 (個) | 率 (%) |
| 正常卵割 (n=22) | 5 | 22.7 |
| 非正常卵割 (n=11) | 3 | 27.3 |

表3 cAMP添加による媒精開始後27時間の卵割様式別の胚盤胞発生率 (試験3)

| 卵割様式 | cAMP区 (n=91) | | 対照区 (n=90) | |
|-------|--------------|--------|------------|--------|
| | 数 (個) | 率 (%) | 数 (個) | 率 (%) |
| 正常卵割 | 28 | 30.8 A | 9 | 10.0 B |
| 非正常卵割 | 48 | 54.7 | 57 | 63.3 |
| 未受精卵 | 12 | 13.2 | 21 | 23.3 |
| 変性卵 | 3 | 3.3 | 3 | 3.3 |

横列異符号間に有意差あり (P<0.01)

胚盤胞発生率についてはcAMP区では25.3% (23/91)で、対照区が13.3% (12/90)であり、有意差は認められなかった。なお、cAMP区と対照区いずれにおいても正常卵割が非正常卵割と比較して有意に高値であった(表4)。

(2) 成熟培地への添加剤組合せによる効果の検証(試験4)

媒精開始後30時間の卵割様式は、cAMP区で正常卵割が30.8% (36/117)で最も高かったが、他の区と有意差は認められなかった(表5)。

全供試卵についての胚盤胞発生率は、IGF-1区が27.9% (31/111)、cAMP区が24.8% (29/117)、組合せ区が19.1% (22/115)、対照区が15.8% (18/114)であり、有意差は認められなかった(表6)。

表4 cAMP添加による胚盤胞発生率(試験3)

| 卵割様式 | cAMP区 | | 対照区 | |
|-------------|-------|------|-------|------|
| | 数(個) | 率(%) | 数(個) | 率(%) |
| 正常卵割 | 13/28 | 46.4 | 6/9 | 66.7 |
| 非正常卵割 | 10/48 | 20.8 | 6/57 | 10.5 |
| 卵割様式間の有意差 | | * | | ** |
| 正常卵割及び非正常卵割 | 23/76 | 30.2 | 12/66 | 18.2 |
| 全供試卵※ | 23/91 | 25.3 | 12/90 | 13.3 |

* : P<0.05 ** : P<0.01
※分母には未受精卵と変性卵を含む

表5 IGF-1、cAMPおよびそれらの組合せによる媒精30時間後の卵割様式(試験4)

| 卵割様式 | IGF-1区 (n=111) | | cAMP区 (n=117) | | 組合せ区 (n=115) | | 対照区 (n=114) | |
|-------|----------------|------|---------------|------|--------------|------|-------------|------|
| | 数(個) | 率(%) | 数(個) | 率(%) | 数(個) | 率(%) | 数(個) | 率(%) |
| 正常卵割 | 32 | 28.8 | 36 | 30.8 | 21 | 18.3 | 28 | 24.6 |
| 非正常卵割 | 14 | 12.6 | 12 | 10.3 | 17 | 14.8 | 14 | 12.3 |
| 未受精卵 | 63 | 56.8 | 66 | 56.4 | 77 | 67.0 | 71 | 62.2 |
| 変性卵 | 2 | 1.8 | 3 | 2.6 | 0 | 0.0 | 1 | 0.9 |

表6 IGF-1、cAMPおよびそれらの組合せによる胚盤胞発生率(試験4)

| 卵割様式 | IGF-1区 | | cAMP区 | | 組合せ区 | | 対照区 | |
|-------|--------|------|--------|------|--------|------|--------|------|
| | 数(個) | 率(%) | 数(個) | 率(%) | 数(個) | 率(%) | 数(個) | 率(%) |
| 正常卵割 | 24/ 32 | 75.0 | 20/36 | 55.6 | 10/21 | 47.6 | 12/28 | 42.9 |
| 非正常卵割 | 7/ 14 | 50.0 | 9/12 | 75.0 | 12/17 | 70.6 | 6/14 | 43.0 |
| 全供試卵※ | 31/111 | 27.9 | 29/117 | 24.8 | 22/115 | 19.1 | 18/114 | 15.8 |

※分母には未受精卵と変性卵を含む

考 察

1. 卵割様式による簡易判別

媒精開始後27時間における正常卵割と非正常卵割を比較した場合、正常卵割において胚盤胞発生率が有意に高値であり、胚盤胞発生能を推測するにあたり有効であった。このことから、媒精開始後27時間において胚盤胞に発生することができる胚とできない胚との間に、形態的な差が生じ始めている可能性が考えられる。

これまで、媒精開始後23～30時間付近において2細胞期に達した胚を選別することにより、受胎率が有意に高くなるとの報告(金子ら2003、詠田ら2018)や、3細胞期から4細胞期までの変化に要する時間が0.76

時間以内、5細胞期到達時間が媒精44.8時間後から55.6時間後である胚は、これらの時間の範囲外であった胚と比較して有意に受胎率が高かったとの報告(佐東ら2016)があり、卵割時間と卵割数による分類で、受胎性の高い良質胚の選別が可能であると考えられてきた(Sugimuraら2012)。さらに、初回の卵割時にフラグメントが発生するなどの異常卵割した胚は胚盤胞発生率が低いこと(ソムファイ2013)、卵割が均等な胚と不均等な胚を比較すると均等な胚の方が受胎率が高いこと(曾我ら2018)が報告されているように、卵割形態も卵割時間や卵割数と同様に胚盤胞発生率や受胎性に関係があるものと考えられる。今回の試験において、試験1で得られた結果のとおり、媒精開始後27時間で卵割様式により分類することで、胚盤胞に発生する可能性

の高い胚の選別が可能である。

一方で、既報(金子ら2003、詠田ら2018)では正常卵割と非正常卵割の受胎率を比較すると正常卵割の方が受胎率が有意に高いと報告されているが、今回の試験2における受胎率の結果においては差が認められなかった。胚盤胞発生まで得られれば受胎率に正常卵割と非正常卵割の違いは影響しないとも考えられるが、検体数が十分ではなかった可能性があることから、さらに多くの検体を供試し検証する必要がある。

試験4では媒精開始後30時間の卵割様式による分類で、添加剤の有無により正常卵割率に有意な差が認められず、今回の条件においては媒精開始後30時間における簡易判別の有効性は低く、条件を検討する必要があると考えられる。

2. 成熟培地の改善

成熟培地にIGF-1を添加することにより、胚直径、呼吸量および細胞数が増え(坂上ら2013)、さらに胚盤胞発生率が高くなると報告されている(安達ら2018)。また、cAMPは体内においてはLHサージに伴い卵丘細胞での濃度が急激に増減することが知られており、成熟培地に添加することで胚盤胞発生率および受胎率が高くなることが報告されている(堀内ら2011)。試験3のとおり、成熟培地へのcAMP添加で正常卵割の割合を高めることが確認された。

また、試験4ではIGF-1とcAMPを組み合わせて添加することにより胚盤胞発生率の向上を図ったが有意な差は認められなかった。その原因として、成熟培養においては適切なタイミングで添加剤が作用しなければ効果が十分に得られないとの報告(吉村ら2018)があることから、1回のIVFあたりで扱ったCOCが多かった試験4については、吸引から成熟培養開始までの時間が長くなっていったことから、COCに対する添加剤の効果が発揮できるタイミングとずれ、試験に用いた添加剤の効果が十分に得られなかった可能性がある。そのため、今後はCOCの数や操作時間等の検討を含めて検証する必要がある。

今後、媒精開始後27時間においてIGF-1区や組合せ区などの添加剤が卵割様式に及ぼす影響について検証し、さらに基本培地、併用する添加剤、あるいは培養条件などを検討することで胚盤胞発生率が向上する可能性があると考えられる。

引用文献

安達聡・渡邊竜二・佐藤恭二・藤田達男、2018、経膈採卵-体外受精による高品質胚生産の検討、[2018年12月6日引用]、Available from <https://www.pref.oita.jp/uploaded/attachment/183798.pdf>
堂地修、胚移植の受胎率を考える、[2018年12月6日引用]、Available from

<http://liaj.lin.gr.jp/japanese/liajnews/69/69010.html>
舟橋弘晃、1998、豚卵胞卵子の体外成熟・受精・とくに初期発生能獲得に関する研究、*Journal of Reproduction and Development* 44:47-52
堀内俊孝・可児知加子・桑波田暁子・越知正憲・日高健雅・松雪暁子・山田博道、2011、FSHとEGF存在下でのジブチリルcAMP添加がウシ体外成熟卵子の発生能に及ぼす影響、*Journal of Mammalian Ova Research* 28:131-138
金子透子・田巻勇次・小林恵美里・小竹和美・小竹譲・伊澤美彦、2003、Early cleavageによる良好胚の選別、[2018年12月10日引用]、Available from http://dl.ndl.go.jp/view/download/digidepo_10710214_po_ART0002182342.pdf?contentNo=1&alternativeNo=
株式会社機能性ペプチド研究所、1997、「エンブリオパック」非共培養を用いた牛体外受精胚の作成 1-11
河村和弘、2011、卵子成熟抑制因子の同定、*日本生殖内分泌学会雑誌* 16:30-31
小林修司、2007、ウシ生体卵子吸引・体外受精技術マニュアル 19:8
詠田由美・池上芳美・井上浩、2018、早期胚分割を用いた胚发育速度と分割形態判定による非侵襲的胚選別法に関する検討、[2018年12月6日引用]、Available from http://dl.ndl.go.jp/view/download/digidepo_10710213_po_ART0002182341.pdf?contentNo=1&alternativeNo=
坂上信忠・西田浩司・秋山清、2013、無血清合成卵管液への上皮成長因子及びインスリン様成長因子-1の添加がウシ体外发育胚の胚盤胞発生率に及ぼす効果、*神奈川畜技所研報*
Sakagami N, Umeki H, Noshino O, Uchiyama H, Ichikawa K, Takeshita K, Kaneko E, Akiyama K, Kobayashi S and Tamada H、2012、Normal calves produced after transfer of embryos cultured in a chemically defined medium supplemented with epidermal growth factor and insulin-like growth factor I following ovum pick up and in vitro fertilization in japanese black cows、*journal of reproduction and development* 58-1
佐東春香・緒方洋美・片田雄也・大月純子・塩谷雅英、2016、胚の選別におけるタイムラプスシステムの有用性の検討、*日本卵子学会誌* 1:1-5
曾我康史・横尾直樹・加茂辰生、2018、ウシ体外胚の継時的観察技術を用いた選別技術、[2018年11月27日引用]、Available from https://www.pref.saga.lg.jp/kiji00361782/3_61782_99316_up_zsp8u6v1.pdf
ソムファイ タマス、2013、高受胎率が望める牛受精卵の体外生産・凍結保存・選抜技術の開発、[2018年9月11日引用]、Available from http://www.naro.affrc.go.jp/project/research_activities/laboratory/nilgs/045310.html
Sugimura S, Akai T, Hashiyada Y, Somfai T, Inaba Y, Hirayama

M, Yamanouchi T, Matsuda H, Kobayashi S, Aikawa Y, Ohtake M, Kobayashi E, Konishi K and Imai K、2012、Promising system for selecting healthy in vitro-fertilized embryos in cattle、PLoS One 7(5):e36627

吉村泰典・中村幸雄・小田高久・大野虎之進・山田春彦・安藤索・生方良延・鈴木正彦、2018、卵核成熟過程におけ

るcyclic AMPの意義、[2018年12月6日引用]、Available from http://dl.ndl.go.jp/view/download/digidepo_10691957_po_ART0002405182.pdf?contentNo=1&alternativeNo=