

[分類]	技術情報
[成果名]	卵巣穿刺による卵子吸引時の寒冷感作は受精卵の胚盤胞率を経時的に低下させる
[要約]	と畜場由来卵巣から吸引した卵子を冷凍庫及び冷蔵庫に静置したとき、媒精及び培養後の卵割率に有意な変化はないが、胚盤胞率は経時的に低下する
[担当]	畜産試験場酪農肉用牛部
[部会]	畜産部会

1 背景・ねらい

近年、牛の受精卵移植（Embryonic transfer:ET）に用いる受精卵は、子宮灌流により採取する体内受精卵から、経膈採卵（Ovum pick up:OPU）により採取した卵子を体外にて受精及び培養して作出する体外受精卵に移行しつつある。一方、OPUは寒冷期に培養成績が低下する問題が指摘されており、その原因が母牛の栄養状態等によるものか、採取時の環境要因が卵子そのものに及ぼす影響によるものかは明らかとなっていない。そこで、準高冷地である長野県において、寒冷期のOPU実施時の適切な対応を検討するため、卵巣からの卵子吸引時における寒冷感作が卵子の受精及び培養成績に及ぼす影響を調査した。具体的には、と畜場由来卵巣から採取した卵子を用い、卵子がOPU用採卵針付属チューブを通過して保温容器内に移行する間の寒冷感作の影響を検証した。その結果、寒冷期にOPUを実施する際に有益な情報が得られたため、技術情報として公表する。

2 成果の内容・特徴

- （1）卵子をOPU用採卵針付属チューブ内に入れ、冷凍庫（ $-19.6\sim-17.3^{\circ}\text{C}$ ）に静置した場合、時間の経過に伴い胚盤胞率（胚が胚盤胞まで成長する割合）は低下する傾向が見られ、90秒後には顕著に低下する。
- （2）卵子をOPU用採卵針付属チューブ内に入れ、冷蔵庫（ $0.7\sim0.8^{\circ}\text{C}$ ）に静置した場合、時間の経過に伴い胚盤胞率が低下する傾向が見られ、180秒以上で有意に低下する。

3 利用上の留意点

- （1）本試験はと畜場由来卵巣から採取した卵子を用いた試験であり、これらの成果が実際のOPUによる受精卵の作成過程や、それを移植した際の受胎率や胚発育にどの程度関連するかは不明である。
- （2）この情報は、試験や調査で得た新たな知見で、農業生産の参考となる情報であるため、試験場、専門技術員又は農業農村支援センターとよく相談の上利用すること。

4 対象範囲

県内全域

5 具体的データ

- （1）供試材料及び試験方法

ア 供試材料

と畜場由来卵巣（品種・飼養用途等は問わない）、凍結精液（新守秀：黒毛和種県有種雄牛）

イ 試験方法

（ア）卵巣採取

38°C の生理食塩水を入れた保温容器をと畜場に搬入し、翌日と畜された牛の卵巣を保温容器内に入れた。

（イ）卵子回収

19G注射針及びシリンジを用いて、卵巣より卵泡液及び卵子を回収した。吸引溶液は1%ウシ胎児血清を添加した乳酸加リンゲル液（ハルゼン-V：日本全薬工業株式会社）を用いた。

(ウ) 寒冷感作

A及びBランクの卵子を選抜し、対照区及び試験区に分けた。卵子はOPU用採卵針付属チューブ（図1）と同径のチューブに移動させた。その後、対照区の卵子はシャーレに戻し、試験区の卵子はチューブごと冷凍庫、または、冷蔵庫内に静置した。具体的には冷凍庫内では30秒、60秒、90秒、冷蔵庫内では60秒、120秒、180秒、240秒のそれぞれの条件で静置した。試験は各感作条件について3回ずつ行い、使用した卵子数は対照区で平均26.2個、試験区では各感作条件で平均26.6個であった。



図1 OPU用採卵針及び付属チューブ(2023年度、畜産試験場)

(エ) 培養

(ア)～(ウ)の後、対照区、試験区ともに、5%子牛血清添加 TCM199 (Gibco) を用いて、5%CO₂、95%空気、38℃の条件で20～22時間程度成熟培養した。成熟培養後の卵子は、凍結精液を用いて媒精を行った。精子の受精能獲得誘起は精子洗浄液 (IVF100：機能性ペプチド研究所) で遠心洗浄 (740G で3分間) することで行い、最終濃度500万/mlの精子懸濁液を100ulのドロップの形に分注し、成熟培養後の卵子を導入して5%CO₂、95%空気、38℃の条件で6時間媒精した。発生培養には5%子牛血清添加 m-SOF (機能性ペプチド研究所) を用いて、5%CO₂、95%空気、38℃の条件で培養した。

(オ) 評価

対照区と試験区双方について媒精2日後の卵割率（試験供試卵子のうち、卵割が観察された割合）、8日後までの胚盤胞率（試験供試卵子のうち、胚盤胞まで成長した割合）を調査した。

(2) 冷凍温度感作試験

ア 冷凍庫開閉後の温度変化

開閉直後は $-17.3 \pm 1.3^{\circ}\text{C}$ で、90秒後は $-19.6 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ であった（図2）。

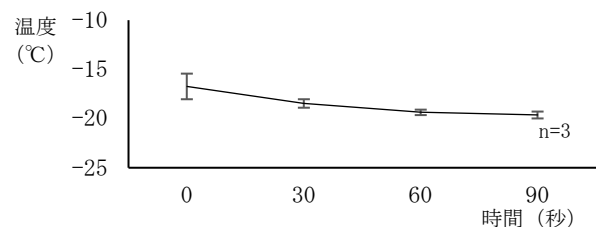


図2 冷凍庫開閉後の温度変化(2023年度、畜産試験場)
エラーバーは標準誤差を示す。

イ 冷凍温度感作後の卵割率

冷凍温度感作90秒を行っても、卵割率の有意な低下はなかったが、感作時間の延長により、卵割率のばらつきが大きくなった（図3）。また、対照区と試験区の比（ctrl比）でも同様の傾向が見られた（図4）。

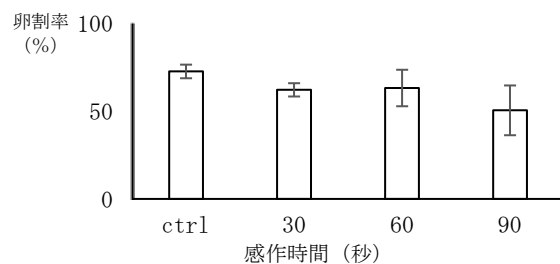


図3 冷凍温度感作：卵割率(2023年度、畜産試験場)
エラーバーは標準誤差を示す。

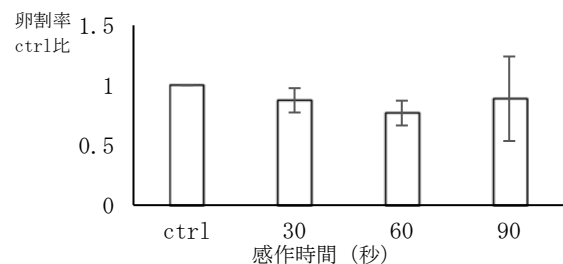


図4 冷凍温度感作：卵割率 ctrl 比(2023年度、畜産試験場)
エラーバーは標準誤差を示す。

ウ 冷凍温度感作後の胚盤胞率

感作時間の延長に伴い、胚盤胞率は低下する傾向が見られ、90 秒では対照区に対して有意に低下した（図 5）。また、対照区と試験区との比でも同様の傾向が見られた（図 6）。ア～ウの結果から、寒冷時の OPU では、チューブの加温・保温などにより、採取卵子を外気温にさらさないことが重要と考えられた。

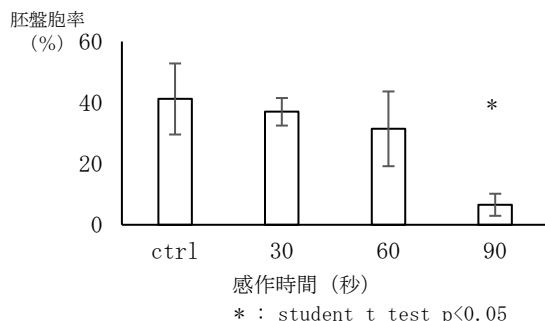


図 5 冷凍温度感作：胚盤胞率（2023 年度、畜産試験場）
エラーバーは標準誤差を示す。

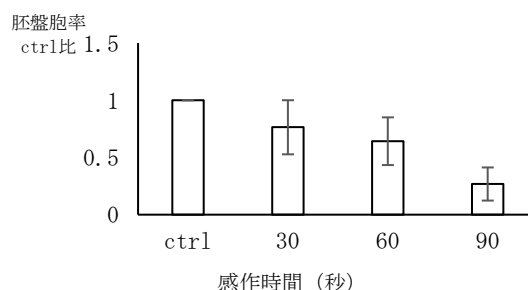


図 6 冷凍温度感作：胚盤胞率 ctrl 比（2023 年度、畜産試験場）
エラーバーは標準誤差を示す。

（3）冷蔵温度感作試験

ア 冷蔵庫開閉後の温度変化

開閉直後は $0.7 \pm 0.06^\circ\text{C}$ で、240 秒後は $0.8 \pm 0.6^\circ\text{C}$ であった（図 7）。

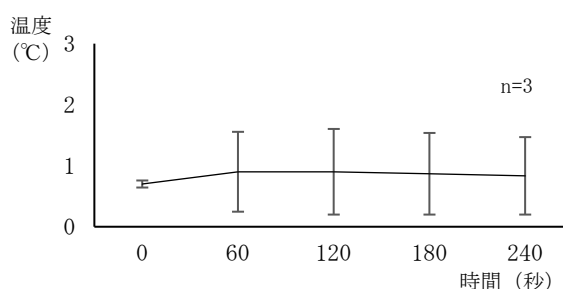


図 7 冷蔵庫開閉後の温度変化（2023 年度、畜産試験場）
エラーバーは標準誤差を示す。

イ 冷蔵温度感作後の卵割率

冷蔵温度感作時間の延長に伴い、卵割率が低下する傾向が見られた（図 8）。また、対照区と試験区の比（ctrl 比）でも同様の傾向が見られた（図 9）。

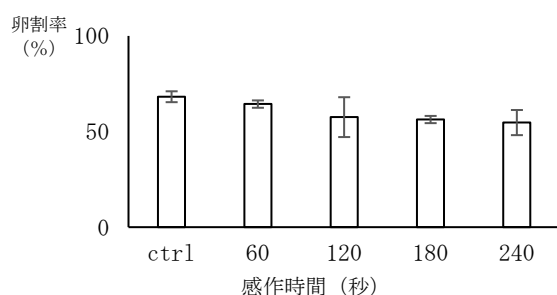


図 8 冷蔵温度感作：卵割率（2023 年度、畜産試験場）
エラーバーは標準誤差を示す。

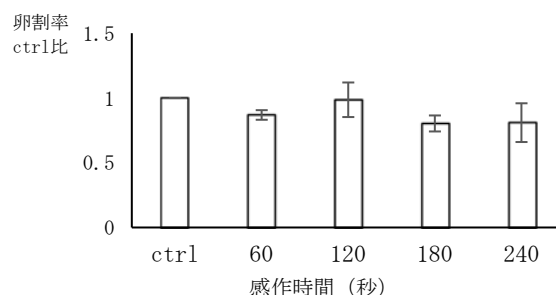


図 9 冷蔵温度感作：卵割率 ctrl 比（2023 年度、畜産試験場）
エラーバーは標準誤差を示す。

ウ 冷蔵温度感作後の胚盤胞率

感作時間の延長に伴い、胚盤胞率は低下する傾向が見られ、180 秒以上では対照区に対して有意に低下した（図 10）。また、対照区と試験区との比でも同様の傾向が見られた（図 11）。ア～ウの結果から、外気温が 0℃以上でも、曝露時間が長い場合は、培養成績に悪影響を及ぼすことが示唆され、チューブの保温・加温とともに、寒冷温度への曝露時間を短縮する必要があると考えられた。

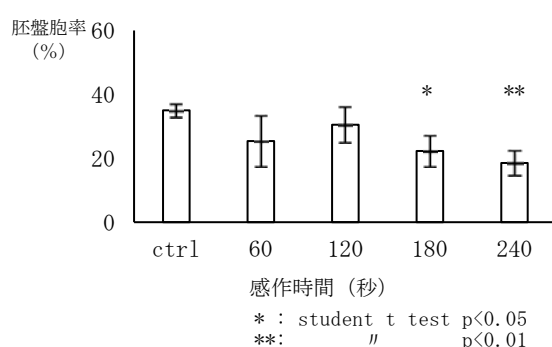


図 10 冷蔵温度感作：胚盤胞率（2023 年度、畜産試験場）
エラーバーは標準誤差を示す。

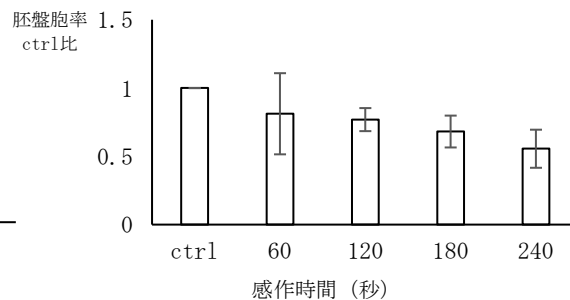


図 11 冷蔵温度感作：胚盤胞率 ctrl 比
（2023 年度、畜産試験場）
エラーバーは標準誤差を示す。

6 特記事項

[課題名、研究機関、予算区分]

牛卵子に対する寒冷感作影響調査、2023～2024 年（令和 5～6 年度）、県単素材開発

[分類理由]

本試験はと畜場由来卵巣から採取した卵子を用いており、実際の OPU による受精卵の作成過程や、それらを移植した際の受胎率や胚発育にどの程度関連するかは不明であるため。