
[分類]	技術情報
[成果名]	OPUで採取した吸引溶液の2時間程度の保存は、胚盤胞発生率に差は認められない
[要約]	OPUで採取した吸引溶液を成熟培養に供用するまで、30℃で2時間程度の保存であれば、胚盤胞発生率に差は認められない。
[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

経膈採卵(OPU)は同一の牛から繰り返し卵子の採取が可能で、体外受精(IVF)卵の作出には効率的な技術である。OPUを実施した場所で、IVF卵を作出するための培養が実施できれば問題ないが、OPUを実施した場所とIVF実施場所が離れている場合、採取卵子の輸送が必要となる。長野県においては、OPUの実施場所から畜産試験場までは最長で2時間程度の輸送が必要となる。これまで、と畜場由来卵巣の卵子吸引前の卵巣の保存温度については報告されているが、OPUにより採取した卵子の保存については報告が無い。

そこで、OPUで回収した吸引溶液を当試験場まで輸送した後、IVFを実施することを想定し、血液を含む吸引溶液の検卵までの保存時間がIVF卵の発生に及ぼす影響を検討した結果、新たな知見を得たので技術情報として公表する。

2 成果の内容・特徴

- (1) OPUで採取した吸引溶液を成熟培養に供用するまで、30℃で2時間程度の保存であれば、胚盤胞発生率に差は認められない。
- (2) OPU実施に使用する吸引溶液の違いがIVF卵の発生に及ぼす影響は認められない。

3 利用上の留意点

- (1) 試験に供した黒毛和種繁殖雌牛は経産牛で、OPUは発情周期を考慮せずに実施したものである。
- (2) OPUと保存試験は2024年4月から12月に実施し、恒温槽(FV5:富士平工業株式会社)を使用した。
- (3) OPUには採卵針を取り付けたプローブ(コンボックス型7.5MHz)および超音波画像診断装置を用いた。採取した卵子の体外培養・体外受精には市販の培養液を用い、凍結精液は家畜改良事業団より購入した。
- (4) 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

県下全域(県内で採卵を実施している獣医師)

5 具体的データ

- (1) OPUにより採取した卵子を用いた保存試験

ア 供試牛

供試牛には場内繋養の黒毛和種繁殖雌牛3頭を用い、OPUで採取した吸引溶液を直ちに検卵して成熟培養に供するものを対照区、吸引溶液を30℃に設定した恒温槽(FV5:富士平工業株式会社)で2時間保持後に検卵し成熟培養に供するものを試験区とした。試験は2024年4月から12月(OPU実施気温6.2℃~27.3℃)に対照区、試験区とも延べ6頭実施した。

イ 経膈採卵(OPU)

供試牛に2%塩酸プロカイン溶液で尾椎硬膜外麻酔を施した後に、膈内に挿入したプローブで確認した卵胞を採卵針(COVA Needle ミサワ医科工業株式会社)で穿刺した。吸引ポンプにModel FV6(富士平工業株式会社)を用い、吸引圧は120mmHgとし、50mlの遠沈管に卵胞液を採取した。吸引溶液は1%ウシ胎児血清(F7524:Sigma-Aldrich)と10IU/mlヘパリン(ヘパ

リンナトリウム注:持田製薬株式会社)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 卵子検索

卵胞液を受精卵回収用フィルター(エムコンフィルター;株式会社野沢組)でろ過した後に、実体顕微鏡下で卵子を検索した。卵丘細胞が緊密に付着したAとBランクの卵子を選別し、成熟培養を実施した。なお採取した卵子は卵丘細胞の付着状況により次のとおり分類した。

- Aランク:卵丘細胞が3層以上で透明帯周囲に緊密に付着したもの
- Bランク:卵丘細胞が2層以下又は透明帯周囲1/3以上に付着したもの
- Cランク:裸化卵子又はBランクより卵丘細胞の付着が少ないもの
- Dランク:卵丘細胞層が膨化又は蜘蛛の巣状に変性したもの
- Eランク:直径が明らかに小さいもの

エ 媒精(体外受精)と体外培養

(ア) 成熟培養

採取卵子を5%CO₂、95%空気、38℃の条件で20~22時間程度成熟培養した。成熟培養液には、5%子牛血清添加TCM199を用いた。

(イ) 媒精

卵子の成熟培養後、凍結精液(貴隼桜)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)で遠心洗浄することにより行い、最終濃度500万精子/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約15個ずつ導入して5%CO₂、95%空気、38℃の条件で6時間受精した。

(ウ) 発生培養

媒精後の受精卵を5%CO₂、95%空気、38℃の条件で7日間培養した。発生培養液には、5%子牛血清添加m-SOFを用いた。

オ 卵割検査時における卵割数および卵割率

媒精から48時間後の卵割検査で判別した、未受精卵、単細胞卵、2~4細胞分裂卵、4細胞以上分裂卵の数とその割合を表1に示した。対照区に比較して2~4細胞以上への卵割割合は増加したが、有意差は認められなかった。

カ 媒精7日後の胚盤胞の発生数

胚盤胞発生割合は、試験区分による有意差が認められなかった(表1)。

表1 保存時間の違いによる卵割率と胚盤胞発生数 (2024年、畜産試験場)

区分	供試卵子数	未受精卵	単細胞卵	2~4細胞卵	4細胞以上	卵割率	胚盤胞発生数
対照区	64	8	17	5	34	60.9%	21
		12.5%	26.6%	7.8%	53.1%		32.8%
試験区	53	4	14	9	26	66.0%	16
		7.5%	26.4%	17.0%	49.1%		30.2%

(2) OPU実施に使用する吸引溶液の違いによるIVF卵の発生に及ぼす影響

ア 供試牛

供試牛には場内繋養の黒毛和種繁殖雌牛4頭を用い、試験は2024年4月から12月に対照区、試験区とも延べ8頭実施した。

イ 経膣採卵 (OPU)

OPUは前述のとおり実施し、卵子を採取した。試験区の吸引溶液には、1%ウシ胎児血清と10IU/mlヘパリン(ヘパリンナトリウム注:持田製薬株式会社)を添加した体内受精卵回収用灌流液(エンブリオテック:日本全薬工業株式会社)を、対照区の吸引溶液には1%ウシ胎児血清と10IU/mlヘパリン(ヘパリンナトリウム注:持田製薬株式会社)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(表2)。

表2 吸引溶液100mL中の組成 (2024年、畜産試験場)

成分	試験区	対照区
	エンブリオテック(mg)	ハルゼン(mg)
塩化ナトリウム	715.8	600
塩化カリウム	31.6	30
塩化カルシウム水和物	-	20
乳酸ナトリウム	242.1	310
リン酸二水素カリウム	10.5	-
リン酸水素二ナトリウム	73.7	-

ウ 媒精(体外受精)と体外培養

成熟培養、成熟培養後の卵子の媒精および発生培養は前述と同様の方法で実施した。

エ 卵割検査時における卵割数および卵割率

媒精から48時間後の卵割検査で判別した、未受精卵、単細胞卵、2~4細胞分裂卵、4細胞以上分裂卵の数とその割合を表3に示した。対照区に単細胞割合は増加し、4細胞以上分裂卵割合は減少したが、有意差は認められなかった。

オ 媒精7日後の胚盤胞胚の発生数

胚盤胞発生割合は、試験区分による有意差が認められなかった(表3)。

表3 吸引溶液の違いによる卵割率と胚盤胞発生数 (2024年、畜産試験場)

区分	供試卵子数	未受精卵	単細胞卵	2~4細胞卵	4細胞以上	卵割率	胚盤胞発生数
対照区	99	7	29	11	52	63.6%	29
		7.1%	29.3%	11.1%	52.5%		29.3%
試験区	88	7	33	10	38	54.5%	24
		8.0%	37.5%	11.4%	43.2%		27.3%

6 特記事項

[課題名、研究期間、予算区分]

経膣採卵-体外受精(OPU-IVF)による体外受精卵生産時の外的ストレス軽減技術の開発、2024~2025年度(令和6~7年度)、県単プロジェクト

[分類理由] 吸引溶液を変更し、保存時間を延長した際の検討が必要なため。