

[畜産部門 令和5年度 参考となる研究成果]

事項名	牛体温を利用した体外受精卵生産方法		
ねらい	牛体外受精技術は受精卵の生産効率に優れた技術である。体外受精卵は、経腔採卵により採取した卵子を ①成熟培養、②受精、③発生培養し生産されるため、専用の培養器の導入と培養器の衛生的な維持管理が必要である。そこで、この3つの培養について、培養器を使わずに牛体温を利用した体外受精卵生産方法を確立したので参考に供する。		
内容	<p>1 牛体内挿入器具（写真1） 中心部をくり抜いた吸盤（外径55mm）を取り付けた50mL遠心管を本体とし、培養用試験管（Corning社 Falcon®ラウンドチューブ5mL PS製352058）と梱包用緩衝材を収納する。</p> <p>2 気相 携帯型ガススプレー缶（大陽日酸㈱ 高純度ガススプレー缶CO₂、N₂）及び空気を使って100mLシリンジ内で混合ガスを作製する。 (1) 成熟培養・受精：CO₂5mL＋空気95mL（5%CO₂、95%空気） (2) 発生培養：CO₂5mL＋N₂71.2mL＋空気23.8mL（5%CO₂、O₂、90%N₂）</p> <p>3 培養液 (1) 成熟培養液：10%子牛血清＋25mM Hepes 緩衝TCM199＋0.01AU/mL FSH＋0.5μg/mL E2＋0.2mMピルビン酸ナトリウム (2) 媒精液：媒精液G-セット IVF110S（㈱機能性ペプチド研究所） (3) 発生培養液：0.1%PVP＋KSOM/aa＋10%RD 培地</p> <p>4 培養方法（図1） 成熟培養液3mL入りの培養用試験管へ卵子を入れ、気相部へ混合ガスを注入し、器具へ収納後、牛腔内で22時間留置する（①成熟培養）。 成熟培養後、器具を取り出し、媒精液で調整した精子懸濁液300μL（500万精子/mL）入りの培養用試験管へ卵子を移し、混合ガスを注入後、39℃のお湯入り保温ボトル（㈱ドウシヤ ヘキサーボトルDHXB800）内で静置、3時間後にお湯を交換し、さらに2時間静置する（②受精）。 受精終了後、発生培養液4mL入りの培養用試験管へ卵子を入れ、混合ガスを注入し、器具へ収納後、牛腔内で7日間留置する（③発生培養）。</p> <p>5 牛体温利用型体外受精技術の発生成績（表1） 受精から7日目の桑実胚～胚盤胞発生率は、通常の体外受精と同等である。</p>		
期待される効果	培養器を使わずに、より手軽に体外受精卵の生産が可能となり、更なる受精卵移植技術の普及が期待される。		
利用上の注意事項	<p>1 牛腔内からの器具の脱落に注意する。</p> <p>2 牛体温を利用するため、健康な牛で実施する。</p> <p>3 培養用試験管への卵子の付着が原因で、9%程度の卵子が回収できない場合がある。</p> <p>4 本研究成果は特許出願中（特願2022-000561）であるため、利用する場合は畜産研究所に問い合わせること。</p>		
問合せ先（電話番号）	畜産研究所 繁殖技術肉牛部 (0175-64-2233)	対象地域 及び経営体	県内全域の獣医師
発表文献等	令和4年度 第6回日本胚移植技術研究会大会・第39回北海道牛受精卵移植研究会合同研究発表北海道大会（一般発表）		

【根拠となった主要な試験結果】



写真1 牛体内挿入器具 (左) 組立前 (右) 組立後 (令和4年 青森畜産研)



図1 培養方法 (上) 通常の体外受精 (下) 牛体温利用型体外受精 (令和4年 青森畜産研)

表1 培養方法別の発生成績

(令和4年 青森畜産研)

培養方法	成熟培養			受精			発生培養			発生培養後 (体外受精から7日目) の桑実胚~胚盤胞	
	培養卵数	回収卵数	卵子回収率 (%)	培養卵数	回収卵数	卵子回収率 (%)	培養卵数	回収卵数	受精卵回収率 (%)	発生数	発生率 (%)
牛体内挿入器具 (培養器なし)	118	117	99.2	114	114	100	107	98	91.6	26	26.5
通常の体外受精 (培養器使用)	127	-	-	127	-	-	127	-	-	39	30.7

(注) 卵子回収率、受精卵回収率 (%) = 回収卵数 / 培養卵数 × 100