

牛胚移植における受胎率向上のための  
アシストハッチング処理に関する研究

山口大学大学院連合獣医学研究科

谷山 敦

2015年3月

牛胚移植における受胎率向上のためのアシストハッチング処理に関する研究

谷山 敦

Studies of the assisted hatching of bovine embryos for the improvement of pregnancy rate after embryo transfer.

Atsushi TANIYAMA

目次

第1章 緒論

第2章 民間採胚施設における採胚成績

第3章 新鮮胚移植における透明帯切開処理が受胎率および生産性に及ぼす影響

第4章 プロナーゼを用いた透明帯菲薄化処理が胚の発育および受胎率改善に及ぼす効果

第5章 総合考察

総括

謝辞

Summary

引用文献

## 第 1 章 緒論

胚移植(ET)技術は、現在では牛の繁殖技術方法として確立され、優秀な子牛の生産や牛群の改良、種雄牛造成、乳用牛を用いた黒毛和種子牛生産など、畜産農家において有効に活用されている。ET 技術には、採胚技術と移植技術がある。採胚技術には過剰排卵処理技術や胚の鑑別、凍結保存技術があり、移植技術には受胚牛の選別や胚の注入技術がある。ET 技術による効率的な子牛生産のためには受胎率の高位安定が重要であり、受胎率を左右する要因としては、胚の品質、保存状況、受胚牛の状態、移植技術の差が考えられる。

本論文のテーマは、その中の 1 つの要因である胚の品質に着目し、品質と受胎率の関係と品質の低い胚の受胎率を改善する方法としてのアシストハッチング処理の有効性を検証することとした。アシストハッチング処理は、人体外受精胚において受胎率(妊娠率)の改善のために試みられている。人における体外受精は、不妊治療としての医療行為であり、大きな費用を要するため、受胎率を向上させることは重要な課題である。さらに1個の胚の受胎率を向上させることは、受胎率向上を目的とした多胚移植の必要性がなくなり、多胎の危険性を回避することができる。そのため最近ではレーザー等を用いて透明帯を薄く削ることや穴を開けるアシストハッチング処理(補助孵化)が行われている。この技術を畜産分野に活用するとした場合、いくつかの課題がある。畜産における胚移植技術は、優秀な子牛を多数、効率的に、低コストで生産することが求められる。そのため受胎率向上に加え低品質胚の有効活用も重要な課題となる。

そこで本研究では、牛胚移植の受胎率向上を目的にアシストハッチング処理の活用、特に低品質胚における効果を検証した。アシストハッチング処理としては、畜産現場での活用を想定し、出来るだけ低コストで簡易な方法として実態顕微鏡を用いたマニピュレーターによる透明帯切開処理およびプロナーゼを用いた透明帯の菲薄処理の効果を検証した。

本論文は5章から成り、第1章では牛胚移植における本研究の背景と目的について述べた。第2章では民間の採胚施設における採胚成績、特に低品質胚の採取状況について分析した。第3章では胚移植における胚品質と受胎率の関係、さらにマニピュレーターを用いたアシストハッチング処理(透明帯切開)の効果を新鮮胚移植において検証した。第4章では簡易な方法としてプロナーゼを用いた処理(透明帯菲薄化)の効果を透明帯切開処理の効果も合わせて、新鮮胚移植に加え凍結胚移植においても検証した。そして最後の第5章では各章の結果に基づき、学術的な総合考察とした。

## 第2章 民間採胚施設における採胚成績

### 1 緒論

胚移植技術の活用において受胎率は重要なポイントとなるが、受胎率に関係する要因の一つとして胚の品質がある。採取された胚の品質は、国際胚移植学会の基準[1]を基に形態学的に選別し、発育段階、形態、変性細胞の割合、色調等によりランク分けされ、正常な胚は Good 胚, Fair 胚, Poor 胚に区分される。胚の品質は受胎率に大きく影響することが報告[2, 3]されており、Good 胚および Fair 胚は凍結保存が可能であり、ある程度の受胎率が期待される。しかし低い品質の Poor 胚は凍結・融解後の生存性が低く、新鮮胚のまま移植に利用されているが、受胎率が低いために繁殖効率を考え廃棄されることも多い。

そこで民間採胚施設における採胚成績、胚の品質別採取状況を調査した。また、詳細な記録がある供胚牛について採胚時年齢および父種雄牛の系統についても分析した。

### 2 材料および方法

採胚成績は長崎県内の黒毛和種繁殖農家で飼養されている経産牛延べ 310 頭の成績を用いた。採胚は分娩と次の受胎の間に 1 回もしくは 2 回行い、分娩後正常性周期を確認した後、発情日を 0 日として 9～13 日目に黄体形成を確認後、過剰排卵処理を開始した。過剰排卵処置方法は、表 1 に示す長崎県で黒毛和種経産牛において広

く行われている方法により行った。方法は、卵胞刺激ホルモン:FSH(アントリン:共立製薬)14単位の朝夕2回,4日間漸減投与を行い,3日目に朝夕2回PGF<sub>2α</sub>(PG)としてジノプロスト(プロナルゴンF:ファイザー)20mgをそれぞれ投与した。人工授精は5日目夕と6日目朝の2回行い,1回目の人工授精後7日目にバルーンカテーテルを用いて採胚した。胚のランク別けは,本研究ではGood胚を正常な発育で変性細胞がほとんどないもの,Fair胚は変性細胞が20%前後のもの,Poor胚は30%以上変性細胞があるものとした。採胚成績は,総胚数,正常胚数,品質別胚数および正常胚に占める割合を比較した。

### 3 結果および考察

黒毛和種供胚牛延べ310頭の採胚成績を表2に示した。5,592個の胚が採取され,個体によるバラツキは大きい1頭当たりの平均は,総胚数 $18.0 \pm 13.0$ 個,そのうちの正常胚数は $10.8 \pm 9.0$ 個であり,正常胚率は59.7%であった。採胚成績の中で採胚数の最大の個体は,総胚数68個,正常胚数39個であり,また総胚数が50個以上の個体が15例みられた。胚の品質別成績をみると,正常胚3,340個の内,Good胚が2,086個(62.5%),Fair胚が622個(18.6%)で,Poor胚と判定された胚が632個あり,正常胚数の18.9%を占めていた。

供胚牛280頭の採胚時年齢別の頭数を図1に,採胚成績を図2に示した。平均総胚数は,最大で5歳齢の24.5個,最小で13歳齢以上の11.1個であり,4歳齢,5歳齢,9歳齢で20個を超えていた。平均正常胚数は,最大で5歳齢の15.3個,最小で

13 歳齢以上の 7.4 個であった。また 8 歳齢および 11 歳齢以上において 10 個を下回っていた。正常胚における品質別割合では、Poor 胚の割合は、最小で 10 歳齢の 14.4%、最大で 6 歳齢の 24.9%を占め、全体の平均では 19.2%を占めていた(図 3)。

次に供胚牛 255 頭について、供胚牛の父種雄牛により気高系、田尻系、藤良系の 3 系統に分類し、採胚成績を比較した。系統別の採胚頭数、採胚時の平均年齢、および系統の主な父種雄牛を表 3 に示した。系統別の採胚時の平均年齢は、田尻系 7.4 歳、藤良系 7.1 歳に比べ、気高系は 4.3 歳と若く、また主な父種雄牛は子牛市場において評価の高い種雄牛に偏りがみられた(表 3)。系統別の採胚成績では、総胚数と正常胚数ともに気高系が他に比べ有意に高い値であった(表 4, 図 4)。しかし正常胚率をみると、田尻系が 65.6%と最も高く、気高系は胚のランク別けにおいて未受精の割合は変わらないものの、ランク外とされた胚の割合が 20.9%と高かったため、57.2%と他の系統に比べ低い値であった。胚の品質別成績の比較では、Good 胚の割合は田尻系が 45.6%と他の系統に比べ良好であった(表 4)。

黒毛和種経産牛の過剰排卵処理方法については、長崎県では藤山ら[4]が FSH 総量 28mg と 13mg の 4 日間漸減投与による過剰排卵処理を比較した結果、13mg 投与区が採胚数は若干少ないものの、凍結可能胚数には差がなく、正常胚率、凍結可能胚率で優れ、また卵巣の回復が早いことを報告している。それ以来、県内採胚施設においては、若干投与量を増やした FSH14 単位の現行方法による過剰排卵処理を行っている。FSH の投与量については、小西ら[5]は投与量 28mg 以下でも良好な採胚成績

が得られることを報告し、また阪田ら[6]は FSH 投与量を 20mg から 15mg に減量することにより、正常胚数は減少するが凍結可能な良質胚の割合が向上すると報告している。本試験で用いた FSH14 単位投与の過剰排卵処理方法は、他の報告に比べても遜色ない採胚成績が得られている。

採胚成績は、供胚牛の個体差によるところが大きく、本試験ではその要因・傾向を得るために採胚成績における採胚時年齢および供胚牛の父種雄牛の系統による分析を行った。

黒毛和種供胚牛の採胚時年齢と採胚成績の関係については、小西ら[7]は供胚牛の産次ないし年齢が採胚成績に大きく影響するとし、総胚数が 5 産次、正常胚数が 6 産次にピークを示したと報告している。また小林ら[8]は、採胚時年齢について統計学的有意な変動は認められないが、8～9 歳に成績のピークがみられたと報告している。坂元ら[9]は 6.5～8.7 歳が最も優れた採胚成績を示し、11 歳を超えると正常胚率が 50%を下回ると報告している。本試験の結果では、5 歳齢の総胚数および正常胚数が最大であり、また 11 歳以上になると成績が低下しており、前述の報告に似た傾向がみられた。ただし採胚時年齢については供胚牛の系統の違いがみられ、その影響を否定できない。正常胚における Poor 胚の割合は、年齢により 20%前後を推移しており、加齢による胚品質への影響はみられない。

供胚牛の系統分けとして供胚牛の父種雄牛により 3 系統に分類したが、特定の種雄牛に偏っており、本試験の結果により系統について考察することはできない。あえて考察するならば、気高系は若年齢での採胚が行われ、総胚数、正常胚数ともに他系統に



比べ良好であるが、ランク外に選別される胚が多いため正常胚率は低く、また Poor 胚率については高い特徴がみられる。

#### 4 摘要

黒毛和種供胚牛延べ 310 頭の採胚成績を分析した結果、5,592 個の胚が採取され、1 頭当たりの平均総胚数 18.0 個、そのうちの正常胚数は 10.8 個であり、正常胚率は 59.7%であった。正常胚数のうち、Good 胚が 2,086 個 (62.5%)、Fair 胚が 622 個 (18.6%)、30%以上変性細胞がある Poor 胚と判定された胚が 632 個で 18.9%を占めた。

供胚牛の採胚時年齢別の採胚成績は、年齢による胚品質への影響は見られない。

供胚牛の父種雄牛による系統別採胚成績は、気高系が総胚数、正常胚数ともに他系統に比べ良好であるが、採胚時年齢の影響も考えられる。また胚の品質は、気高系が Poor 胚およびランク外の割合が若干高い。

### 第3章 新鮮胚移植における透明帯切開処理が受胎率および生産性に及ぼす影響

#### 1 緒言

牛胚移植において採取された体内胚は、胚の品質によりにランク分けされ、その中には発育遅延や一部の細胞が変性した低品質の胚がみられる。胚の品質は受胎率に大きく影響し[2, 3], Good 胚は胚移植において受胎率が高く、凍結-融解後においても高い受胎率が期待できる。Fair 胚は、Good 胚に比べ受胎率は低いものの凍結保存が可能とされている。しかし品質の低い Poor 胚は凍結-融解後の生存性が著しく低下するため、通常新鮮胚のまま移植に利用されるが、それでも低受胎率が指摘され、繁殖効率を考えると廃棄されることも多い。

Poor 胚の受胎率が低い要因としては、透明帯からの脱出(ハッチング)できないことが考えられる。近年、人胚において脱出を補助するアシストハッチング技術として、マイクロニードルを用いた透明帯切開、酸性タイロイド液やレーザーを用いた透明帯穿孔が行われ、受胎率の向上が試みられている [10-14]。透明帯切開の効果について、Dokras ら[13]は人体外胚においてマイクロニードルを用いて透明帯切開することにより有意にハッチング率が向上することを報告しており、また Check ら[12]は人体外胚の凍結胚において、アシストハッチングは有益であろうと報告している。牛胚においては Lopatarova ら[15]がマイクロブレードを用いた透明帯切開により Poor 新鮮胚の発育改善を報告しているが、受胎率についての報告はない。しかしマイクロブレードを用いた方法は、ブレードの厚さが胚に対して 1/4 から 1/3 の厚みがあり、球状の透明帯を切開す

ることによる胚へのダメージが懸念される。一方, Lyu ら[16]は, マウス胚および人胚において, マイクロニードルを用いて透明帯に穴を開ける方法は, 簡単で確実な方法であることを報告している。

第2章の黒毛和種供胚牛310頭の採胚成績において, 正常胚のうちPoor胚に632個, 18.9%がランク分けされており, これらPoor胚の受胎率を向上させることが胚の有効活用につながり, さらに胚移植技術による優良牛の効率的生産を可能とする。

そこで採取された胚の有効活用のため, 新鮮胚移植におけるランク別の受胎率およびPoor胚の受胎率向上を目的としてマイクロニードルを用いた透明帯切開処理の効果を検討した(図5)。

## 2 材料および方法

供試した体内受精胚は, 黒毛和種経産牛を用い, 前章で述べた過剰排卵処理後, 黒毛和種の精液を人工授精, その7日後にバルーンカテーテルを用いて採胚した。採取した胚の品質は, 国際胚移植学会の基準[1]を基に形態学的に選別し, 正常胚をGood胚, Fair胚, Poor胚に区分し(Good胚は正常な発育で変性細胞がほとんどないもの, Fair胚は変性細胞が20%前後のもの, Poor胚は30%以上変性細胞があるもの)試験に供した。透明帯切開処理は, 倒立顕微鏡または実体顕微鏡(図6)に取り付けたマイクロマニピュレーターにより, 胚を吸引保定するホールディングピペットと透明帯を切開するカッティングニードルを操作し, ミネラルオイルを重層した20%子牛血清加m-PBS:50 $\mu$ lドロップ中で行った(図7)。先ずホールディングピペットで胚を保定し, 胚

の変性部側にカッティングニードルを穿刺，カッティングニードルとホールディングピペットを擦って透明帯を切開した(図8)．本法はマイクロブレードを用いた方法[15]に比べて、細胞塊のダメージがなく短時間で容易に切開できる．

新鮮胚移植は，農家の飼養牛を受胎牛とし，1個または2個の胚を黄体側子宮角に移植した．妊娠鑑定は，移植45日後に直腸検査による妊娠鑑定を行ない，受胎率を比較した．さらに受胎後の流産率，産子率，双子率を調査し，移植1回当たりの子牛の生産効率について検討した．

### 3 結果および考察

#### 1)受胎成績

無処理区の新鮮1胚移植の受胎率は，Good胚で78.3%，Fair胚で43.8%，Poor胚で23.1%と，Good胚の受胎率はFair胚およびPoor胚に比べ有意に高く，また品質が低下すると受胎率が低下する傾向がみられた．透明帯切開処理区の受胎率は，Good胚75.0%，Fair胚45.2%と無処理区とほぼ同様の受胎率であったが，Poor胚においては無処理区が23.1%に対して、透明帯切開処理区が44.4%)と有意( $p < 0.05$ )に向上した(表5)．

さらに透明帯切開処理に加えて2胚移植の効果を検証した．無処理区における2胚移植の受胎率は，42.9%で1胚移植の23.1%に比べ高い値であった．透明帯切開処理区においては，1胚移植が44.4%に対し2胚移植が59.8%と，2胚移植の受胎率が有意に( $p < 0.05$ )高い値であった．当然，無処理区1胚移植の受胎率と比べても有意

に( $p<0.01$ )高い値であった。また透明帯切開処理における倒立顕微鏡または実態顕微鏡の違いにより、受胎率に有意な差はみられなかった(表6)。

## 2)子牛生産成績

本試験において受胎後に流産あるいは分娩が確認できた牛について集計した(表9)。流産率(流産数/受胎数)では、1胚移植においては透明帯切開処理区が16%(5/31)、無処理区が0%であり、2胚移植においては透明帯切開処理区が28.6%(10/35)、無処理区が33%(2/6)であった。両区とも2胚移植において流産の発生率が高い値であった。双子率では、1胚移植においては透明帯切開処理区に1例みられ、3.8%(1/26)であった。2胚移植においては切開処理区が48.0%(12/25)、無処理区が25.0%(1/4)であり、切開処理区の子率が高い値であった。

以上の結果から Poor 胚の新鮮移植による胚移植1回あたりの産子数(生産効率= $[\text{産子数}/\text{受胎数}] \times \text{受胎率}$ )を導き出すと、1胚移植では透明帯切開処理区が38%、無処理区が23%であり、2胚移植では透明帯切開処理区が63%、無処理区が35%となった(表7)。

本試験では、胚の品質と受胎率関係および透明帯切開処理の効果を新鮮胚移植試験より検証した。受胎率は、胚の品質が低下するに伴い、当然受胎率は低下し、Poor 胚では23.1%であった。そこで透明帯切開処理を行った結果、Good 胚とFair 胚では効果が認められないものの、Poor 胚では44.4%と有意に向上している。Poor 胚の有効活用方法としては、受胎率を上げるために2胚移植が行われる場合もあり、本試験でも2胚移植の受胎率が1胚移植に比べ高い値であった。さらに2胚移植と透明帯切

開処理を組み合わせることで、受胎率の改善が期待できる。

さらに Poor 胚を用いた子牛の生産性をみると、1 胚移植、2 胚移植ともに透明帯切開処理により受胎率が改善できることに加え、2 胚移植では双子率も向上しており、透明帯切開処理は Poor 胚を活用するための有効な手段になると思われる。しかし、Poor 胚における流産、特に 2 胚移植時の流産の発生率が高く、この要因が低品質胚であることの可能性は否定できない。

2 胚移植の効果について、Numabe ら[17]は、牛新鮮胚移植において、体外胚移植の受胎率、子牛生産率ともに向上し、また体内胚移植の子牛生産率も向上することを報告している。しかし体内胚移植の受胎率に差がみられないことは、移植に用いた胚の品質が Good 胚のみであったことが推測される。2 胚移植による受胎率の向上は、妊娠を維持若しくは黄体退行を防止するのに必要なインターフェロンの $\alpha$ や他の胚シグナル物質の量を増加させることが考えられる[18, 19]。また栄養膜小胞と胚の共移植による受胎率向上に似た効果が推測される[20, 21]。

本試験では牛新鮮胚移植において Good 胚と Poor 胚の受胎率には有意な差があり、透明帯切開処理により Poor 胚の受胎率を改善できることが実証できた。

また本試験では出来るだけコストを掛けずに透明帯切開処理を行うために、民間の採胚施設にある実体顕微鏡にマニピュレーターを取り付けて行う方法を検討した。この方法は、若干の器材購入費を要するが、採胚施設で容易に行え、倒立顕微鏡を用いる方法と変わらない成績が得られたことから、より現場に活用できる方法である。

#### 4 摘要

採取された牛胚の有効活用を目的に、マイクロニードルを用いた透明帯切開処理の効果について新鮮胚を用いて検証した。この処理方法は、細胞塊にダメージを与えることなく、容易に透明帯切開ができる。無処理区における受胎率は、Good 胚:78.3%, Fair 胚:43.8%, Poor 胚:23.1%と、品質が低下すると受胎率が低下する傾向にあった。透明帯切開処理区のランク別受胎率は、Good 胚:75.0%, Fair 胚:45.2%と、無処理区と同様であったが、Poor 胚は 44.4%と受胎率の向上がみられる。また透明帯切開を行い新鮮 2 胚移植することにより、Poor 胚の受胎率は 59.8%と高い受胎率が得られる。さらにコストを抑えるための実態顕微鏡を用いた方法でも同様の成績であった。

透明帯切開処理が子牛の生産性に及ぼす効果を検証した結果、受胎確認後の流産率は、1胚移植:16%, 2胚移植:28%と 2 胚移植が高い値を示した。2胚移植による双子率は処理区:48.0%と無処理区:25.0%に対し高い値であった。これらを基に生産効率([産子数/受胎数]×受胎率)を算出すると 1 胚移植では処理区:38%, 無処理区:23%, 2 胚移植では処理区:63%, 無処理区:35%となり、生産効率の改善がみられた。

以上より、牛新鮮胚移植において透明帯切開処理は、Poor 胚の受胎率を向上させ、子牛の生産効率の改善が期待できる有効な手段である。

## 第4章 プロナーゼを用いた透明帯菲薄化処理が胚の発育および受胎率改善への効果

### 1 緒論

第3章において、新鮮胚移植の Poor 胚の受胎率向上にマニピュレーターを用いた透明帯切開処理が有効であることを述べたが、この方法はマニピュレーター等の器材が必要であり、加えてその操作技術が必要となり、また多数の胚を処理するためには多くの時間を要する。

また胚の凍結保存は、地域的にも時間的にも広範囲に胚の有効活用を可能とする技術であるが、凍結保存により受胎率は低下し、特に Poor 胚においては著しい受胎率の低下が懸念される。

本試験では、より簡便に行えるアシストハッチング法として、透明帯へのタンパク質分解酵素であるプロナーゼ処理が胚の発育や脱出補助効果及び受胎率に及ぼす影響を検証した。併せて胚の凍結保存における凍結前プロナーゼ処理の効果も検証した。

### 2 材料および方法

本試験では、体外受精胚及び体内受精胚を用い、アシストハッチング処理としてプロナーゼ処理及び透明帯切開処理と無処理の3群の比較により、その効果を検証した。先ず、試験1としてプロナーゼ処理による透明帯の変化の調査。試験2として体外受精胚を用いたアシストハッチング処理後凍結を行わない新鮮胚と処理後凍結－融解を行



う凍結胚についてそれぞれ培養試験を行い、胚盤胞の発生及び脱出状況を比較。試験 3 として体内胚を用い、新鮮胚と凍結胚の移植試験による受胎率の比較を行なった。

供試する体外受精胚の作出[22]は、食肉センターにおいて採材した牛卵巢に存在する5mm以下の卵胞から卵子を吸引し、10%胎児血清加 TCM-199 培地により5%CO<sub>2</sub>、95%空気、38.5℃の条件下で21時間成熟培養を行った。次に1頭の黒毛和種雄牛の凍結融解精液を用い体外受精を行い、その後10%胎児血清加 CR1aa[23]培地により体外培養、受精後6日目において桑実胚に発育した胚を供試した。

体内受精胚は、黒毛和種供胚牛に卵胞刺激ホルモン製剤の漸減投与による過剰排卵処理を行い、黒毛和種の精液を人工授精、その7日後にバルーンカテーテルを用いて採胚した。得られた胚の品質は、国際胚移植学会の基準[1]を基に形態学的に正常胚を Good 胚, Fair 胚, Poor 胚に選別した。Good 胚は正常な発育で変性細胞がほとんどないもの、Fair 胚は変性細胞が20%前後のもの、Poor 胚は30%以上変性細胞があるものとし、試験に供した。

アシストハッチング処理は、体外受精胚では、体外受精後6日目の桑実胚をランダムに3群に分け、その内2つの群はプロナーゼ処理群と透明帯切開処理群としてアシストハッチング処理を行った。その後各群において凍結しない新鮮胚培養試験とダイレクト法により凍結・融解後培養する凍結胚培養試験を実施した。体内受精胚では、人工授精後7日目の採胚時にアシストハッチング処理を行い、新鮮胚および凍結胚移植に用いた。

プロナーゼを用いたアシストハッチング処理(プロナーゼ区)は、室温(約 25℃)下で D-PBS で 3%に調整したプロナーゼ(アクチナーゼ E; 科研化学, 東京)液に透明帯の変形が確認されるまで胚を浸漬した. 透明帯の変形は、体外受精胚で 20 秒から 1 分の間、体内受精胚で 1 分から 3 分の間認められ、その後胚を 20%子牛血清 (Invitrogen, 米国)加 D-PBS または 10%牛胎子血清加 TCM-199 培地により洗浄し、凍結保存または培養試験に供した.

比較対照として第 3 章で述べたマイクロニードルを用いたアシストハッチング区(スリット区)を設け、マイクロマニピュレーターに取り付けたカッティングニードルにより胚の変性部側を穿刺、カッティングニードルとホールディングピペットを擦り合わせるにより、透明帯に円周の 10~15%のスリットを作成した.

試験 1 の透明帯厚の計測は、供試した胚を 2.5%グルタルアルデヒドにより 45 分間前固定、2%四酸化オスミウムにより 45 分間後固定を行い、2%ウラニールアセテートにより 30 分間染色、脱水後 TAAB Quetol 653 混合液により包埋した. 80nm の厚さに作成した切片は、ウラニールアセテートおよびクエン酸鉛により染色し、電子顕微鏡写真により観察、計測を行った. なお透明帯の厚さの計測は、それぞれの試験区各 4 個の胚について 4 ヶ所(0, 45, 90, 135 度)を測定した.

試験 2 および試験 3 の胚の凍結及び融解方法については、凍結保存は 5%エチレングリコール+6%プロピレングリコール+0.1M シュークロース in 20%子牛血清加 PBS 液を用い、0.25ml ストローに封入した[22]. その後プログラムフリーザーを用い-7℃から-30℃まで毎分 0.3℃のスピードで冷却した後、液体窒素中に保存した. 胚の融解方法は、5

秒間空気中に保持した後、30℃の温湯により融解した。

アシストハッチング処置後の胚の体外培養については、10%胎子血清加 TCM-199 に 100  $\mu$  M  $\beta$ -メルカプトエタノールを添加した培養液を用いた。処理胚は、38.5℃、5%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>、90%N<sub>2</sub>、水蒸気飽和下で4日間培養して発育を観察した。胚の発育は、透明帯から完全に脱出した胚をハッチト胚、あるいは脱出途中の胚をハッチング胚として区分した。

培養試験は、各群1回につき7~19個の処理胚により行い、新鮮胚においては7回、凍結胚においては11回の反復を行った。

胚の移植については、発情7日目の受胎牛の黄体側に非外科的に移植し、受胎確認は発情後45~60日の間に直腸検査により行った。

統計解析：統計は、透明帯の厚さについては Student's t-検定を行い、脱出率については、各項目を逆正弦変換法による分散分析後、Tukey 法で検定した。受胎率については、分散分析を行った。各項目は  $p < 0.05$  で有意差ありとした。

なお、本研究は、動物福祉に配慮して、供試牛に苦痛を増大させないように体内受精胚の回収、胚移植等を行った。

### 3 結果および考察

#### 試験 1:プロナーゼ処理による透明帯厚の変化

新鮮胚、凍結胚ともにプロナーゼ処理後、透明帯の表層が薄くなっているのが観察された(図9)。透明帯の厚さを比較した結果、無処理区が新鮮胚:4.95  $\mu$  m, 凍結胚:

4.74  $\mu\text{m}$  に対し、プロナーゼ処理区が新鮮胚:3.66  $\mu\text{m}$ 、凍結胚:3.88  $\mu\text{m}$  と、無処理区に比べプロナーゼ処理区が約 1  $\mu\text{m}$  薄くなり、有意な差( $p<0.05$ )がみられた(表8)。

#### 試験 2:体外受精胚を用いた培養試験

体外受精胚を用いた培養試験では、桑実胚におけるアシストハッチング処理区の胚盤胞期への発生率は、無処理区と比較して、新鮮胚(表9)、凍結胚(表10)ともに有意な差はみられなかった。

新鮮胚の培養4日目までのハッチト胚数の割合は、無処理区に比べプロナーゼ区( $p<0.01$ )、スリット区( $p<0.05$ )とも有意に高く、ハッチング胚数を含めた胚数も無処理区に比べ有意( $p<0.01$ )に高かった(表9)。また凍結胚においても同様の成績であった(表10)。

#### 試験 3:移植試験

移植試験は野外で実施したため、新鮮胚移植は野外で実施可能な無処理区とプロナーゼ区の2区を比較した結果、プロナーゼ区の受胎率は Good, Fair, Poor のいずれの品質でも無処理区との間に差は無かったが、Poor 品質胚では無処理区に比べ高い傾向であった。凍結胚移植では無処理区、スリット区、プロナーゼ区の3区を比較した結果、スリット区、プロナーゼ区の受胎率は、Good, Fair, Poor のいずれの品質胚でも無処理区と差はみられなかったが、Poor 品質胚の受胎率は高い傾向であった(表11)。

胚移植において胚の品質は受胎率に影響を与え、特に低品質胚は受胎率が低い傾向にある[3]。また H.Abe ら [24] は、品質を形態学的に分類した牛桑実胚の微細構造を比較した結果、低品質胚の卵割球数が少ない、と報告している。そこで Alvarez ら [25] は、低品質胚の短期体外培養により割球数を増やすことにより良質胚と同等の受胎率が得られると報告している。このように割球数と胚品質には相関があり、高品質の胚は透明帯からの脱出率も高くなる。受胎するためには胚が透明帯から脱出することが必要であり、低品質胚の受胎率を改善するために、透明帯からの脱出率を向上させることも大きな要因となる。また Iwasaki ら[26]は、体外受精胚は内部細胞塊の接触が弱く、細胞数が少ないと報告し、Numabe ら[17]は高品質の牛胚を用いた移植試験において、体内受精胚に比べ体外受精胚の受胎率が低いのは細胞数が少ないことによると考察している。Niemann ら[27]は、牛の7日齢桑実胚および胚盤胞において透明帯切開処理は凍結・融解後の生存性に影響しないと報告している。また Kane[28]は、ウサギ体内桑実胚において *Streptomyces grieseus* 由来 Protease(プロナーゼ)の培地への添加は胚盤胞への発育に影響なく、透明帯やムチン層を融解し、胚が透明帯から脱出するために必要な酵素であると報告している。現在、人胚においては人為的に脱出を助ける処置(アシストハッチング)として、マニピュレーターを用いた透明帯切開 [10,12,13], タイロッド液[10,14]やプロナーゼ[10]処理, レーザー[10,11,29]を用いた菲薄処理が試みられ、受胎率の向上が図られている。

本試験では、牛胚において畜産現場で簡易な方法で透明帯からの脱出補助を行うことを目的に、プロナーゼ液を用いたアシストハッチング効果を検証した。その結果、体

体外受精 Good 胚において、新鮮胚、凍結胚ともに胚盤胞期への発生率に悪影響を与えず、胚のハッチング割合を有意に向上させることを確認した。さらに体内受精胚を用いた移植試験の結果、低品質胚において新鮮胚では有意に受胎率が向上した。牛体内受精胚新鮮移植においてマニピュレーターを用いた透明帯切開が低品質胚の受胎率を向上させることに加え、今回プロナーゼを用いた透明帯菲薄処理も同様に低品質胚新鮮移植において受胎率改善の効果が認められた。これは低品質胚を新鮮移植する場合、受胎率を向上する目的でアシストハッチング処理を行うことは、有効な方法と思われる。しかし Good 胚、Fair 胚においてはその効果は認められず、また Poor 胚においても凍結胚ではその効果が小さいと思われた。これは、Poor 胚は変性細胞が多く、加えて胚の凍結及び融解処理により受胎性が低下する影響が大きく、アシストハッチング処理の効果が小さくなったと思われる。

牛胚移植において低品質胚の有効活用は、貴重な胚による優良牛の増産に必要な技術であり、そのためには凍結保存技術も含めた受胎率の向上が求められている。今回の結果は、今後低品質胚の有効活用技術の一助となると思われる。

#### 4 摘要

牛胚において受胎率向上を目的に、タンパク質分解酵素であるプロナーゼを用いたアシストハッチング(AH)処理の効果を検証した。その結果、体外受精由来桑実胚を用いた培養試験において、プロナーゼ処理は新鮮胚及び凍結胚の胚盤胞期への発生率に悪影響を与えず、胚がハッチングする割合を有意に向上させることが確認された。さら

に体内受精胚を用いた新鮮胚及び凍結胚の移植試験において、良質胚では効果がみられないが、低品質胚において新鮮胚移植では有意に受胎率が向上したものの、凍結胚移植では効果が認められなかった。以上よりプロナーゼによる AH 処理は、採胚施設において特別な器材や技術を必要としない簡易な方法であり、低品質胚の新鮮胚移植における受胎率向上に有効な方法であることが示唆された。

## 第5章 総合考察

本研究は、民間採胚施設における採胚成績、特に低品質胚の採取状況を分析し、特に胚の品質と受胎率の関係を明らかにすると共に、採胚された低品質胚の受胎率の向上を目的に、アシストハッチング処理としてマイクロニードルを用いた透明帯切開処理とプロナーゼを用いた透明帯菲薄処理の有効性を検証した。

本研究における胚の品質評価は、得られた正常胚を形態学的に、正常な発育で変性細胞がほとんどないものを Good 胚、変性細胞が 20%前後のものを Fair 胚、30%以上変性細胞があるものを Poor 胚と評価した。

黒毛和種供胚牛延べ 310 頭の採胚成績を分析した結果、1 頭当たりの総胚数 18.0 個、そのうちの正常胚数は 10.8 個であり、そのうち、Good 胚が 6.7 個、Fair 胚が 2.0 個、30%以上変性細胞がある Poor 胚と判定された胚が 2.0 個を占めた。つまり 1 回の採胚時に正常胚の 19%、約 2 個の Poor 胚が得られることになる。

Poor 胚は、凍結保存後の生存率が著しい低下するため新鮮胚移植に利用されるが、新鮮胚移植においても胚の品質が受胎率に大きく影響する。本研究で実施した新鮮胚移植における胚の品質別の受胎率は、Good 胚：78.3%、Fair 胚：43.8%、Poor 胚：23.1%と、品質が低下すると受胎率が低下する傾向が確認された。

そこで低品質胚の受胎率向上を目的に、アシストハッチング処理法としてマイクロニードルを用いた透明帯切開処理の効果について検証した。この処理方法は、顕微鏡に取り付けたマイクロマニピュレーターにより、胚を吸引保定するホールディングピペットと透明帯を切開するカッティングニードルを操作し、透明帯を切開する。本法はマイクロブ



レードを用いた方法に比べて、細胞塊のダメージがなく短時間で容易に切開が可能である。透明帯切開処理の効果を検証するため新鮮胚移植を行った結果、透明帯切開処理区の品質別受胎率は、Good 胚：75.0%、Fair 胚：45.2%と、無処理区と同様の受胎率であったが、Poor 胚は 44.4%と受胎率の改善がみられる。さらに透明帯切開処理と新鮮 2 胚移植を組み合わせた結果、Poor 胚の受胎率は 59.8%と高い受胎率が得られた。またコストを抑えるため倒立顕微鏡に替えて実態顕微鏡を用いた方法でも同様の処理が可能であり、移植成績においても同様の成績が得られた。

さらに低品質胚新鮮移植における透明帯切開処理が子牛の生産性に及ぼす効果について、流産率、双子率も含めて検証した結果、受胎確認後の流産率は、1 胚移植：16%、2 胚移植：28%と 2 胚移植が高い値を示した。2 胚移植による双子率は処理区：48.0%と無処理区：25.0%に対し高い値であった。これらを基に生産効率（[産子数/受胎数]×受胎率）を算出すると 1 胚移植では処理区：38%、無処理区：23%、2 胚移植では処理区：63%、無処理区：35%となり、透明帯切開処理による生産効率の改善がみられた。

しかしこの方法はマニピュレーター等の高額な器材が必要であり、加えてその操作技術が必要となり、また多数の胚を処理するためには多くの時間を要する。そこで、アシストハッチング処理方法として、タンパク質分解酵素であるプロナーゼを用いた透明帯菲薄化処理が、マニピュレーターを用いた透明帯切開処理と同様の受胎率向上効果が得られるか検証した。

プロナーゼを用いた透明帯菲薄化処理は、室温下で D-PBS で 3%に調整したプロナ

ーゼ(アクチナーゼ E; 科研化学, 東京)液を用い, 透明帯の変形が確認されるまで胚を浸漬することにより実施した.

体外受精由来桑実胚を用いた培養試験により, プロナーゼ処理が新鮮胚及び凍結胚の胚盤胞期への発生率に悪影響を与えないことを確認し, 胚のハッチング割合を有意に向上させることを確認した. さらに体内受精胚を用いた新鮮胚及び凍結胚の移植試験により, 新鮮胚移植では低品質胚において無処理区 27.5%に対しプロナーゼ区が 47.3%と有意に受胎率が向上したものの, 凍結胚移植では受胎率向上効果は認められなかった. 以上よりプロナーゼによる透明帯菲薄化処理は, 採胚施設において特別な器材や技術を必要としない簡易な方法であり, 低品質胚の新鮮胚移植における受胎率向上に有効な方法であることが示唆された.

牛胚移植において低品質胚の有効活用は, 貴重な胚による優良牛の増産に必要な技術であり, そのためには凍結保存技術も含めた受胎率の向上が求められている. 今回のアシストハッチング処理の有効性の検証は, 今後低品質胚の有効活用技術の一助となると思われる. また, プロナーゼによるアシストハッチング処理は, 畜産現場の採胚施設において特別な器材や技術を必要としない簡易な方法であり, 受胎率向上に有効な方法である.

## 総括

本研究は、牛受精卵移植における低品質胚の有効活用のための受胎率の向上を目的とした。黒毛和種供胚牛の Poor 胚(30%以上変性細胞があるもの)の採取状況は、1頭当たりの総胚数 18.0 個、正常胚数は 10.8 個で、低品質胚が 2.0 個を占めた。新鮮胚移植における胚の品質別の受胎率は、Good 胚 : 78.3%, Fair 胚 : 43.8%, Poor 胚 : 23.1%と、品質の低下にともなって受胎率が低下する傾向が確認された。

さらに低品質胚の受胎率改善を目的に、アシストハッチング処理として、マイクロニードルを用いた透明帯を切開する方法は、細胞塊のダメージが少なく短時間で容易に切開が可能であり、Poor 胚新鮮移植における受胎率は、44.4%と改善がみられ、さらに 2 胚移植を組み合わせることにより受胎率は 59.8%と高い受胎率が得られた。また倒立顕微鏡に替えて実態顕微鏡を用いた方法でも同様の成績が得られた。さらに流産率、双子率も含めて生産効率([産子数/受胎数]×受胎率)を算出すると 1 胚移植では処理区 : 38%, 無処理区 : 23%, 2 胚移植では処理区 : 63%, 無処理区 : 35%となり、透明帯切開処理による生産効率の改善がみられた。

次にタンパク質分解酵素であるプロナーゼを用いた透明帯菲薄化処理は、体外受精由来桑実胚の培養試験により、新鮮胚及び凍結胚の胚盤胞期への発生率に悪影響を与えず、胚のハッチング割合を有意に向上させた。さらに体内受精胚新鮮移植において Poor 胚において無処理区 27.5%に対しプロナーゼ区が 47.3%と有意に受胎率が向上した。

以上よりアシストハッチング処理は、低品質胚の有効活用技術の一助となると思われる

る。また、プロナーゼによるアシストハッチング処理は、畜産現場の採胚施設において特別な器材や技術を必要としない簡易な方法であり、受胎率向上に有効な方法である。

## 謝辞

本研究の遂行並び論文の作成にあたり、終始適切なご助言を賜り、また丁寧にご指導して頂きました山口大学共同獣医学部臨床獣医学講座田浦保穂教授(主指導教員)に心から感謝いたします。また、終始熱心なご指導を頂いた山口大学共同獣医学部臨床獣医学講座音井威重教授(副指導教員)並びに鹿児島大学共同獣医学部臨床獣医学講座窪田力教授(副指導教員)に深謝いたします。

本研究の遂行にご協力頂きました独立行政法人動物衛生研究所佐藤真澄疫学情報室長並びに鹿児島大学共同獣医学部臨床獣医学講座高木光博准教授に感謝いたします。

そして、本研究の趣旨をご理解し、現地移植試験に快くご協力して頂いた、なんこう受精卵移植研究会の皆様心から感謝いたします。

最後に本研究、論文作成に対しご理解頂いた長崎県農林技術開発センター畜産研究部門の職員の皆様に感謝いたします。

## Summary

The present study was conducted to examine whether the assisted hatching technique (AH) can improve the pregnancy rates of poor quality embryos after transfer to recipients. In Japanese Black bovine embryos, an average of 10.8 transferable embryos were collected from superovulated donor cows. Moreover, the poor quality embryos which had more than 30 % of degenerated cells appeared approximately 19% of all recovered transferable embryos. The pregnancy rate following transfer of fresh embryos classified as good, fair, and poor resulted in 78, 43, and 23%, respectively.

Therefore, the zona cutting (ZC) of embryos with good, fair, and poor quality was performed by making a cutting-slit in the zona pellucida using a needle under inverted microscope or stereomicroscope. The pregnancy rate of poor quality embryos with ZC treatment was significantly higher (44%,  $P < 0.05$ ) than that of poor quality embryos without ZC treatment. But the ZC treatment could not increase the pregnancy rate of good and fair quality embryos. There were no differences of the pregnancy rates in both single and twin transfer between the ZC treatment under the inverted microscope and stereomicroscope. The ZC treatment had a beneficial effect on the pregnancy rates of single transfer but not twin transfer. Moreover, the ZC treatment did not increase the abortion rate of recipients, irrespective of the

number of transferred embryos.

Furthermore, the effect of the assisted hatching (AH) processing using the pronase which is protein-splitting enzyme was verified for the purpose of the improvement in the pregnancy rate. As a result, in the culture examination using morulae which produced by in vitro fertilization, it has checked that pronase treatment did not have a bad influence on blastocyst development, and also significantly improved the hatching rate of embryos by both examinations of fresh and frozen-thawed embryos. Then, in the embryo transfer examination, it was suggested the possibility of that pronase treatment improves pregnancy rate following transfer of poor-quality fresh embryos.

In conclusion, AH treatment is considered to be technology effective in the improvement in the pregnancy rate. Especially AH processing by pronase is a simple method which does not need special equipment or technology for on-farm application, and is an effective method in the improvement in pregnancy rate of poor-quality fresh embryos.

引用文献

- [1] **Robertson I, Nelson RE.** Certification and identification of the embryo. *In: Stringfellow DA, Seidel SM (eds), Manual of the International Embryo Transfer Society, 3rd edn 1998: 103-134.*
- [2] **Hasler JF.** Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology 2001; 56: 1401-1415.*
- [3] **Lindner GM, Wright RW.** Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology 1983; 20: 407-416.*
- [4] **藤山雅照, 山口雅之, 奥徹, 山下達夫.** 1992. 低単位卵胞刺激ホルモン投与による過剰排卵処理. 長崎県畜産試験場研究報告 2:4-5.
- [5] **小西一之, 菊池工.** 1988. 黒毛和種における FSH による過剰排卵処理牛の採卵成績の検討. 畜産の研究 11:31-35.
- [6] **阪田昭次, 松岡一仁, 市野清博, 島屋佳子, 檜原孝正.** 2000. 牛の胚移植に関する研究(第6報)ー過剰排卵処理における FSH15mg 処理と HMG 処理による採卵成績についてー. 山口県畜産試験場報告 16:137-141.
- [7] **小西一之, 鈴木一男.** 1994. 黒毛和種の卵胞刺激ホルモンを用いた過剰排卵処理に対する供胚牛の産次の影響. *J.Reprod.Develop. 40:j13-j17.*
- [8] **小林政樹, 小野寺亨, 小玉康子, 嵯峨久光, 河西直樹.** 1995. 過剰排卵処理した黒毛和種供胚牛の胚生産成績. 東北農業研究 48:159-160.
- [9] **坂元克弥, 村田宏之, 山下秀幸, 佐藤敦男, 石田和昭.** 2011. 黒毛和種供胚



牛の年齢と発情後 7 日目回収胚の発育ステージの関係. 千葉県畜産総合研究センター研究報告 11:9-13.

- [10] **Balaban B, Urman B, Alatas C, Mercan R, Mumcu A, Isiklar A.** A comparison of four different techniques of assisted hatching, *Hum Reprod*, 17, 1239-1243 (2002)
- [11] **Blake DA, Forsberg AS, Johansson BR, Wikland M.** Laser zona pellucida thinning— an alternative approach to assisted hatching, *Hum Reprod*, 16, 1959-1964 (2001)
- [12] **Check JH, Hoover L, Nazari A, O'Shaughnessy A, Summers D.** The effect of assisted hatching on pregnancy rates after frozen embryo transfer. *Fertil Steril* 1996; 65: 254-257.
- [13] **Dokras A, Ross C, Gosden B, Sargent IL, Barlow DH.** Micromanipulation of human embryos to assist hatching. *Fertil Steril* 1994; 61: 514-520.
- [14] **Yano K, Yano C, Kubo T, Ohashi I, Maeda N, Fukaya T.** Chemical zona pellucida thinning with acidified Tyrode's solution: comparison between partial and circumferential techniques, *J Assist Reprod Genet*, 24, 471-475 (2007)
- [15] **Lopatarova M, Holy L, Vinkler A.** Effect on survival of micromanipulating the zona pellucida of bovine embryos. *Acta Vet Brno* 2001; 70: 49-56.
- [16] **Lyu QF, Wu LQ, Li YP, Pan Q, Liu DE, Xia K, Liang DS, Cai F, Long ZG,**

- Dai HP, Xia JH.** An improved mechanical technique for assisted hatching. *Hum Reprod* 2005; 20: 1619-1623.
- [17] **Numabe T, Oikawa T, Kikuchi T, Horiuchi T.** Production efficiency of Japanese black calves by transfer of bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology* 2000; 54: 1409-1420.
- [18] **Peterson AJ, Lee RS.** Improving successful pregnancies after embryo transfer. *Theriogenology* 2003; 59: 687-697.
- [19] **Kubisch HM, Sirisathien S, Bosch P, Hernandez-Fonseca HJ, Clements G, Liukkonen JR, Brackett BG.** Effects of developmental stage, embryonic interferon-tau secretion and recipient synchrony on pregnancy rate after transfer of in vitro produced bovine blastocysts. *Reprod Domest Anim* 2004; 39: 120-124.
- [20] **Heyman Y, Chesne P, Chupin D, Menezo Y.** Improvement of survival rate of frozen cattle blastocysts after transfer with trophoblastic vesicles. *Theriogenology* 1987; 27: 477-484.
- [21] **Hashiyada Y, Okada M, Imai K.** Transition of the pregnancy rate of bisected bovine embryos after co-transfer with trophoblastic vesicles prepared from in vivo-cultured in vitro-fertilized embryos. *Journal of Reproduction and Development* 2005; 51:749-756.
- [22] **Kubota C, Yang X, Dinnyes A, Todoroki J, Yamakuchi H, Mizoshita K,**

- Inohae S, Tabara N.** In vitro and in vivo survival of frozen-thawed bovine oocytes after IVF, nuclear transfer, and parthenogenetic activation, *Mol Reprod Dev* 1998; 51, 281-286.
- [23] **Rosenkrans JrCF, First NL.** Culture of bovine zygotes to the blastocyst stage; effect of amino acids and vitamins, *Theriogenology* 1991, 35,266.
- [24] **Abe H, Matsuzaki S, Hoshi H.** Ultrastructural differences in bovine morulae classified as high and low qualities by morphological evaluation, *Theriogenology* 2002 57(4), 1273-83 .
- [25] **Alvarez RH, Meneghel M, Martinez AC, Pires RM, Schammas E.** Transfer of bovine blastocysts derived from short-term in vitro culture of low quality morulae produced in vivo, *Reprod Domest Anim*, 2008 43(3), 57-60.
- [26] **Iwasaki S, Yoshida N, Ushijima H, Watanabe S, Nakahara T.** Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized in vitro and in vivo, *J Reprod Fert* 1990; 90, 279-284.
- [27] **Niemann H, Pryor JH, Bondioli KR.** Effects of slitting the zona pellucida and its subsequent sealing on freeze-thaw survival of Day 7 bovine embryos, *Theriogenology* 1987; 28, 675-681.
- [28] **Kane MT.** A survey of the effects of proteases and glycosidases on culture of rabbit morulae to blastocysts, *J Reprod Fert* 1986; 78,

225-230.

- [29] **Antionori S, Selman HA, Caffa B, Panci C, Dani GL, Versaci C.** Zona opening of human embryos using a non-contact UV laser for assisted hatching in patients with poor prognosis of pregnancy, *Hum Reprod* 1996; 11, 2488-2492.

表1 黒毛和種における過剰排卵処理方法 (FSH14単位,4日間減量投与)

投与時期	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	6日目
朝	FSH 4単位	FSH 2単位	FSH 1単位	FSH 1単位		人工授精
			PG 20mg			
夕	FSH 3単位	FSH 2単位	FSH 1単位		人工授精	
			PG 20mg		Gn-RH 100 μg)	

表2 採胚成績

頭数	総胚数	正常胚数	胚のランク				未受精
			Good	Fair	Poor	ランク外	
310	5,592	3,340	2,086	622	632	943	1,309
1頭当たり成績	18.0±13.0	10.8±9.0	6.7	2.0	2.0	3.0	4.2
	総胚数に占める割合(%)	59.7	37.3	11.1	11.3	16.9	23.4
	正常胚数に占める割合(%)		62.5	18.6	18.9		

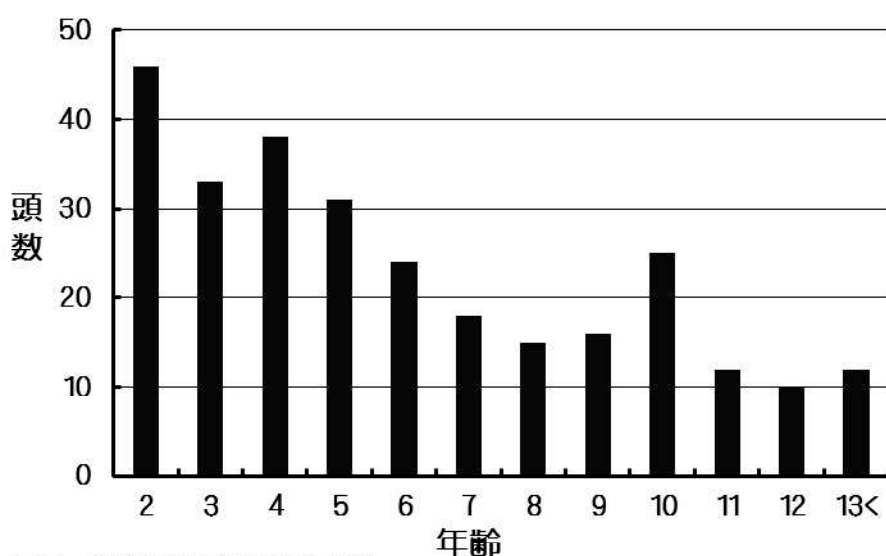


図1 採胚時年齢別の頭数

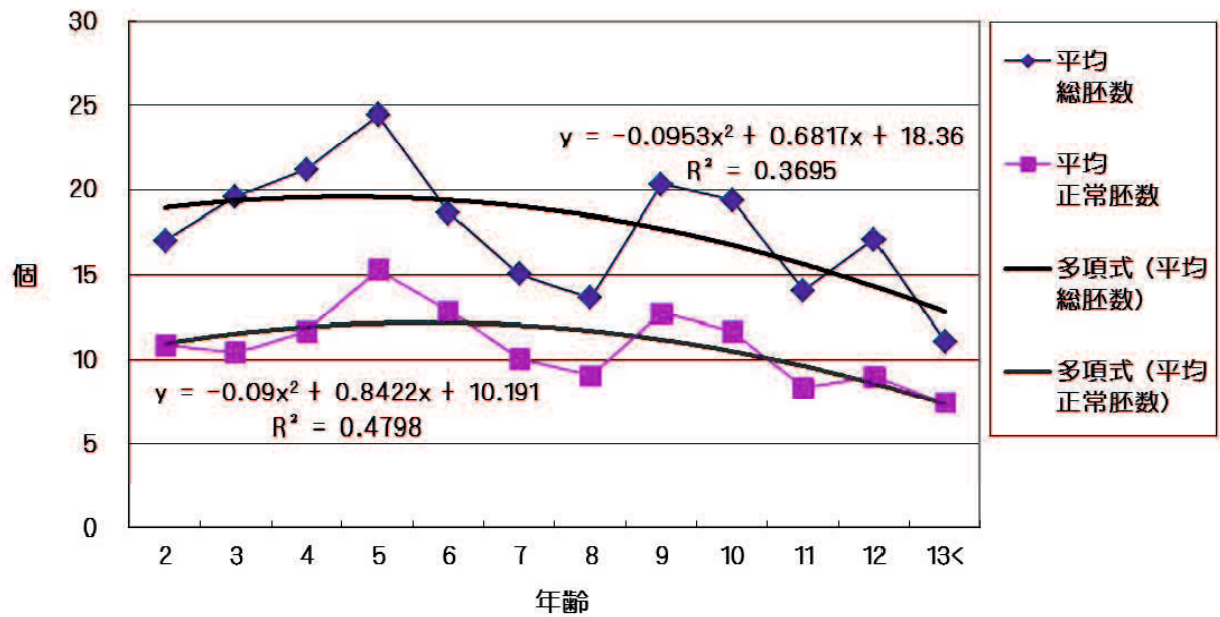


図2 採胚時年齢別の採胚成績

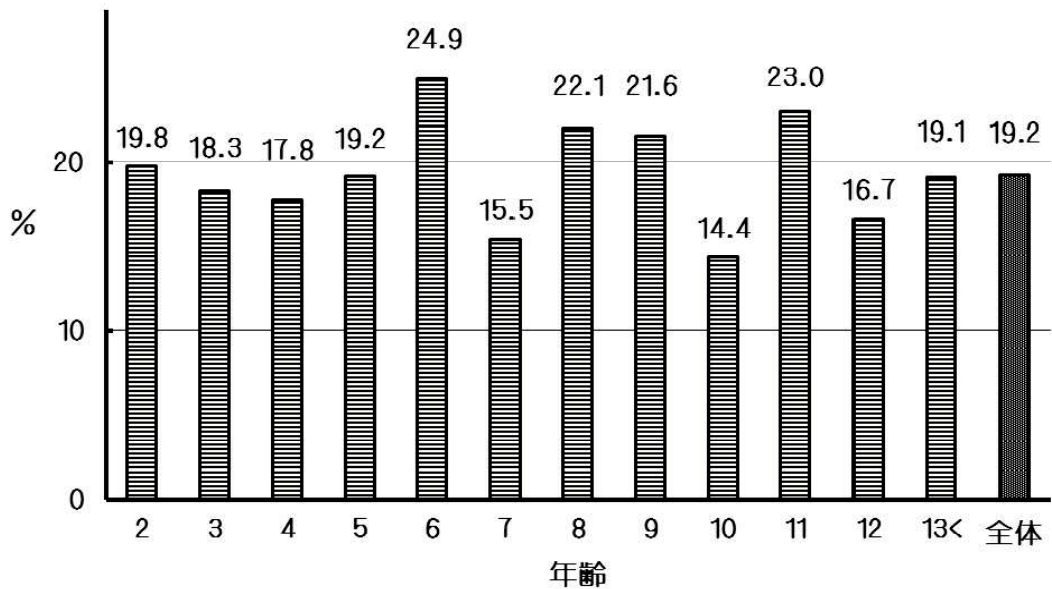


図3 供胚牛の採胚時年齢と正常胚に占めるPoor胚の割合

表3 供胚牛の系統別の採胚時年齢と主な種雄牛

系統	頭数	採胚時年齢 の平均	主な種雄牛
気高系	81頭	4.3	平茂勝（鹿児島、70頭）
田尻系	91頭	7.4	安平（宮崎、26頭）、紋次郎（24頭） 安福165の9（13頭）
藤良系	83頭	7.1	北国7の8（48頭）、糸晴（佐賀、18頭）、 糸福（大分、10頭）
合計	255頭	6.3	

表4 供胚牛の父種雄牛の系統による採胚成績

系統		総胚数	正常胚数	胚のランク別個数				未受精
				Good	Fair	Poor	ランク外	
気高系 (n=81)	平均	25.1±16.2 <sup>a</sup>	14.4±10.6 <sup>a</sup>	8.6	2.5	3.2	5.3	5.5
	総胚数に占める割合(%)		57.2	34.2	10.1	12.8	20.9	21.9
	正常胚数に占める割合(%)			59.9	17.7	22.4		
田尻系 (n=91)	平均	16.5±10.7 <sup>b</sup>	10.8±8.6 <sup>c</sup>	7.5	1.5	1.8	2.0	3.7
	総胚数に占める割合(%)		65.6	45.6	9.2	10.8	12.3	22.1
	正常胚数に占める割合(%)			69.6	14.0	16.4		
藤良系 (n=83)	平均	16.0±8.9 <sup>b</sup>	9.8±7.4 <sup>b,c</sup>	5.9	2.1	1.9	2.7	3.4
	総胚数に占める割合(%)		61.7	36.7	13.3	11.7	17.1	21.3
	正常胚数に占める割合(%)			59.6	21.5	18.9		
合計 (n=255)	平均	19.1±12.9	11.6±9.2	7.3	2.0	2.3	3.3	4.2
	総胚数に占める割合(%)		61.0	38.5	10.7	11.9	17.2	21.8
	正常胚数に占める割合(%)			63.1	17.5	19.4		

注) 平均値±標準偏差

同列異符号間に有意差あり a-b:P<0.01, a-c:P<0.05

表4 供胚牛の父種雄牛の系統による採胚成績

系統	総胚数	正常胚数	胚のランク別個数				未受精	
			Good	Fair	Poor	ランク外		
気高系 (n=81)	平均	25.1±16.2 <sup>a</sup>	14.4±10.6 <sup>a</sup>	8.6	2.5	3.2	5.3	5.5
	総胚数に占める割合(%)		57.2	34.2	10.1	12.8	20.9	21.9
	正常胚数に占める割合(%)			59.9	17.7	22.4		
田尻系 (n=91)	平均	16.5±10.7 <sup>b</sup>	10.8±8.6 <sup>c</sup>	7.5	1.5	1.8	2.0	3.7
	総胚数に占める割合(%)		65.6	45.6	9.2	10.8	12.3	22.1
	正常胚数に占める割合(%)			69.6	14.0	16.4		
藤良系 (n=83)	平均	16.0±8.9 <sup>b</sup>	9.8±7.4 <sup>b,c</sup>	5.9	2.1	1.9	2.7	3.4
	総胚数に占める割合(%)		61.7	36.7	13.3	11.7	17.1	21.3
	正常胚数に占める割合(%)			59.6	21.5	18.9		
合計 (n=255)	平均	19.1±12.9	11.6±9.2	7.3	2.0	2.3	3.3	4.2
	総胚数に占める割合(%)		61.0	38.5	10.7	11.9	17.2	21.8
	正常胚数に占める割合(%)			63.1	17.5	19.4		

注) 平均値±標準偏差

同列異符号間に有意差あり a-b P<0.01, a-c P<0.05

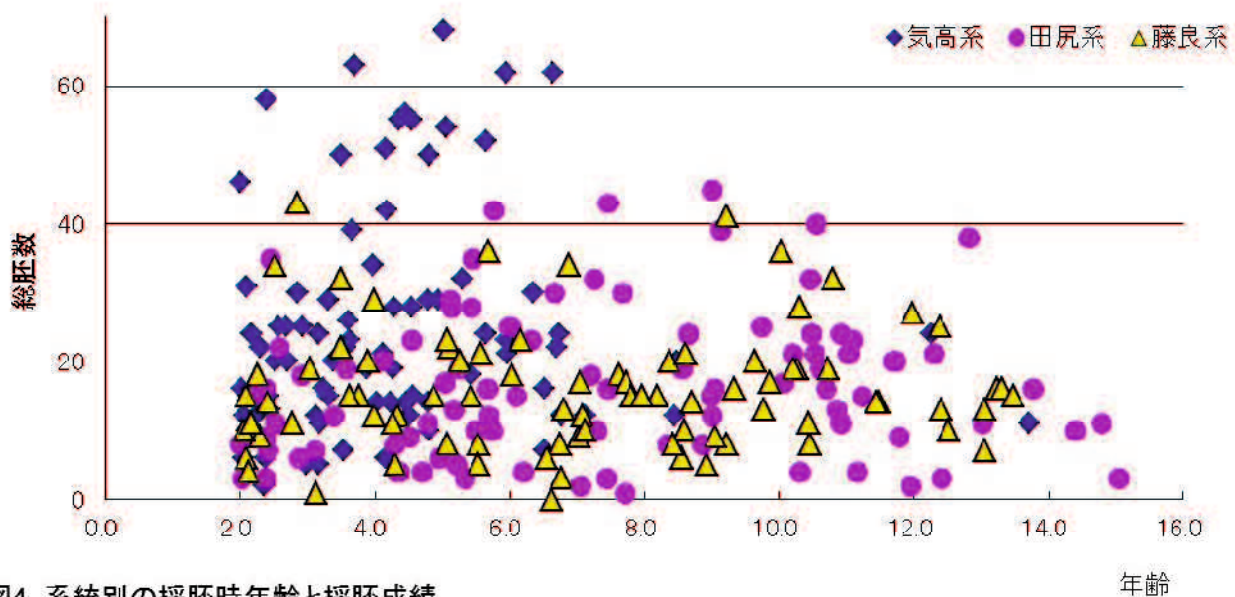


図4 系統別の採胚時年齢と採胚成績



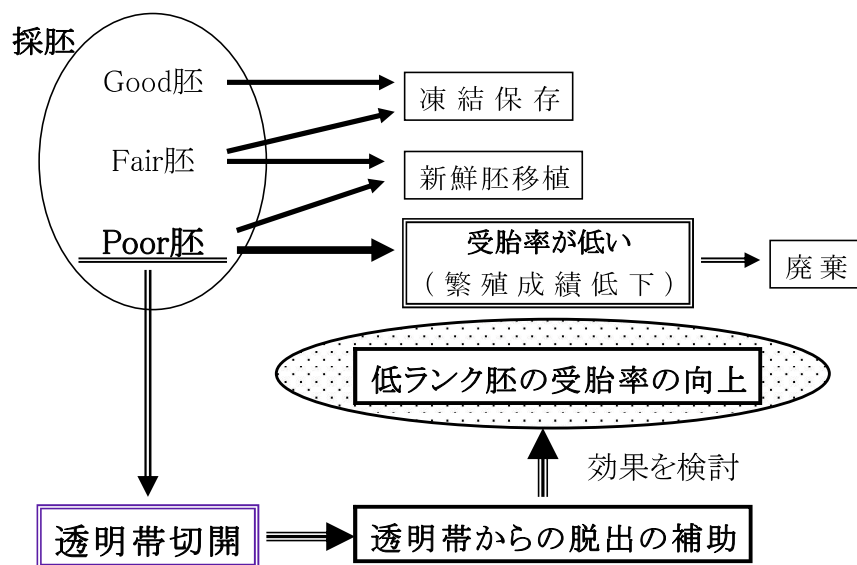
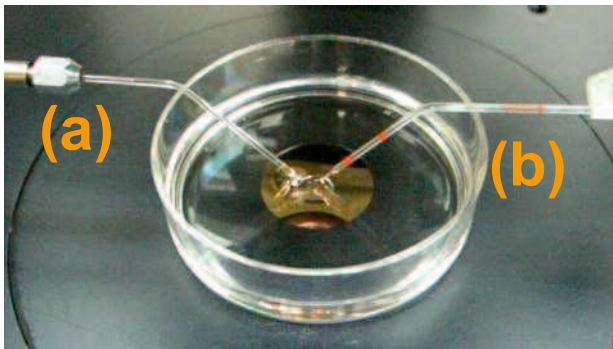


図5 本試験の背景・目的



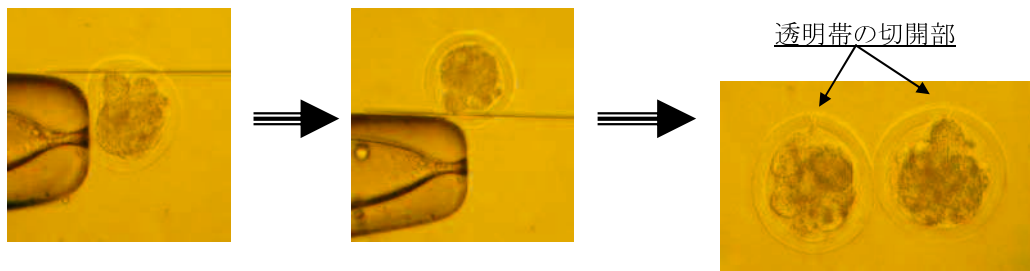
a: 実体顕微鏡, b: 三次元ジョイスティック油圧マイクロマニピュレーター,  
c: ジョイスティックマイクロマニピュレーター, d: マイクロインジェクター,  
e: マニピュレーター(粗動用), f: マニピュレーター取付アダプター,  
g: ボールジョイント, h: ピペットホルダー

図6 実体顕微鏡に取り付けたマニピュレーター



中央：PBS50 $\mu$ lドロップにミネラルオイルを重層  
 (a)：ホールディングピペット，(b)：カッティングニードル

図7 透明帯切開処理



ホールディングピペットにより  
 胚を保定、変性部側にカッ  
 ティングニードルを穿刺

カッティングニードルと  
 ホールディングピペットを  
 擦り合わせ透明帯を切開

図8 透明帯切開処理の方法

表5 透明帯切開処理の有無による新鮮1胚移植の受胎成績

品質	無処理区			透明帯切開処理区		
	移植頭数	受胎頭数	受胎率	移植頭数	受胎頭数	受胎率
Good胚	23	18	78.3 <sup>a</sup>	12	9	75.0
Fair胚	16	7	43.8 <sup>b</sup>	42	19	45.2
Poor胚	26	6	23.1 <sup>b,A</sup>	108	48	44.4 <sup>B</sup>

\*  $\chi^2$ 検定 a-b間およびA-B間に有意差 ( $p < 0.05$ )

表6 Poor胚における透明帯切開処理の有無および2胚移植による受胎成績

処理区分	透明帯切開処理区			無処理区		
	移植頭数	受胎頭数	受胎率	移植頭数	受胎頭数	受胎率
胚移植	倒立顕微鏡	56	24	42.9		
	実体顕微鏡	52	24	46.2		
	計	108	48	44.4 <sup>a</sup>	26	6
2胚移植	倒立顕微鏡	35	23	65.7		
	実体顕微鏡	77	44	57.1		
	計	112	67	59.8 <sup>c</sup>	14	6

$\chi^2$ 検定 異符号間に有意差 (a-b , a-c : p<0.05 , b-c : p<0.01)

表7 Poor胚新鮮移植による子牛生産成績

区 分	受胎数	流産数	流産率	産子数	双子率	受胎率	生産効率	
			(%) <sup>注1</sup>	(内双子数)	(%) <sup>注2</sup>	(%)	(%) <sup>注3</sup>	
胚移植	切開処理区	31	5	16.1	27 (1)	3.8	44.4	38.7
	無処理区	5	0	0.0	5 (0)	0.0	23.1	23.1
2胚移植	切開処理区	35	10	28.6	37 (12)	48.0	59.8	63.2
	無処理区	6	2	33.3	5 (1)	25.0	42.9	35.8

注1: 流産率=流産数/受胎数

注2: 双子率=双子数/ (受胎数-流産数)

注3: 生産効率=産子数/受胎数×受胎率 (\*受胎率は表6の結果)

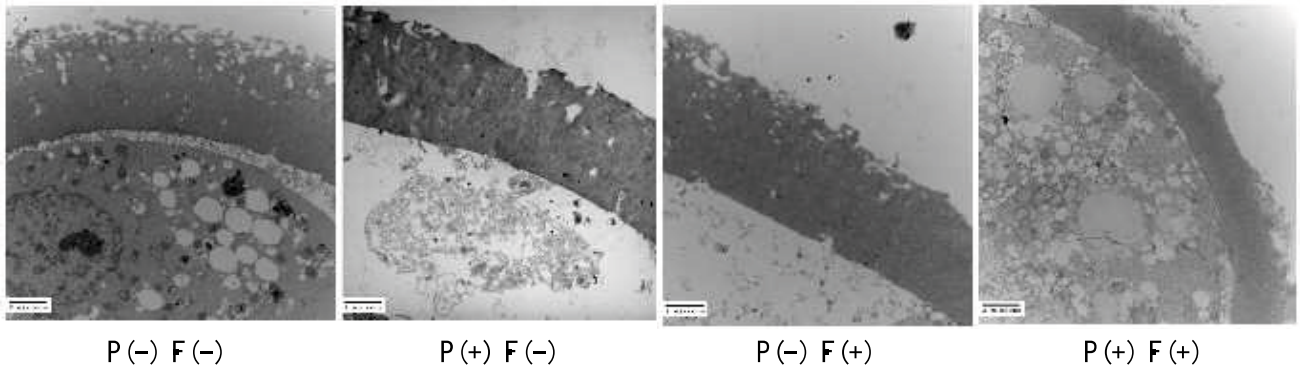


図9 プロナーゼ処理の有無,凍結融解の有無による透明帯の変化  
 ※P(+) プロナーゼ処理有り,P(-) プロナーゼ処理無し,F(+) 凍結融解有り,F(-) 凍結融解無し

表8 プロナーゼ処理の有無による透明帯の厚さの比較

区	計測数	透明帯の厚さ (μm)
P(-) F(-)	16	4.95 ± 1.75 <sup>a</sup>
P(+) F(-)	16	3.66 ± 0.98 <sup>b</sup>
P(-) F(+)	16	4.74 ± 1.31 <sup>a</sup>
P(+) F(+)	16	3.88 ± 0.97 <sup>b</sup>

平均±標準偏差

※ P(+) プロナーゼ処理有り,P(-) プロナーゼ処理無し

F(+) 凍結融解有り,F(-) 凍結融解無し

<sup>a-b</sup> 異符号間に有意差あり (p<0.05)

表9 体外受精胚におけるアシストハッチング処理の有無が胚の発育に及ぼす影響 新鮮胚)

試験区	供試胚数	胚盤胞発生数 (%)*	ハッチング胚数 (%)**	ハッチト胚数 (%)***	合計胚数 (%)****
無処理区	92	77 (83.7)	16 (20.8) <sup>a</sup>	15 (19.5) <sup>a</sup>	31 (40.3) <sup>a</sup>
プロナーゼ区	101	84 (83.2)	21 (25.0)	37 (44.0) <sup>c</sup>	58 (69.0) <sup>c</sup>
スリット区	97	80 (82.5)	30 (37.5) <sup>b</sup>	29 (36.3) <sup>b</sup>	59 (73.8) <sup>c</sup>

プロナーゼ区 3%プロナーゼを用いた透明帯菲薄処理  
スリット区 マイクロニードルを用いた透明帯切開処理

<sup>a-b</sup> 同列異符号間に有意差有り ( $p < 0.05$ ).

<sup>a-c</sup> 同列異符号間に有意差有り ( $p < 0.01$ ).

\*胚盤胞発生数/供試胚数

\*\*ハッチング胚数/胚盤胞発生数

\*\*\*ハッチト胚数/胚盤胞発生数

\*\*\*\* (ハッチング胚数+ハッチト胚数)/胚盤胞発生数

表10 体外受精胚におけるアシストハッチング処理の有無が胚の発育に及ぼす影響 凍結胚)

試験区	供試胚数	胚盤胞発生数 (%)*	ハッチング胚数 (%)**	ハッチト胚数 (%)***	合計胚数 (%)****
無処理区	155	57 (36.8)	8 (14.0) <sup>a</sup>	10 (17.5) <sup>a</sup>	18 (31.6) <sup>a</sup>
プロナーゼ区	141	53 (37.6)	8 (15.1)	27 (50.9) <sup>c</sup>	35 (66.0) <sup>c</sup>
スリット区	145	52 (35.9)	17 (32.7) <sup>b</sup>	19 (36.5) <sup>b</sup>	36 (69.2) <sup>c</sup>

プロナーゼ区 3%プロナーゼを用いた透明帯菲薄処理  
スリット区 マイクロニードルを用いた透明帯切開処理

<sup>a-b</sup> 同列異符号間に有意差有り ( $p < 0.05$ ).

<sup>a-c</sup> 同列異符号間に有意差有り ( $p < 0.01$ ).

\*胚盤胞発生数/供試胚数

\*\*ハッチング胚数/胚盤胞発生数

\*\*\*ハッチト胚数/胚盤胞発生数

\*\*\*\* (ハッチング胚数+ハッチト胚数)/胚盤胞発生数

表11 体内受精胚におけるアシストハッチング処理の有無が受胎率に及ぼす影響

凍結の有無	試験区	胚の品質									計			
		Good			Fair			Poor			移植数	受胎数	受胎率(%)	
		移植数	受胎数	受胎率(%)	移植数	受胎数	受胎率(%)	移植数	受胎数	受胎率(%)				
無 (新鮮胚)	無処理区	25	18	72.0%	29	16	55.2%	51	14	27.5%	<sup>a</sup>	105	48	45.7%
	プロナーゼ区	21	16	76.2%	23	14	60.9%	55	26	47.3%	<sup>b</sup>	99	56	56.6%
有 (凍結胚)	無処理区	84	47	56.0%	61	28	45.9%	31	7	22.6%		176	82	46.6%
	プロナーゼ区	48	26	54.2%	38	18	47.4%	36	14	38.9%		122	58	47.5%
	スリット区	30	14	46.7%	32	15	46.9%	19	7	36.8%		81	36	44.4%

<sup>a-b</sup> 異符号間に有意差あり (p<0.05)