

研究テーマ： 優良な高泌乳牛の効率的な増産に関する研究： 性判別精子を用いて雌胚を高率に作出できる新規な体外成熟技術の開発	
研究代表者： 生命環境学部 生命科学科 教授 堀内 俊孝	連絡先： toshi@pu-hiroshima.ac.jp
共同研究者： 大田 毅 (助教), 可兒 知加子 (博士課程 3年), 部長 吉上 渉, 副主任研究員 田中 基充, 副主任研究員 日高 健雅 (広島県立総合技術研究所畜産技術センター)	
【研究概要】 高泌乳牛から経膈採卵 (OPU) で採取した卵胞卵子を体外成熟 (IVM), 体外受精 (IVF) または顕微授精 (ICSI) による子牛生産が行われている。この技術では, IVM において発生能の高い卵子を作出することが重要である。本研究では, まず, と畜からの卵胞卵子を用い, 体外成熟培地へのジブチリル cAMP (dbcAMP) 添加は, ICSI または IVF による胚盤胞率を高めることを明らかにした。次いで, 広島県の実施している体外受精胚生産・移植事業の OPU-IVM-IVF において dbcAMP 添加は胚盤胞率と子牛生産率を高め, OPU による移植胚生産の効率を向上させた。	

【研究内容・成果】

1. 目的

泌乳中のホルスタイン種から経膈採卵 (OPU) により採取した未成熟卵子の体外成熟 (IVM) による発生率は低いことから, IVM を改善する。本研究では, IVM 培地への cAMP 充進剤の添加が核成熟 と体外受精 (IVF) 後の胚発生に及ぼす影響を明らかにする。

2. 方法

と畜卵巣また生体牛から OPU により採取した卵胞卵子の IVM を行った。IVM 後, 体外受精 (IVF) または顕微授精 (ICSI) を行い, 胚盤胞への発生率を調べた。

① IVM 培地のグルコース濃度の影響

5, 10 mM グルコースの IVM 培地への添加が IVF 後の胚発生に及ぼす影響を調べた。

② 侵入性アデニレートシクラーゼ (iAC) 添加の影響

10 μ M iAC の IVM 培地への添加が IVF 後の胚発生に及ぼす影響を調べた。

③ ジブチリル cAMP (dbcAMP) 添加の影響

0, 10, 100 μ M の dbcAMP の IVM 培地への添加が ICSI または IVF 後の胚発生に及ぼす影響を調べた。

④ 広島県の体外受精胚生産・移植事業における OPU・IVM・IVF の成績

10 μ M dbcAMP 添加が胚盤胞率と胚移植による受胎率に及ぼす影響を調べた。

3. 結果

① IVM 培地へのグルコース添加濃度による IVF 後の胚盤胞率に有意な差はなかった。

② IVM 培地への iAC 添加による IVF 後の胚盤胞率に有意な差はなかった。

③ 0, 10, 100 μ M dbcAMP 添加による ICSI 後の胚盤胞率は各 23.7%, 56.1%, 42.7% (図 1) IVF 後の胚盤胞率は各 23.5%, 41.4%, 33.2% (図 2) となり, 10 μ M dbcAMP 添加での胚盤胞率が最も高くなった。

④ 広島牛受精卵供給システム整備事業の OPU・IVM・IVF において, 10 μ M dbcAMP 添加区の胚盤胞率は 37.3% となり, 無添加区の 30.3% より有意に高くなった。また, dbcAMP 添加区においては, すべての OPU において胚盤胞が得られ, 移植胚の生産率は向上した (図 3)。さらに, 当該事業で生産した体外受精胚の移植後の受胎率は, dbcAMP 添加区では 70.0% となり, 無添加区の 55.6% と比べ, 飛躍的に向上した (図 4)。

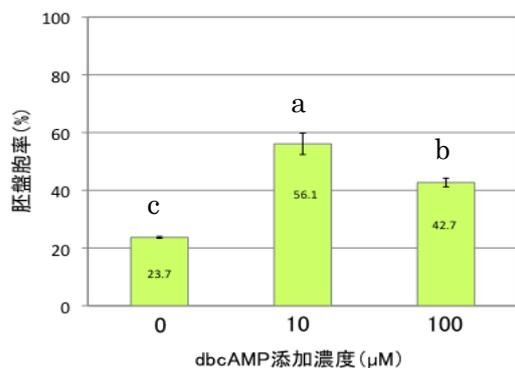


図 1. IVM 培地への dbcAMP 添加が ICSI 後の胚盤胞率に及ぼす影響 (a-c: $P < 0.05$)

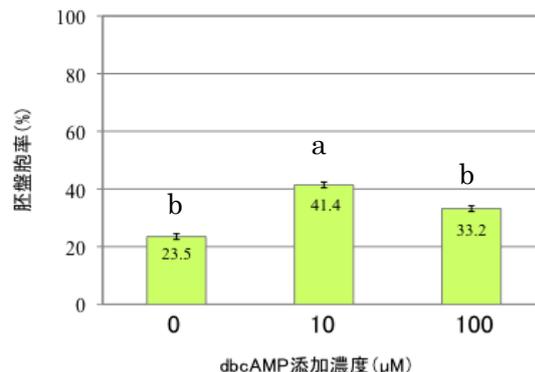


図 2. IVM 培地への dbcAMP 添加が IVF 後の胚盤胞率に及ぼす影響 (a, b: $P < 0.05$)

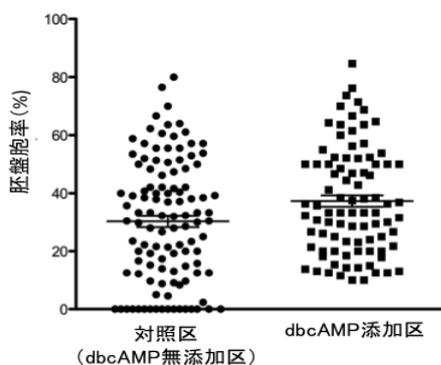


図 3. OPU・IVM・IVF における IVM 培地への dbcAMP 添加が胚盤胞率に及ぼす影響

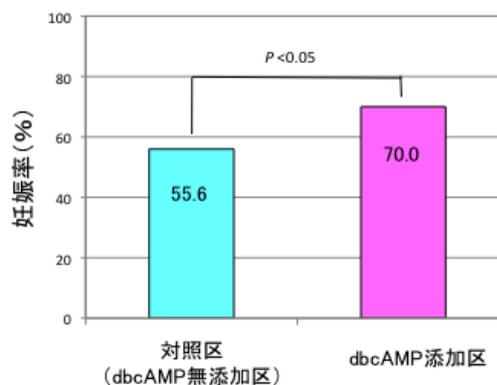


図 4. IVM 培地への dbcAMP 添加が胚移植による妊娠率に及ぼす影響

4. まとめ

IVM 培地への 10 μM dbcAMP 添加は、IVF または ICSI 後の移植可能胚 (胚盤胞) の生産率、胚移植による妊娠率 (受胎率) を向上させた。このことは、高品質な移植可能胚の生産率が高まることから、広島県の畜産振興に寄与できる成果と考えられる。

5. 平成 23 年度の成果公表

- 1) Kani, C., Kuwahata, A., Ochi, M., Horiuchi, T. Effect of dibutyryl cAMP together with FSH and EGF during in vitro maturation on sperm aster formation and blastocyst development after intracytoplasmic sperm injection. *J. Mamm. Ova Res.* 28, 131-138, 2011.
- 2) 堀内俊孝・可兒知加子・桑波田暁子・越知正憲・日高健雅・松雪暁子・山田博道, 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核成熟と胚発生に及ぼす影響, 第 105 回日本繁殖生物学会大会, 9.5-8.2012, つくば(学会発表).
- 3) 日高健雅・松雪暁子・今井佳積・田中基充・山本祐輔・横田文彦・山田博道・堀内俊孝, 侵入性アデニレートシクラーゼ, またはジブチリルcAMP添加培地による体外成熟がウシ体外受精卵の発生能に及ぼす影響. 第19回日本胚移植研究会大会, 9.27-28.2012, 富山(学会発表).
- 4) 松雪暁子・日高健雅・今井佳積・田中基充・山本祐輔・横田文彦・山田博道・堀内俊孝, ジブチリルcAMP添加培地 (FSH及びEGF含有) による成熟培養がOPU-IVF受精卵の発生能及び受胎率に及ぼす影響, 第19回日本胚移植研究会大会, 9.27-28.2012, 富山(学会発表).

