

高受胎率が望める牛受精卵の体外生産・凍結保存・選抜技術の開発

ソムファイ タマス ((独)農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所)
somfai@affrc.go.jp

牛の繁殖技術として、高受胎率が望める体外受精卵の生産技術の開発が求められている。候補者は、まず、高い発生率が得られる未成熟卵子および受精卵の体外培養方法を、ついで、受精卵の発生パターンを目安にした受胎率が高い体外受精卵の選抜手法を開発した。さらに、発生培地への L-カルニチン添加により、受精卵の発生や凍結の妨げになる脂肪を減少させ、受精卵の体外発生率と凍結融解後の生存性を向上させることに成功した。

はじめに

1985年に世界に先駆けて畜産草地研究所(旧畜産試験場)で開発された体外受精卵移植技術は、食肉処理場で得られる卵巣から未成熟卵子を取り出して体外で成熟・受精・発生培養を行い、子宮内移植が可能な状態の受精卵を生産する画期的な繁殖技術である。しかし、この技術によって、わが国で生産される子牛は年間 3,357 頭(2008 年度)にとどまっている。その理由として、日本では移植に適した時期の受卵牛の選択が困難であるため、新鮮卵と比べて扱いが容易な凍結受精卵の移植が一般に普及しているが、体外受精卵は体内受精卵と比較して受精卵の品質が低いために、耐凍性や受胎率が低いことが上げられる(図1)。この状況を打破するには、体外受精卵の培養技術や凍結保存技術を高度化し、高受胎率が望める高品質な体外受精卵を生産する必要がある。

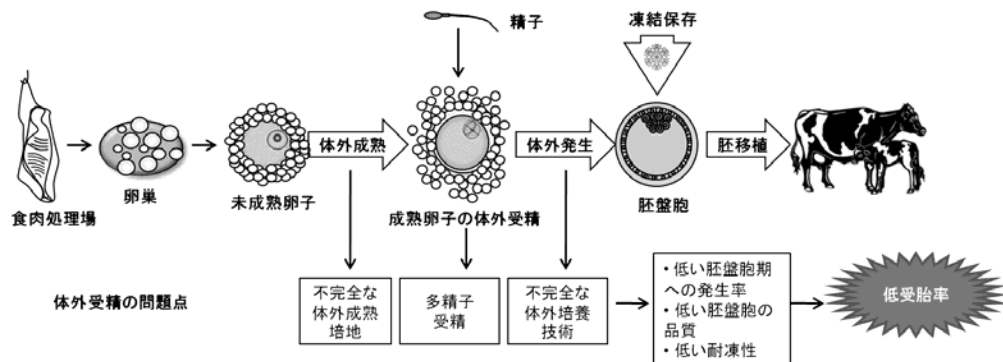


図1. ウシ体外受精胚作出技術と各段階における問題点

牛体外生産受精卵の培養方法及び高品質受精卵の選別方法の改良

体外受精卵は、一般的に 20~100 個の卵子をグループ培養しているが、この培養方法では、個々の受精卵を区別して発生経過を追跡することができない。異常な発生経過をたどった受精卵を廃棄し、受精卵移植に用いる高品質な受精卵を選別するためには、個々の受精卵の発生経過の観察が重要である。微小滴による受精卵の個別培養方法も検討されているが、他の受精卵が産生する各種因子が作用できないために効率的な発生率が期待できない。そこで、同一の培養液滴中での個々の受精卵の発生を追跡可能な培養方法について検討を行い、well-of-the-well dish [2]や polyethylene terephthalate mesh [3]を用いた培養が、個々の受精卵を観察可能な培養方法であることを明らかにし、タイムラプスシネマトグラフィに

よる観察が可能な新たな培養皿の開発[4]へとつながった。また、タイムラプスシネマトグラフィによる観察により、体外受精卵の約半数は異常な卵割を示し、これらの受精卵は胚盤胞期への発生率が低く、発生した胚盤胞の多くが染色体異常を示すことをあきらかにした(図2) [1]。そこで、第1卵割の時間と卵割様式に基づいた体外受精卵の選別基準を作製し、タイムラプスシネマトグラフィによる個々の受精卵の発生過程の観察による高い受胎能を持つ受精卵の選別を可能とした[5]。

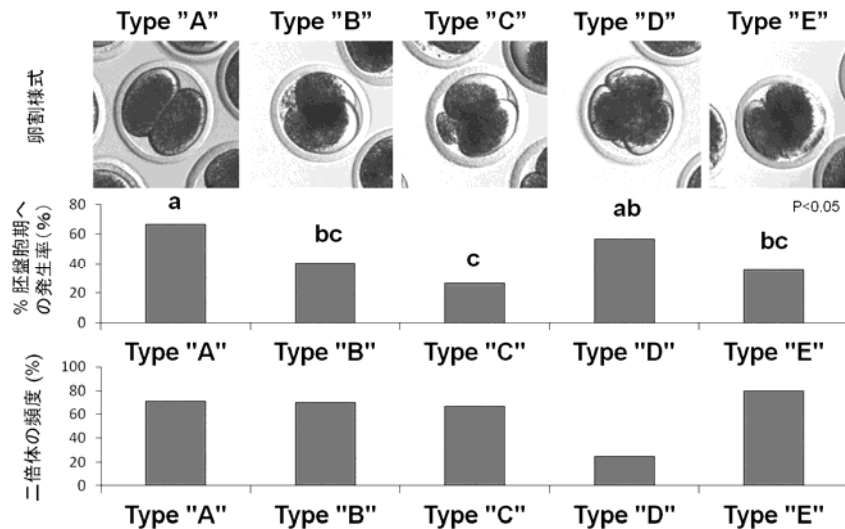


図2. 第1卵割における卵割様式が発生能力と染色体数の正常性(二倍体)に及ぼす影響

体外成熟が牛卵子の細胞質因子に及ぼす影響の解明

受精卵移植における受胎率を高めるための高品質な体外受精卵の選別が重要であることは明らかであるが、体外受精卵の発生率も改善する必要がある。卵子の品質は、これまで受精卵の発生率で判定されてきた。体外成熟卵子は、核成熟という点では体内成熟卵子と遜色がないが、体外成熟卵子の細胞質成熟の不完全さが、体外受精卵の発生率が低い原因と考えられている。体外成熟卵子の発生能に関する細胞質因子については、いまだあきらかにされておらず、我々は、受精卵の発生能に関する卵子の細胞質因子に関する基礎的な研究を行った。发育を完了した卵子は、転写という観点からすれば不活性であり、卵子に蓄えられた母由来の mRNA が、受精卵の初期発生に重要な役割をはたす。15 度での卵巢の保存により、いくつかの遺伝子の mRNA 量が有意に減少するが、それらの遺伝子のうち、Na⁺/K⁺ transporting ATP-ase (ATP1A1) 遺伝子の mRNA 量と胚盤胞期への発生率に正の相関があり[6]、ATP1A1 遺伝子は、牛受精卵の初期発生に関するマーカー遺伝子となる可能性がうかがわれた。また、牛の体外成熟において、卵胞液や血清は、卵子の成熟率と発生能を向上させることが知られている。しかし、これらは未知の因子を含んでおり、研究面からは不適切である。一方、これらの物質が卵子の細胞質に及ぼす影響を解明することは、成分既知成熟培地の開発のためにも重要である。例えば、卵胞液中の有効因子を同定できれば、同定した物質を用いることにより体外成熟卵子の能力を高めることが可能となる。我々は、卵胞液が牛卵子の細胞質の性状や発生能に及ぼす影響を検討し、成熟培地への卵胞液の添加により活性型ミトコンドリアの卵子中心部への分布が促進され、ミトコンドリアの ATP 産生が増加することを明らかにした。さらに、正常な精子侵入のためには卵子中の ATP 含量が 1pmol 以上必要であった[7]。すなわち、卵胞液による卵子の能力向上は、ミトコンドリア活性の維持による

可能性が考えられた。我々は、さらに卵胞液に多量に含まれるメラトニンが体外成熟に及ぼす影響を検討し、成分既知成熟培地へのメラトニン添加は、牛卵子の体外成熟率とミトコンドリア活性を高めることをあきらかにした[8]。

牛卵子及び体外受精卵の細胞内脂肪性状の改変による耐凍性の向上

凍結保存技術は牛受精卵の保存と輸送を可能とする重要な技術であり、使用する時期と場所を自由に設定することを可能とする。しかし、牛体外受精卵は、高濃度の脂肪を含んでおり、そのことが耐凍性の低下を招いている。そこで、脂肪代謝を促進するL-カルニチンを用いて牛受精卵及び卵子中の脂肪の性状を改変し、耐凍性が改善するかを検討した。その結果、ウシ体外受精卵の発生培地へのL-カルニチン添加により、胚盤胞期への発生率が高まり、胚盤胞の脂肪含量が減少するとともに、緩慢凍結法における凍結・融解後の生存性が向上した(図3)[9]。さらに、体外成熟培地へのL-カルニチン添加は、体外成熟後にガラス化保存した卵子の発生率を改善することをあきらかにした[10]。すなわち、L-カルニチンは、脂肪代謝の亢進による細胞内脂肪の減少により耐凍性を向上させるとともに胚発生率をも向上させた。

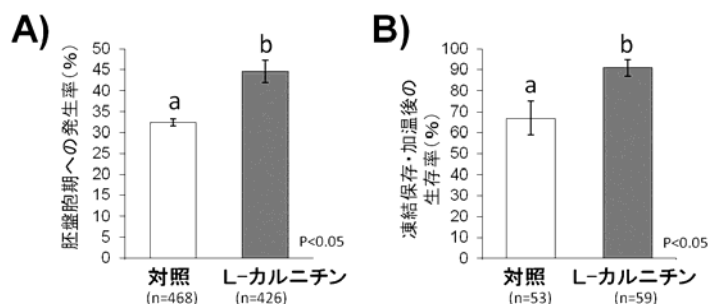


図3. L-カルニチン添加の有無が(A)胚盤胞期への発生率および(B)凍結保存・加温後の生存性

今後の展開

今後の目標は、体内成熟卵子に匹敵する発生能を持つ体外成熟卵子を得るための体外成熟培養方法の開発である。そのためにも、体外成熟卵子と体内成熟卵子の成熟・受精・発生過程における細胞質の性状や遺伝子発現等を比較し、発生能に影響を与える細胞質因子についてさらなる研究を行う。将来的には、生体から卵子を吸引採取する方法(OPU)と性選別精液による体外受精卵の生産を組み合わせるような生産現場に適応可能な生殖補助技術を開発していきたい。

謝辞

本研究の実施にあたってご協力をいただきました(独)家畜改良センター、大日本印刷および(独)農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所の皆様にご礼申し上げます。特に、ご支援、ご指導を賜りました(独)家畜改良センターの今井敬博士、(独)農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所の永井卓博士、渡辺伸也博士、下司雅也博士に深甚なる感謝を申し上げます。また、本研究を共同して実施していただいた秋田県農林水産技術センター畜産試験場の高橋利清氏、タイ・チュラロンコン大学のVibuntita Chankitisakul嬢に深謝いたします。さらに、本賞にご推薦をいただきました畜産草地研究所の土肥宏志所長をはじめ関係各位の皆様にご深く感謝いたします。

引用文献

1. Somfai T., Inaba Y., Aikawa Y., Ohtake M., Kobayashi S., Konishi K. and Imai K. (2010) Relationship Between the Length of Cell Cycles, Cleavage Pattern and Developmental Competence in Bovine Embryos Generated by In Vitro Fertilization or Parthenogenesis. *Journal of Reproduction and Development* **56**:200-207.
2. Somfai T., Inaba Y., Aikawa Y., Ohtake M., Kobayashi S., Konishi K., Nagai T. and Imai K. (2010) Development of bovine embryos cultured in CR1aa and IVD101 media using different oxygen tensions and culture systems. *Acta Veterinaria Hungarica* **58**:465-474.
3. Somfai T., Inaba Y., Aikawa Y., Ohtake M., Kobayashi S., Akai T., Hattori H., Konishi K. and Imai K. (2010) Culture of bovine embryos in polyester mesh sections: the effect of pore size and oxygen tension on in vitro development. *Reproduction in Domestic Animals* **45**:1104-1109.
4. Akai T., Onishi Y., Imai K., Aikawa Y., Ohtake M. and Somfai T. (2010) Cell culture dish. United States Patent Application Pub.No. US2010/0221768A1.
5. Sugimura S., Akai T., Hashiyada Y., Somfai T., Inaba Y., Hirayama M., Yamanouchi T., Matsuda H., Kobayashi S., Aikawa Y., Ohtake M., Kobayashi E., Konishi K. and Imai K. (2012) Promising system for selecting healthy *in vitro*-fertilized embryos in cattle. *PLoS One* **7**:e36627.
6. Somfai T., Imai K., Kaneda M., Akagi S., Watanabe S., Haraguchi S., Mizutani E., Dang-Nguyen TQ., Inaba Y., Geshi M. and Nagai T. (2011) The effect of ovary storage and in vitro maturation on mRNA levels in bovine oocytes; a possible impact of maternal ATP1A1 on blastocyst development in slaughterhouse-derived oocytes. *Journal of Reproduction and Development* **57**:723-730.
7. Somfai T., Inaba Y., Watanabe S., Geshi M. and Nagai T. (2012) Follicular fluid supplementation during in vitro maturation promotes sperm penetration in bovine oocytes by enhancing cumulus expansion and increasing mitochondrial activity in oocytes. *Reproduction, Fertility and Development* **24**:743-752.
8. El-Raey M., Geshi M., Somfai T., Kaneda M., Hirako M., Abdel-Ghaffar A.E., Sosa G.A., Abou El-Roos M.E.A. and Nagai T. (2011) Evidence of melatonin synthesis in the cumulus oocyte complexes and its role to enhancing oocyte maturation in vitro in cattle. *Molecular Reproduction and Development* **78**:250-262.
9. Takahashi T., Inaba Y., Somfai T., Kaneda M., Geshi M., Nagai T. and Manabe N. (2012) Supplementation of culture medium with L-carnitine improves development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. *Reproduction, Fertility and Development* **in press**
10. Chankitisakul V., Somfai T., Inaba Y., Techakumphu M. and Nagai T. (2012) Supplementation of maturation medium with L-carnitine improves cryo-tolerance of bovine *in vitro* matured oocytes. *Theriogenology* **in press**

Somfai Tamas

(NARO Institute of Livestock and Grassland Science)

somfai@affrc.go.jp