

黒毛和種種雄牛におけるフリーズドライ精子による顕微授精方法の検討

○及川俊徳, 松川和嗣

(宮城県畜産試験場、高知大学農林海洋科学部)

目的

フリーズドライ(FD)技術は食品や医薬品の安定保存技術として実用化されている。しかし、精子のFD技術はマウス、ラット、ウサギ、ウマで産子生産の報告があるが、ウシでは胚生産の報告はあるものの産子生産の報告はない。

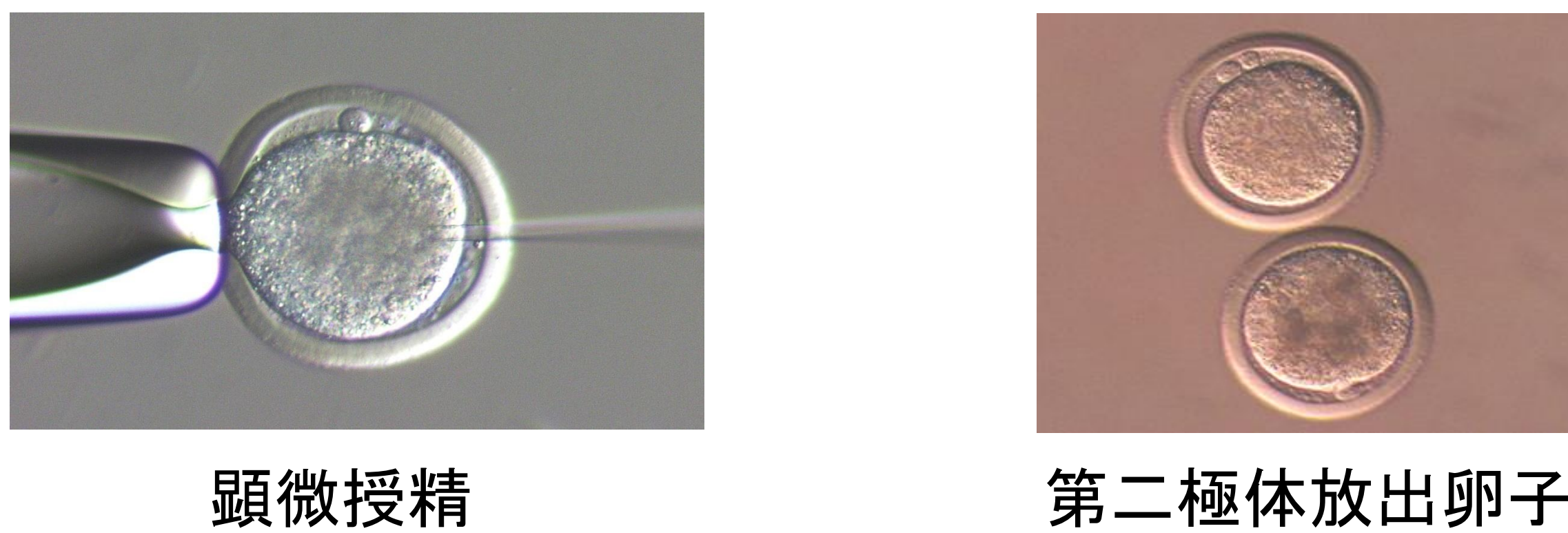
本研究は、貴重な遺伝資源である黒毛和種種雄牛精子のFD方法とFD精子から移植可能胚を得ることを目的として実施した。



材料および方法

- ・供試精液: 宮城県畜産試験場繋養の黒毛和種種雄牛1頭の凍結精液
- ・F D: 凍結精液を高知大学に送付しFDを実施した。FD精子は-30°Cにて保存した。
- ・卵子の体: 5%FBS添加medium199にEGF, FSHおよびピルビン酸を添加した培地で5%CO₂空气中, 38.5°Cの条件で22時間培養した。
- ・顕微授精: PIEZOマイクロマニピュレーターを用いた方法で実施した。
- ・発生培養: mSOF, 5%O₂, 5%CO₂, 38.5°Cの条件で実施した。
- ・ホルマ: 顕微授精後17時間でアセト酢酸で固定し、ントウ標本 アセトオルセインで染色後前核を観察した。

全ての試験にはICSI後第二極体放出卵子を供試した。



実験1: 精子のFDに用いる緩衝液の検討

精子を懸濁する緩衝液を表1のとおり2区設定しFD後顕微授精を実施し胚発生成績を検討した。

表1 FD液の組成

試験区分	組成
Na-EGTA区	50mM NaCl, 50mM EGTA, 10mM Tris-HCl (pH 8.2-8.4)
対照区	50mM EGTA, 100mM Tris-HCl (pH 8.0)

表2 FD液の違いによる胚発生成績

区分	供試卵子数	卵割胚数(%) ¹⁾	胚盤胞数(%) ²⁾
Na-EGTA区	34	18 (52.9) ^a	0 (0.0)
対照区	43	13 (30.2) ^b	0 (0.0)

異符号間に有意差有(a,b: P<0.05)

1)卵割: 受精後72時間, 2)胚盤胞: 受精後192時間

※ICSI後の活性化処理はIonomycin+DMAPで実施

実験2: FD精子顕微授精後の活性化処理成績の検討

FD精子と凍結精液を用いICSI後の活性化処理方法を検討した。

顕微授精後4時間目にエタノール5分間処理(Ethanol区)、顕微授精終了後イオノマイシン5分間処理3時間後からジメチルアミノプリンで3時間培養し活性化処理(Io+DMAP区)を実施した。

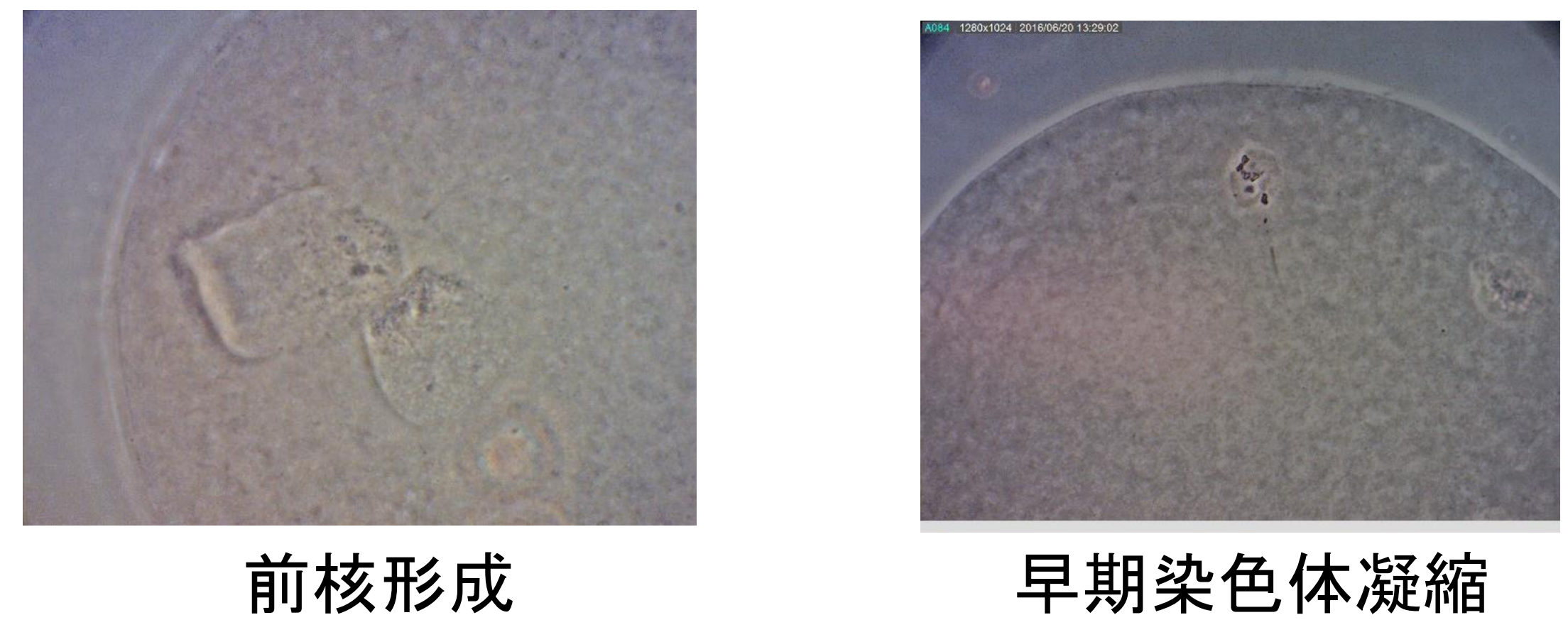
表3 FD精子によるICSI後の活性化処理方法の違いが雄性前核形成に及ぼす影響

精子区分	活性化処理	供試卵数	FPN(%) ¹⁾	PCC(%) ²⁾	膨化精子
FD精子	Ethanol	30	12 (40.0) ^a	18 (60.0) ^a	0 (0.0)
	Io+DMAP	33	18 (54.5) ^a	15 (45.5) ^a	0 (0.0)
	None	21	2 (9.5) ^b	18 (85.7) ^b	1 (4.8)
凍結精液	Ethanol	38	31 (81.6) ^{ab}	5 (13.2)	2 (5.3)
	Io+DMAP	13	13 (100) ^a	0 (0.0)	0 (0.0)
	None	19	14 (73.7) ^b	3 (15.8)	2 (10.5)

同じ項目の異符号間に有意差有り(a,b: P<0.05)

1)FPN: 雄性前核

2)PCC: 早期染色体凝縮



実験3: 前処理精子によるFD精子の胚発生成績の検討

FD前に還元剤処理(Glutathione (GSH), Dithiothreitol (DTT))を10分間実施後FDを実施し顕微授精を行った。

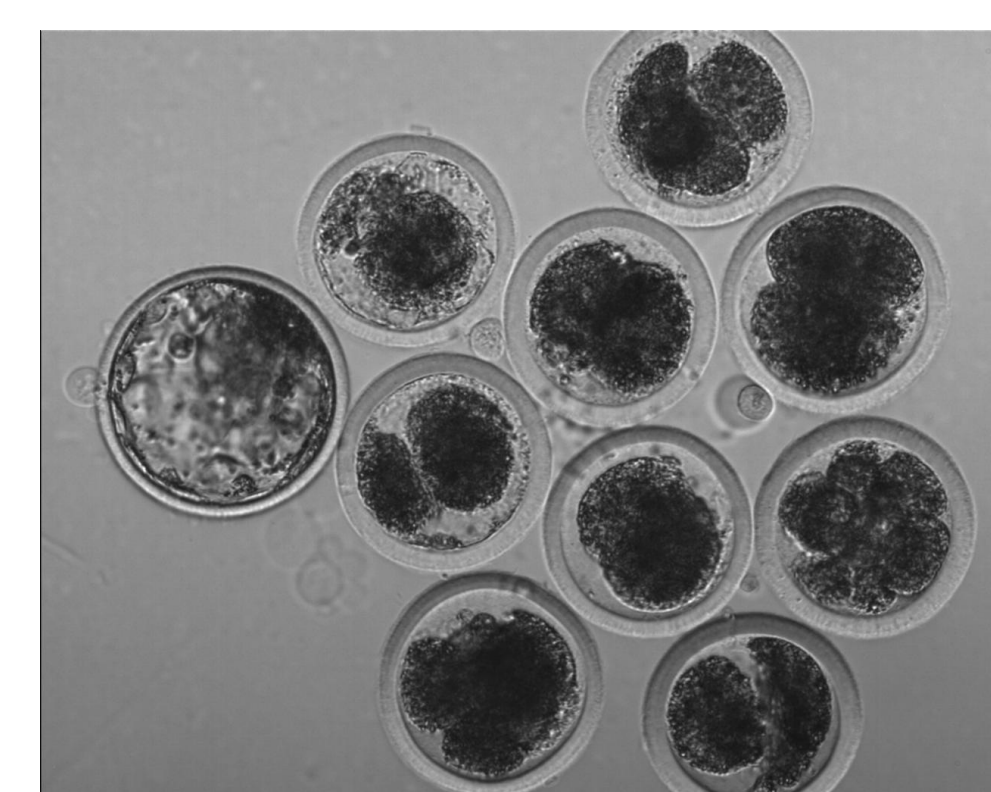
表4 前処理後FD精子によるICSI後の胚発生成績

FD前処理	供試卵子数	卵割胚数(%) ¹⁾	胚盤胞数(%) ²⁾
GSH	54	43 (79.6) ^a	6 (11.1) ^a
DTT	61	40 (66.7) ^{ab}	1 (1.7) ^b
対照区	45	27 (58.7) ^b	0 (0.0) ^b

同じ項目の異符号間に有意差有り(a,b: P<0.05)

1)卵割: 受精後72時間, 2)胚盤胞: 受精後192時間

GSH8mM, DTT:5mM, 実験回数: 3回



GSH前処理FDによる顕微授精後の胚盤胞

まとめ

- ・FDの緩衝液はNaClを添加したNa-EGTA液で高い卵割率が得られた
- ・顕微授精後の活性化処理はIonomycin+DMAPで雄性前核形成率が高く早期染色体凝縮率が低い成績
- ・FD前の前処理はGSH処理で胚発生成績が高い

FD前の精子の還元剤処理は有効である

本研究の一部は科学研究費助成事業(26292140)で実施した