

エゾシカ (*Cervus nippon yesoensis*) 卵母細胞の回収および体外成熟

黒崎 達也・亀山 祐一・石島 芳郎
東京農業大学生物産業学部, 網走市 099-24

Recovery and *in vitro* maturation of Yeso sika deer (*Cervus nippon yesoensis*).

Tatsuya KUROSAKI, Yuichi KAMEYAMA and Yoshiro ISHIJIMA

Laboratory of Animal Resources, Faculty of Bioindustry,
Tokyo University of Agriculture 196 Yasaka, Abashiri-shi 099-24

キーワード: エゾシカ, 卵母細胞, 体外成熟

Key words: yeso sika deer, oocyte, *in vitro* maturation

要 約

エゾシカの体外受精法確立の一貫として卵母細胞の回収と体外成熟を試みた。繁殖期の終了した妊娠中のエゾシカから卵胞穿刺法と卵巣細切法を併用して卵母細胞を回収したところ、卵胞穿刺法では平均7.5個、卵巣細切法では平均12.1個の卵母細胞が回収された。このうち、卵丘細胞が比較的厚く緊密に付着した卵母細胞(A~B型)は、平均7.8個(卵胞穿刺法:5.4個、卵巣細切法:2.4個)であった。回収した卵母細胞の一部を用い、回収直後の核相を判定した。卵母細胞は回収法と形態にかかわらずほぼすべてが卵核胞期であり、成熟分裂の再開は認められなかった。卵胞穿刺法で回収したA~B型の卵母細胞は、10%のFCSを添加したTCM-199で24時間培養すると約50%が成熟した。

緒 言

近年、諸外国における養鹿産業の進展にともない、わが国でもニホンジカ(*Cervus nippon*)の飼育が各地で試みられている。しかし、わが国の養鹿は海外の情報をもとに篤志家が先行している状態で、繁殖を含めた生産技術の体系化が急がれる。受精卵移植はシカの繁殖生理を知るために有用な手法であり、現在までにアカシカ(BERG *et al.*, 1995)、ダマシカ(JABBOUR *et al.*, 1994; MORROW *et al.*, 1994; McMILLAN and HALL, 1994)などで報告されている。しかし、シカはウシよりも体格が小さいため、いずれも外科的に受精卵を回収している。したがって、受精卵の生産は肉牛と同様に体外受精が有効と思われるが、シカ類の体外受精についてはアカシカ(FUKUI *et al.*, 1991)の報告

しかみられない。また、養鹿の対象種としては体格の大きなエゾシカが好適と思われる。しかし、野生エゾシカの繁殖生理は出産期が5月下旬から7月下旬、ニホンジカの推定妊娠期間(226~233日)から逆算した交尾期が10月下旬から11月上旬であることが知られているにすぎない(梶, 1988)。そこで、本研究ではエゾシカ(*Cervus nippon yesoensis*)の体外受精法確立の一貫として卵母細胞の回収と体外成熟を試みた。

材料および方法

1995年および1996年の1月6日~15日に狩猟で捕殺した妊娠雌から子宮ごと卵巣を摘出し、捕殺後24時間以内に保冷した状態で研究室に搬入した。卵巣は黄体のないものおよび小型の黄体を有するものを選び、23頭から摘出した24個を使用した。卵巣は卵母細胞の回収前に37℃のPBS(-)で3回、PBS(+)で2回洗浄した。卵母細胞の回収はPBS(+)を用い、卵胞穿刺法と卵巣細切法を併用して行った。卵胞穿刺法は注射針(27G×3/4)で可視卵胞の内容物をかき出し、PBS(+)中に遊離した卵母細胞を回収した。卵巣細切法は、卵胞穿刺法による回収後に行った。卵巣はPBS(+)中で、カミソリを用いて約1mm角に細切し、金属メッシュ(目の開き:500μm)で組織片を除去した後に卵母細胞を回収した。

回収した卵母細胞は、A型:卵丘細胞が厚く緊密に付着しているもの、B型:卵丘細胞の付着の程度がA型よりも劣るものと部分的欠損の見られるもの、C型:卵丘細胞が部分的にしか付着していないもの、D型:卵丘細胞がまったく付着していないもの、細胞質変性:形態的・色彩的に異常なものに分類し、それぞれの卵母細胞数を算定した。

成熟培養は炭酸水素ナトリウム:26.2mM, HEPES:25mM, 乳酸カルシウム:2.9mM, グル

表1 エゾシカから回収した卵母細胞の形態的分類

平均±S.E.

卵母細胞の回収法	供試頭数	供試卵巣数	穿刺卵胞数	回収卵母細胞数	卵母細胞の形態的分類*				細胞質変性
					A	B	C	D	
卵胞穿刺	23	24	9.9 ±1.01	7.5 ±0.86	3.1 ±0.62	2.3 ±0.46	0.7 ±0.15	0.5 ±0.18	0.9 ±0.28
卵巣細切**	23	24		12.1 ±1.68	0.7 ±0.34	1.7 ±0.66	1.5 ±0.34	2.3 ±0.47	5.9 ±1.00

- * A : 卵丘細胞が厚く緊密に付着しているもの
- B : 卵丘細胞の付着の程度がA型より劣るものと部分的欠損が見られるもの
- C : 卵丘細胞が部分的にしか付着していないもの
- D : 卵丘細胞が全く付着していないもの
- 細胞質変性 : 形態的, 色彩的に異常なもの

** 卵胞穿刺後に実施

コース : 3.1 mM, ビルビン酸ナトリウム : 0.1 mM, PMS : 10 IU/ml, hCG : 10 IU/ml, E₂ : 1 μg/ml, 硫酸ストレプトマイシン : 50 μg/ml, ペニシリンGカリウム : 100 IU/ml, 硫酸ジベカシン : 0.1 mg 力価/ml および FCS : 10% を添加した TCM-199 (日水製薬, pH 7.4) を用い, 微小滴培養で実施した. 卵母細胞は A 型および B 型 (以下 A~B 型) と C 型および D 型 (以下 C~D 型) の 2 つの区に分け, 1~15 個ずつ 100 μl の培地に入れて温度 39°C, 炭酸ガス 5%, 空気 95%, 湿度 100% の条件で 24 時間培養した.

回収直後および培養の終了した卵母細胞は卵丘細胞を除去し, ホールマウント標本を作製した. 標本はカルノア液で 48 時間固定し, 1% 酢酸オルセインで染色して核相を判定した. また, 第二成熟分裂中期に達した卵母細胞を成熟したものとした.

結果および考察

エゾシカ卵母細胞の回収成績を表 1 に示した. 供試した卵巣は平均 9.9 個の卵胞が認められ, 卵胞穿刺法で平均 7.5 個 (75.8%) の卵母細胞が回収できた. 回収卵母細胞の内訳は A 型 : 3.1 個 (41.3%), B 型 : 2.3 個 (30.7%), C 型 : 0.7 個 (9.3%), D 型 : 0.5 個 (6.7%), 細胞質変性 : 0.9 個 (12.0%) であった. 一方, 卵巣細切法による回収卵母細胞は平均 12.1 個であり, その内訳は A 型 : 0.7 個 (5.8%), B 型 : 1.7 個 (14.1%), C 型 : 1.5 個 (12.4%), D 型 : 2.3 個 (19.0%), 細胞質変性 : 5.9 個 (48.8%) であった. IWASAKI ら (1987) は卵胞吸引法と本実験に類似した卵巣細切法を用い, ウシ卵巣からそれぞれ 9.4 個および 13.0 個の卵母細胞を回収している. 本実験の回収卵

母細胞数はこの報告とほぼ等しかったが, 細胞質変性を示す卵母細胞が多くを占めた.

回収した卵母細胞を A~B 型, C~D 型に分類し, 回収直後における核相を観察した (表 2). 検査した卵母細胞は異常の 1 個を除きすべてが卵核胞期 (GV 期) であり (卵胞穿刺法-A~B 型 : 43/43, 卵胞穿刺法-C~D 型 : 7/8, 卵巣細切法-A~B 型 : 19/19, 卵巣細切法-C~D 型 : 31/31), 成熟分裂の再開は認められなかった. しかし, GV 期の卵母細胞の一部 (卵胞穿刺法-A~B 型 : 4/43, C~D 型 : 0/8, 卵巣細切法-A~B 型 : 8/19, C~D 型 : 13/31) には, 卵核胞以外の腔胞様の構造が観察された. 本実験に供試した個体は非繁殖期の妊娠雌であること, 多くの場合は捕殺の翌日に卵母細胞の回収を行っていることから, この構造は卵胞の閉鎖あるいは卵巣の保存状態に起因する可能性が考えられた.

エゾシカ卵母細胞の培養 24 時間における核相の観察を行った (表 3). 卵胞穿刺法で回収した A~B 型の卵母細胞は 86.4% (51/59) が成熟分裂を再開し, このうち 50.8% (30/59) が成熟した. 卵胞穿刺法で回収した C~D 型の卵母細胞のうち 61.5% (8/13) が成熟分裂を再開し, 15.4% (2/13) が成熟した. A~B 型の卵母細胞の成熟率は, C~D 型の卵母細胞よりも有意に高かった (P < 0.05). 一方, 卵巣細切法で回収した卵母細胞は成熟分裂再開の割合が低く (A~B 型 : 26.7%, C~D 型 : 24.3%), 成熟率も低い値であった (A~B 型 : 0%, C~D 型 : 5.4%). このように成熟率は卵胞穿刺法の A~B 型以外はいずれも低い値となり, ミンクにおける知見 (KAMEYAMA *et al.*, 1994) と同様であった. また, 成熟分裂を再開した卵母細胞の一部 (卵胞穿刺-A~B 型 : 14/51, C~D 型 : 1/8, 卵巣細切-A~B 型 : 1/4, 卵巣細切-C~D 型 : 0/9) には染色体のやや散在したものが観察され, 紡錘糸または中心体の異常が疑われた.

FUKUI ら (1991) はアカシカの卵母細胞を 20~24 時間培養し, 70% 程度の成熟率を得ている. この成熟率は本実験の卵胞穿刺法の A~B 型よりも 20% 程度高い値であるが, 同氏らは卵巣を屠殺直後に摘出し,

表 2 エゾシカ卵母細胞の回収直後における核相

回収方法	卵母細胞の形態	判定卵母細胞数	卵母細胞の核相 (%)	
			GV*	異常
卵胞穿刺	A~B	43	43 (100)	0
	C~D	8	7 (87.5)	1 (12.5)
卵巣細切	A~B	19	19 (100)	0
	C~D	31	31 (100)	0

* GV : 卵核胞期

表3 エゾシカから回収した卵母細胞の培養24時間における核相

回収方法	卵母細胞の形態	供試卵母細胞数	卵母細胞の核相* (%)				
			GV	Meta I	Telo I	Meta II	退行
卵胞穿刺	A~B	59	6 (10.2)	20 (33.9)	1 (1.7)	30 (50.8)	2 (3.4)
	C~D	13	3 (23.1)	6 (46.2)	0	2 (15.4)	2 (15.4)
卵巣細切	A~B	15	9 (60.0)	4 (26.7)	0	0	2 (13.3)
	C~D	37	24 (64.9)	7 (18.9)	0	2 (5.4)	4 (10.8)

* GV: 卵核胞期, Meta I: 第一成熟分裂中期, Telo I: 第一成熟分裂終期, Meta II: 第二成熟分裂中期

30~35℃に保温して2時間以内に研究室に搬入している。これに対して本実験は必ずしも一定条件ではないが厳冬期に妊娠雌の卵巣を摘出し、死亡後長時間経過してから卵母細胞の回収を行っている。ウシでは卵巣の保存温度や保存時間が体外成熟率や体外受精率に影響を及ぼすことが報告されており (FUKUI *et al.*, 1982; 安部および塩谷, 1996), エゾシカにおいても良好な条件のもとで卵母細胞の回収を行えば, 卵母細胞の体外成熟率が向上すると期待された。

以上の結果より, 繁殖期の終了した妊娠中のエゾシカから卵胞穿刺法で回収したA~B型の卵母細胞は, 10%のFCSを添加したTCM-199で24時間培養すると約50%が成熟することが明らかとなった。

文 献

- 安部茂樹・塩谷康生 (1996) ウシ卵巣の生理食塩水中での保存温度および保存時間がウシ体外受精胚発生に及ぼす影響。日畜会報, **67**: 633-638.
- BERG, D. K., J. G. THOMPSON, P. A. PUGH, H. R. TERVIT and G. W. ASHER (1995) Successful *in vitro* culture of early cleavage stage embryos recovered from superovulated red deer (*Cervus elaphus*). *Theriogenology*, **44**: 247-254.
- FENNESSY, P. F., G. W. ASHER, N. S. BEATSON, T. E. DIXON, J. W. HUNTER and M. J. BRINGANS (1994) Embryo transfer in deer. *Theriogenology*, **41**: 133-138.
- FUKUI, Y., A. MIYAMOTO and H. ONO (1982) *In vitro* maturation of bovine follicular oocytes stored at various temperatures before culture. *Jap. J. Fert. Ster.*, **27**: 514-519.
- FUKUI, Y., L. T. MCGOWAN, R. W. JAMES, G. W. ASHER and H. R. TERVIT (1991) Effects of culture duration and time of gonadotropin addition on *in vitro* maturation and fertilization of red deer (*Cervus elaphus*) oocytes. *Theriogenology*, **35**: 499-512.
- IWASAKI, S., T. KONO, T. NAKAHARA, Y. SHIOYA, M. FUKUSHIMA and A. HANADA (1987) New methods for the recovery of oocytes from bovine ovarian tissue in relation to *in vitro* maturation and fertilization. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, **33**: 188-192.
- JABBOUR, H. N., V. S. MARSHALL, C. M. ARGO, J. HOOTON and A. S. I. LOUDON (1994) Successful embryo transfer following artificial insemination of superovulated fallow deer (*Dama dama*). *Reprod. Fertil. Dev.*, **6**: 181-185.
- KAMEYAMA, Y., H. TAKEDA, R. HASHIZUME and Y. ISHIJIMA (1994) Recovery and *in vitro* maturation of mink oocytes at pelting period. *Jour. Agri. Sci., Tokyo Nogyo Daigaku*, **38**: 268-274.
- MCMILLAN, W. H. and D. R. H. HALL (1994) Laparoscopic transfer of ovine and cervine embryos using the transpic technique. *Theriogenology*, **42**: 137-146.
- MORROW, C. J., G. W. ASHER, D. K. BERG, H. R. TERVIT, P. A. PUGH, W. H. MCMILLAN, S. BEAUMONT, D. R. H. HALL and A. C. S. BELL (1994) Embryo transfer in fallow deer (*Dama dama*): superovulation, embryo recovery and laparoscopic transfer of fresh and cryopreserved embryos. *Theriogenology*, **42**: 579-590.
- 梶 光一 (1988) エゾシカ。知床の動物 (大泰司紀之・中川元編著), 155-180, 北海道大学図書刊行会, 札幌。