

出國報告(出國類別：研究)

山羊胚體外生產體系之建立

服務機關： 行政院農業委員會畜產試驗所恆春分所
姓名職稱： 黃政齊 研究員兼分所長
派赴國家： 法國
出國日期： 九十八年六月二日至六月十五日
報告日期： 九十八年七月十七日

摘 要

家畜胚體外生產技術包括卵母細胞體外成熟、體外受精及早期受精卵體外培養等技術，除可源源不斷利用超級優良母畜卵巢上既有之眾多卵母細胞，大量產出優秀後裔之外，並可做為動物複製、基因轉殖、選性繁殖、胚操作及胚發育等相關研究之基礎技術平台，對於家畜人工生殖科技之研發至為重要。

法國為山羊人工生殖科技研究方面之先驅，本項出國研習之目的，乃針對近年來法國國家農業研究院在山羊胚體外生產相關技術之研發成果，進行觀摩與交流，期能提升國內相關研究之水平與成效。

本項研習之主要項目包括：山羊卵母細胞之活體腹腔鏡採取技術、山羊卵母細胞與早期受精卵之體外培養系統、山羊胚腹腔鏡移置技術、山羊胚玻璃化冷凍保存技術等，此外，亦就國內山羊人工授精所遭遇之相關問題，與法方相關專家進行研討，並以國內山羊產業發展及生殖技術研發狀況為題，於 INRA 家畜生理研究所發表一場演講。

本次研習除已建立我方與法國國農院家畜生理研究所相關專家之密切關係，及相關研究領域之知識技術交流之外，對於法方目前所研發應用之山羊人工生殖技術之設備與操作細節，均有所了解，對於本分所後續之相關研究應有極大之助益。

本項研習所做之建議事項如下：

- 一、為了持續大量取得體外山羊胚生產所需的卵母細胞，並有效掌控卵母細胞的來源與品質，體外胚生產之相關研究單位，未來應朝向發展腹腔鏡採卵技術，以取代屠宰場生殖背景不明母羊的卵源。
- 二、持續加強我方與 INRA 家畜生理研究所之雙邊交流與合作，進行卵母細胞與早期受精卵體外培養系統之改善及基因表現之研究，以期提高體外生產山羊胚之發育能力及產羔率。
- 三、未來國內山羊胚移置之商業應用，應改採腹腔鏡技術，以取代傳統之外腹中線剖腹手術法，以減低羊隻手術之後遺症。
- 四、山羊胚之玻璃化冷凍技術，台法雙方個別所研發之冷凍解凍步驟及冷凍保護劑配方不同，惟我方所研發之免載體微滴冷凍技術具有簡便高效之優點，建議未來可將胚冷凍保存技術改進議題，列入雙方對等合作之項目之一。
- 五、為有效解決國內山羊胚人工授精受胎率偏低之問題，建議於 2011 年之台法農業合作計畫中，研提相關人員交流計畫，邀請法方專家來台，全程進行國內乳羊群之人工授精示範操作與試驗，以利國內後續山羊人工授精技術之推廣及加速國內羊群之遺傳改良。

目 次

壹、目的.....	1
貳、研習過程項目與研習對象.....	2
參、心得.....	3
一、不同來源山羊卵母細胞之取得.....	3
二、山羊卵母細胞與早期受精卵之培養體系.....	6
三、山羊胚之冷凍保存.....	6
四、山羊胚腹腔鏡移置技術.....	7
五、山羊人工授精相關問題.....	7
肆、建議.....	10

壹、目的

家畜胚體外生產技術包括卵母細胞體外成熟、體外受精及早期受精卵體外培養等技術，利用該項技術平台，可結合胚冷凍保存及胚移置等技術，整合成為完整可商業應用之輔助生殖科技(assisted reproductive technology)，除可源源不斷利用超級優良母畜卵巢上既有之眾多卵母細胞，大量產出優秀之後裔之外，並可做為動物複製、基因轉殖、選性繁殖、胚操作及胚發育等相關研究之基礎技術平台，對於家畜人工生殖科技之研發至為重要。國際上，牛胚體外生產技術之研發與應用遙遙領先其他家畜，甚至已進入商業應用階段。惟在山羊方面，相關技術仍在研發階段，其原因不外大多數先進畜產國家，山羊之經濟地位遠不如其他草食動物如牛及綿羊，政府及學界所投入之資源也相對有限。然而，在歐美先進國家之中，法國為山羊人工生殖科技研究方面之先驅，主要原因是，法國有極為發達之山羊起司(cheese)工業，全國之乳山羊頭數超過一百萬頭，因此，法國國家農業研究院 (Institut National de la Recherche Agronomique, INRA)過去多年來，在山羊胚體外生產體系之建立，尤其在改善體外生產羊胚之發育能力方面，已有相當之進展，值得做為借鏡。

恆春分所為國內山羊之主要研究單位，並擁有山羊人工生殖科技研發之完善軟、硬體設備，筆者曾於 2004 年自費前往法國 INRA 之家畜生殖生理研究所，研習山羊胚體外生產之相關技術，返國後，並已在恆春分所建立基礎之技術平台。本項出國研習之目的，乃針對近年來 INRA 在山羊胚體外生產相關技術研發之進展，如山羊卵母細胞之活體腹腔鏡採取技術、不同來源卵母細胞之培養體系差異、山羊胚發育能力之研究與改善，乃至於山羊胚之冷凍保存與移置等技術，前往位於 Tours 的家畜生殖生理研究所進行觀摩與交流，期能提升國內相關研究之水平與成效。此外，對於目前國內山羊人工授精所遭遇之問題，前往位於 Pottier 的人工授精中心，與相關專家進行簡報與研討。

貳、研習過程項目與研習對象

- 一、洽詢法國乳用山羊冷凍精液進口相關事宜(Sersia France)
- 二、觀摩母山羊利用腹腔鏡活體採卵操作(Yann Locatelli, Gerard Baril)
- 三、收集腹腔鏡採卵器材及羊隻手術架設計製作之相關資訊(Gerard Baril)
- 四、觀摩屠宰場卵巢採集卵母細胞與體外培養過程(Alice Fatet)
- 五、討論山羊卵母細胞及早期受精卵培養體系(Pascal Mermillod, Yann Locatelli)
- 六、討論山羊胚玻璃化冷凍保存技術(Florence Guignot)
- 七、觀摩山羊胚腹腔鏡移置操作(Gerard Baril)
- 八、簡報與討論台灣山羊人工授精遭遇之問題 (Bernard Leboeuf)
- 九、參訪國家野生動物保種公園及參加學術研討會(Jean-Luc Berthier)
- 十、以『台灣山羊產業與生殖技術研發』為題，於 INRA 家畜生理研究所發表演說(研究所所長 Dr. Chemineau 及同仁)

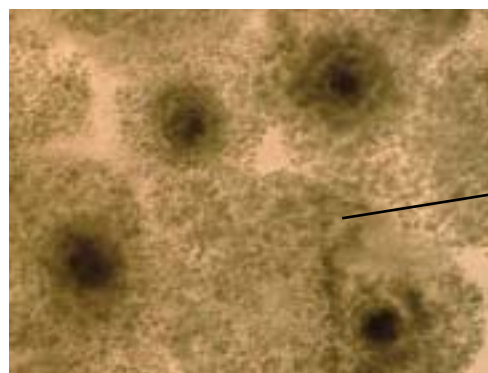
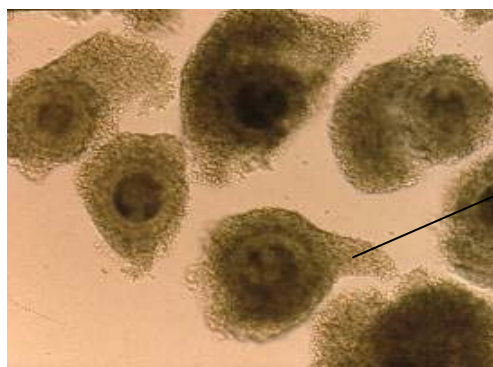
參、心得

一、不同來源山羊卵母細胞之取得

山羊卵母細胞之取得有兩種來源，其一為自屠宰場屠後之母羊卵巢取得，另一則為利用腹腔鏡技術自活體母羊卵巢取得。

(一)屠宰場母羊卵巢：

供應卵巢之母羊主要為淘汰母羊，每天約可取得 200 個以上卵巢。由於羊隻生殖背景不明，且在屠宰前無法預先進行荷爾蒙刺激，取回之卵巢在以真空吸取 2mm 以上濾泡中之卵母細胞過程中，又容易損及卵丘細胞之完整性，因此，卵母細胞之品質較不穩定，平均每個卵巢僅能取得 2 個可用之卵母細胞。此外，屠宰場距離實驗室 100 公里以上，卵巢在取得後必須在 2~4 小時內完成卵母細胞採集之工作。若以目前國內淘汰母羊屠宰之頭數少、屠宰時段為深夜及實驗室與屠宰場距離遙遠等條件限制，目前仍以發展腹腔鏡採卵為宜。



圖一、由屠宰場卵巢取得的山羊卵母細胞

圖二、經體外培養成熟之山羊卵母細胞

(二)腹腔鏡活體卵巢採卵：

1. 羊隻手術台設計與採卵器材

已取得羊隻麻醉保定用手術架設計概念與相關規格，了解採卵過程中所需使用之器材與設備，並習得採卵針手工製作要領。

2. 採卵設備之購置

腹腔鏡採卵設備包括：0°腹腔鏡、腹腔充氣設備、CCD 攝影與影像傳輸設備、監視器螢幕、各式腹壁穿刺用套管針、卵巢固定鉗、採卵針及其與真空幫浦連接之器材等基本設備。

3. 供卵母羊之前處理

供卵母羊在採卵之前，須以助孕素塞劑處理 11 日，惟在撤除塞劑之前三日，每日早晚各一次，總計 5 次，以劑量遞減方式注射總量 16mg 之 pFSH，以達到充分刺激濾泡生長之效果。

4. 採卵操作

須有助手協助。先以腹腔鏡觀察卵巢濾泡生長狀況，包括數目與直徑，並紀錄所採集不同濾泡直徑之數目，以便統計卵母細胞回收率。研習心得包括卵巢之固定翻轉及濾泡穿刺與吸取之要件與技巧等。卵母細胞之回收率約 60~70%，惟亦有低至 30% 者，此外，操作者之技巧亦為影響卵母細胞回收率之重要因素。

5. 供卵母羊之重複利用

供卵母羊可每二週取卵一次，連續取卵 6 個月。每頭每次採卵約可生產 4.5 個囊胚。至於母羊連續注射 pFSH 是否降低後續之濾泡生長發育反應，則有待進一步評估。



圖三、山羊腹腔鏡採卵用手術架，可拆解及調節傾斜度



圖四、羊隻麻醉與上架



圖五、手術部位剃毛與消毒



圖六、腹腔鏡及附屬器具



圖七、真空幫浦、採卵針與集卵瓶



圖八、腹腔鏡及其他工具之置入



圖九、腹腔鏡採卵操作



圖十、利用螢幕顯像，以採卵針穿刺濾泡並吸取內容物



圖十一、真空吸出及收集卵母細胞



圖十二、手術後復甦中的羊隻



圖十三、腹腔鏡採集與回收山羊卵母細胞的結果



圖十四、顯微鏡下集中與判定卵母細胞品質

二、山羊卵母細胞與早期受精卵之培養體系

(一)體外成熟培養

體外成熟培養體系之完善與否，影響後續受精卵之發育能力甚鉅。屠宰場卵巢取得之卵母細胞，採用 M-199 培養液並添加 cystamine 及 EGF，即可達到理想的囊胚生產率，然而，利用腹腔鏡取自活體卵巢之卵母細胞，則必須於培養液中另行添加 10%濾泡液或添加多項營養配方，才能達到相當的效果。

(二)體外受精

卵母細胞於培養液中培養 24 小時完成體外成熟之後，採用冷凍精液之精子，於體外短暫獲能處理之後，以每槽 0.5 mL IVF 培養液中含一百萬精子之濃度，進行體外受精 20 小時。

(三)受精卵體外培養

完成體外受精之卵子，採用合成輸卵管液(SOF)進行體外培養 6 日，培養皿中預先製備山羊輸卵管細胞之單層細胞(monolayer)，並與早期受精卵進行共同培養，可顯著提高體外生產囊胚產出率及個別囊胚之細胞數，此外，囊胚冷凍再解凍之後的存活率及產羔率，亦獲得顯著提升。

三、山羊胚之冷凍保存

(一)玻璃化冷凍技術成效良好，目前 INRA 已全面採用該項技術，以取代傳統之慢速降溫冷凍法，進行山羊胚之冷凍保存。

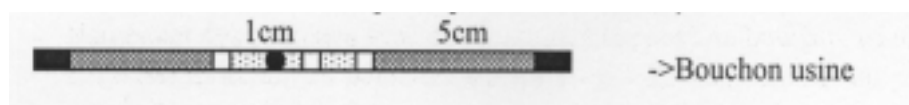
(二)INRA 採用 0.25mL 麥管做為容器，並於麥管前、後兩段充填 galactose。

玻璃化冷凍液除含有冷凍保護劑之外，尚含有 sucrose，以便於解凍後，無需先移除冷凍保護劑，即可直接進行胚移置。

(三)抗凍劑採用 glycerol 與 ethylene glycol，並以濃度漸增之方式分進行三階段處理羊胚，每一階段時間之掌握必須十分精確。

(四)解凍時採用單一步驟，免除以 sucrose 梯度稀釋方式移除冷凍保護劑之繁瑣程序。

(五)INRA 研發之山羊胚玻璃化冷凍方法，將與恆春分所研發之微滴玻璃化冷凍法進行比較，以了解兩種方法之成效差異，做為未來山羊胚冷凍保存技術改進之參考。



圖十五、裝載完成準備玻璃化冷凍的麥管示意圖

四、山羊胚腹腔鏡移置技術

山羊胚之採集與移置，傳統上均採用腹中線剖腹術(mid-ventral laparotomy)。然而，在外科手術過程中，暴露與直接操作子宮與卵巢，容易造成羊隻在手術之後引起組織沾黏(adhesion)的後遺症，影響該羊隻後續可供採胚或胚移置的次數及生育力。目前為止，基於採集效率及胚回收率的考量，山羊胚的採集在國際上仍延襲採用外科手術方法。惟有關山羊胚移置技術，法國現今則採用腹腔鏡移置方法，除了操作簡便之外，對羊隻手術造成的後遺症，亦可望大幅降低，值得我方參考採用。

山羊胚腹腔鏡移置技術，基本之應用設備與操作，與腹腔鏡採卵類似，惟在確認受胚母羊排卵狀況之後，直接將羊胚移置入排卵同側的子宮角末端即可。每頭受胚母羊僅須選擇其中之一與排卵卵巢同側的子宮角植入羊胚即可，爲了提高受胎率與雙胎率，每頭母羊以植入二個以上羊胚爲原則。



圖十六、山羊胚腹腔鏡移置示意圖

五、山羊人工授精相關問題

影響山羊人工授精受胎率的因素眾多，母羊發情同期化處理頻度、發情觀測準確性、母羊生殖內分泌異常、授精時間點是否合適、公羊精液品質與個別公羊

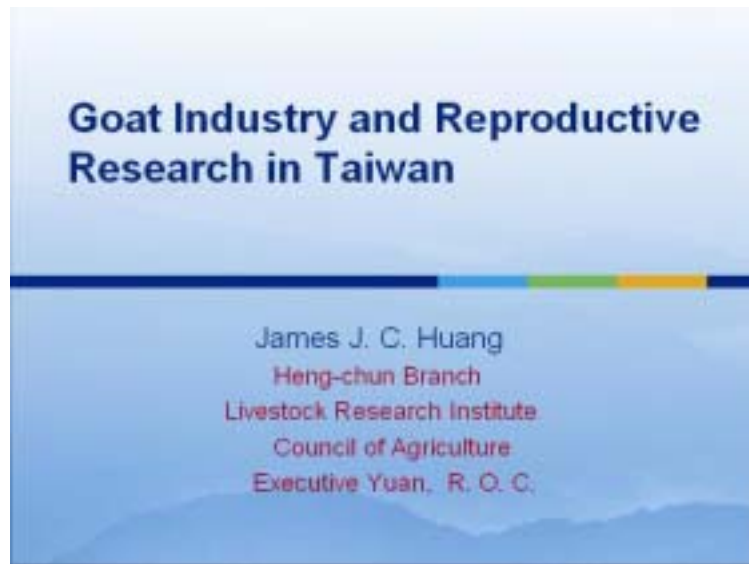
精子受精力之差異、授精位置、人工授精者之技術與經驗及環境造成之緊迫等，或多或少均可能影響人工授精的整體成效。國內目前山羊人工授精之受胎率與法國相較，仍有偏低之現象，嚴重影響乳羊群人工授精技術之推廣與羊群遺傳改良，值得在台法農業合作架構下，共同研究解決。

經與 INRA 人工授精中心相關專家討論之後，得到下列結論：

- (一)台灣羊群人工授精受胎率偏低之原因，有待進一步整理統計與分析過去多年所累積之數據，以釐清各種變因之可能影響程度。相關之統計數據於整理完成之後，先行傳送 INRA 的 Bernard Leboeuf，並利用電子郵件進行討論。
- (二)台灣之緯度與氣候與法國差異甚大，爲了釐清不同緯度之氣候條件對羊之發情與排卵時間點(timing)可能造成的差異，有必要利用 ELISA 偵測母羊發情期間血液中 LH 潮湧(surge)出現之時間點，以了解台灣地區發情母羊排卵之時間點。
- (三)雙方進一步合作，於台法兩地，採用同一已知受精力之公羊冷凍精液、採用相同的發情同期化材料與步驟，由同一授精人員進行大規模人工授精試驗，以確認台灣乳羊人工授精之問題癥結所在。該項計畫之雙方人員交流所需經費，擬請編列於 2011 年台法農業合作計畫中實施。



圖十七、前往人工授精中心簡報及討論台灣山羊人工授精之相關問題



圖十八、於 INRA 家畜生理研究所提出之演講題目



圖十九、參訪 INRA 位於 Tours 的實驗牧場，中為 Dr Mermillod 右為牧場主任



圖二十、與 Dr Mermillod 參加國家野生動物保種公園舉辦之學術研討會

肆、建議

- 一、爲了持續大量取得體外山羊胚生產所需的卵母細胞，並有效掌控卵母細胞的來源與品質，體外胚生產之相關研究單位，未來應朝向發展腹腔鏡採卵技術，以取代屠宰場生殖背景不明母羊的卵源。
- 二、持續加強我方與 INRA 家畜生理研究所之雙邊交流與合作，進行卵母細胞與早期受精卵體外培養系統之改善及基因表現之研究，以期提高體外生產山羊胚之發育能力及產羔率。
- 三、未來國內山羊胚移置之商業應用，應改採腹腔鏡技術，以取代傳統之外腹中線剖腹手術法，以減低羊隻手術之後遺症。
- 四、山羊胚之玻璃化冷凍技術，台法雙方個別所研發之冷凍解凍步驟及冷凍保護劑配方不同，惟我方所研發之免載體微滴冷凍技術具有簡便高效之優點，建議未來可將胚冷凍保存技術改進議題，列入雙方對等合作之項目之一。
- 五、爲有效解決國內山羊胚人工授精受胎率偏低之問題，建議於 2011 年之台法農業合作計畫中，研提相關人員交流計畫，邀請法方專家來台，全程進行國內乳羊群之人工授精示範操作與試驗，以利國內後續山羊人工授精技術之推廣及加速國內羊群之遺傳改良。