

出國報告（出國類別：研究）

山羊卵腹腔鏡採取技術

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：王得吉助理研究員

派赴國家：法國

報告日期：99年06月28日

出國時間：99年04月29日至99年05月12日

摘 要

本計畫是與法國國家農業研究院(INRA)合作，透過研究人員前往研習，並實地操作山羊活體採卵及相關胚體外生產之關鍵技術，以期提昇山羊胚體外生產之效率。透過研習過程，清楚了解腹腔鏡取卵過程中所需具備之器械、操作程序與相關條件之設立，有助於縮短本分所未來研發該項技術之時程。其次，利用腹腔鏡採取技術所得之卵母細胞經 BCB 染色篩選後，BCB(-)者數量相當稀少，可能是因為供卵母羊於採卵前事先以內泌素進行處理，以致所獲取之卵母細胞多為已接近生長完全之階段。而在卵裂率與囊胚率方面，其各組間之趨勢與作者先前研究之結果相似，亦即 BCB(+)與對照組並無顯著性差異存在，然而 BCB(-)組則顯著 ($p < 0.05$) 低於 BCB(+)與對照組。在山羊胚體外生產部分，仍需建立與法方相同之方式，以期提升國內於該技術之生產效率。此外，利用腹腔鏡取卵技術可成功應用於某些野生動物，對於瀕危動物之復育亦具有極為正面的意義。

目 次

壹、目的.....	1
貳、過程.....	2
參、心得.....	10
肆、建議.....	11
伍、相關附錄.....	12

壹、目的

山羊胚體外生產體系包括卵母細胞體外成熟(IVM)、體外受精(IVF)及體外培養(IVC)等技術。此一技術平台之成功建立，不僅可充分利用優良種畜之卵巢資源，大量繁衍優良之後裔。尤有進者，為山羊複殖、基因轉殖及選性繁殖等尖端生殖科技研發不可或缺之基礎技術平台。在傳統上山羊卵母細胞之取得多仰賴活體手術 (Younis et al, 1991; Keskinetepe et al, 1994) 或屠宰場 (Mogas et al, 1997; Izquierdo et al, 1999) 為主要試驗材料來源，但各有其利弊。利用腹中線剖腹術將卵巢暴露後進行活體採卵；優點為羊隻生殖周期可以人工操控，取得之羊卵品質及發育能力較高，但缺點是手術所耗費之成本高、易造成子宮組織之術後黏著以及單一動物利用次數有限。自屠宰場廢棄之卵巢採卵，具有簡便、量大及成本低廉等優點，但因母羊來源及生殖背景複雜，體外生產之羊胚品質及成功率較不穩定。近年來，利用低成本、快速及在同一動物可重複多次使用的山羊腹腔鏡採卵技術已於法國成功開發應用。腹腔鏡取卵技術則提供了另一個有效率及相對於卵巢摘除無創口的方式 (Baldassarre et al, 2002)，且其可重複使用動物、降低生殖器官組織之沾黏、操作迅速而降低了動物之緊迫等優點。過去多年來，恒春分所在台法農業合作架構下，山羊卵體外生產之技術平台已完成建立，惟所生產之羊胚品質仍待改善。因此，本計畫擬與法國國家農業研究院(INRA)合作，透過研究人員前往研習，並實地操作山羊活體採卵及相關胚體外生產之關鍵技術，以期提昇山羊胚體外生產之效率。

貳、過程

日期	研習機構	研習內容
4/29(週四)		去程
4/30(週五)		去程，抵達法國巴黎
5/01(週六)		資料準備
5/02(週日)		去程，抵達法國 Tours
5/03(週一)	法國 Tours 市郊區之法國國家農業研究院 (INRA) 分院	山羊卵母細胞 BCB 染色之操作條件與結果討論
5/04(週二)	法國 Tours 市郊區之法國國家農業研究院 (INRA) 分院	山羊卵腹腔鏡採取技術之研習與操作
5/05(週三)	法國 Tours 市郊區之法國國家農業研究院 (INRA) 分院	山羊胚體外生產之研習
5/06(週四)	法國 Tours 市郊區之法國國家農業研究院 (INRA) 分院	山羊胚體外生產之研習
5/07(週五)	參訪國家野生動物保種公園	參訪園內生理試驗相關設施
5/08(週六)		資料整理
5/09(週日)		資料整理
5/10(週一)	法國 Tours 市郊區之法國國家農業研究院 (INRA) 分院	山羊胚體外生產之研習
5/11(週二)		回程
5/12(週三)		回程

一、本分所畜產科技系王得吉助理研究員於 99 年 4 月 29 日由高雄小港機場搭乘華信航空班機於 4 月 29 日抵達香港，隨即轉機於 4 月 30 日抵達法國戴高樂機場並進駐旅館，期間至 5 月 1 日開始準備 5 月 3 日研習之相關資料。5 月 2 日由巴黎 Montapanass 車站搭乘 TGV 高速鐵路至 Tours 市。

二、5 月 3 日短暫會晤 Dr. Pascal Mermillod 後，隨即與技術員 Mr. Nicolas Duffard 進行山羊卵母細胞 BCB 染色之操作條件與結果討論。源自屠宰母畜所獲得之卵母細胞，已知在體外成熟後之發育潛力存在著極大的變異。因此，正確、快速且非侵害性的成熟前卵母細胞品質評估方式便相形重要。利用 BCB (brilliant cresyl blue) 已被證實在發身前豬、牛、羊等動物研究中可用來挑選適當的卵母細胞。此外，BCB 亦被使用於源自屠宰成年母牛而來之卵母細胞挑選，以作為胚體外生產及體細胞複製等研究上。未成熟卵

母細胞已知可合成多種的蛋白質，其中包括 G6PDH。此酶在生長中之卵母細胞內被活化，但卻於已生長完畢之卵母細胞內活性降低。BCB 被用來測定 G6PDH 之活性，其原理為 G6PDH 可將 BCB 染色自藍色轉為無色的能力。G6PDH 於卵母細胞生成過程中於卵母細胞內被合成，且其為 pentose phosphate cycle 之成分之一，主要提供核苷合成過程中核醣之磷酸以及 NADPH 之利用。在發身前山羊卵母細胞的研究顯示，較有發育能力之卵母細胞可用 BCB 染色進行篩選，在 BCB(+)的卵母細胞其成熟率與受精率皆顯著高於 BCB(-)者。

Dr. Pascal Mermillod 於去年訪台時，作者曾就當時於科技計畫中相關研究成果向其簡報並討論，亦引起其高度關注，因此本年度法方研究團隊積極的進行相關研究。於討論過程中發現，其利用腹腔鏡採取技術所得之卵母細胞經 BCB 染色篩選後，BCB(-)者數量相當稀少，可能是因為供卵母羊於採卵前事先以內泌素進行處理，以致所獲取之卵母細胞多為已接近生長完全之階段。而在卵裂率與囊胚率方面，其各組間之趨勢與作者先前研究之結果相似，亦即 BCB(+)與對照組並無顯著性差異存在，然而 BCB(-)組則顯著 ($p < 0.05$) 低於 BCB(+)與對照組。



圖 1. 與 Dr. Pascal Mermillod(左)及 Dr. Yann Locatelli(右)於家畜生殖生理研究大樓前合影

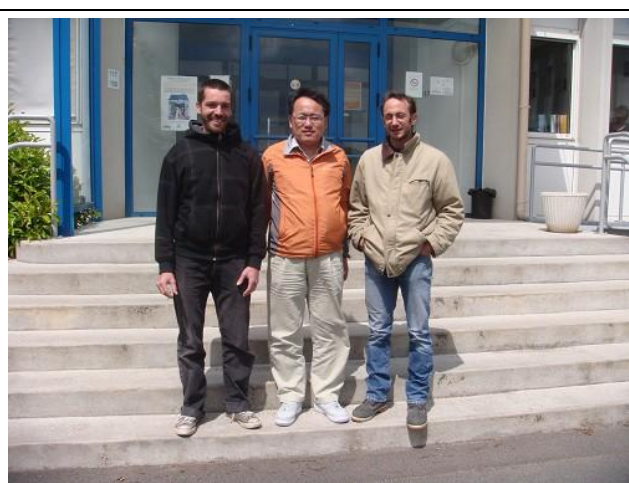


圖 2. 與 Mr. Nicolas Duffard(左)及 Dr. Yann Locatelli(右)於家畜生殖生理研究大樓前合影



圖 3. 家畜生殖生理研究院之試驗馬群



圖 4. 家畜生殖生理研究院之試驗綿羊群

三、5月4日與 Dr. Yann Locatelli 進行山羊卵腹腔鏡採取技術之研習與操作。本批試驗用供卵母羊因其試驗需要，因此並無利用內泌素之前處理。手術前需將腹腔鏡、組織固定夾及相關穿刺器械滅菌完全。操作人員與助手雙手消毒後，由旁人協助穿上滅菌之手術衣並小心戴上手術手套。母羊於麻醉並固定於手術台後，調整後驅端手術台之高度至適當位置並固定，披上手術敷巾固定後，於腹中線左右兩側及下方腹中線處適當位置各穿刺一小洞。主術者負責操作腹腔內視鏡與組織夾，負責尋找並適當的固定卵巢，隨即將組織夾交由身旁之助手並取採卵針進行卵巢上濾泡之穿刺與抽吸過程，並隨時紀錄每個卵巢吸取之濾泡大小與數量，以利卵母細胞回收率之統計。在山羊方面有研究指出，利用吸取之方式進行卵巢上卵丘-卵母細胞複合體之收集，在後續胚發育至桑椹胚的比例高於切割的方式 (Keskintepe et al., 1994)。利用腹腔鏡取卵方式相對於傳統自暴露的卵巢上取得卵丘-卵母細胞複合體，為一快速、低成本且可重複使用於同一母畜個體而不需複雜的手術程序。該技術經由一般的麻醉程序後即可於 20 分鐘內完成 (Graff et al., 2000)。經內泌素處理之母羊其卵母細胞回收率介於 75-85% (Baldassarre and Karatzas, 2004; Graff et al., 2000)，每頭母羊平均所得之卵母細胞約為 13.5 個 (Barboni and Mattioli, 1996; Baldassarre and Karatzas, 2004)。但該技術最主要的問題在於卵母細胞於濾泡被抽吸而通過管路時造成卵丘細胞嚴重流失，因此在抽吸的過程中真空壓力的調整與收集管路的設計便相形重要。此外，於法方近年來相關研究顯示，利用腹腔鏡技術進行

取卵其回收率介於 30-70%，不穩定之結果可能亦由上述之原因所造成。於研習過程中法方研究團隊亦積極的比較利用該技術與傳統方式對卵母細胞回收率之影響，試圖更明確了解問題之所在而進一步改善整體設施或操作程序。

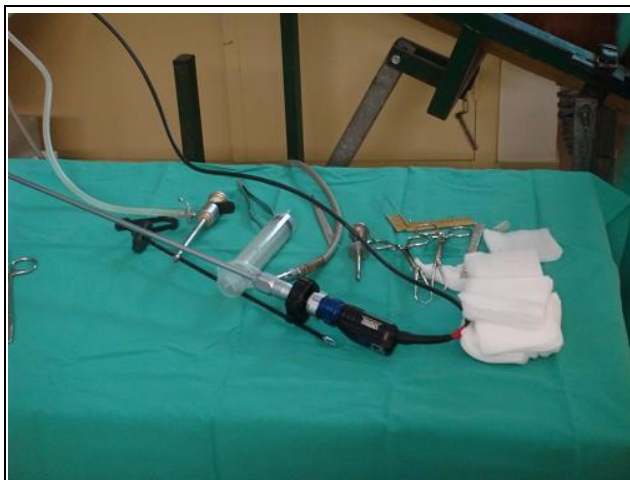


圖 5. 腹腔鏡手術器械



圖 6. 母羊固定於手術台上



圖 7. 清洗吸卵管路



圖 8. 術前準備與討論



圖 9. 腹腔鏡手術操作

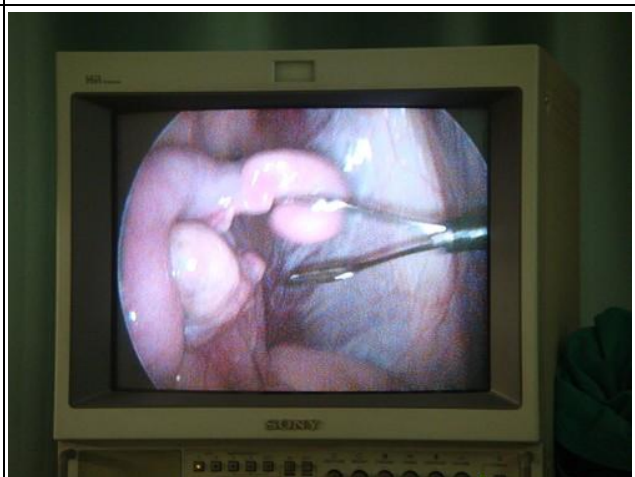


圖 10. 組織夾撥取卵巢

四、5月5日至5月10日則是進行山羊胚體外生產技術之研習。在家畜育種過程中，使用輔助生殖技術（assisted reproduction technologies；ART）相較於自然繁衍方式，其最主要目的是增加優良家畜後代的可能性。在小反芻獸研究領域，胚體外生產（in vitro production；IVP）在發育生物學及生理學的基礎研究上，提供了廉價胚胎其有效且優良的來源。近年來，有關提昇胚體外生產效率的研究已逐漸被發展。但儘管如此，其成功率仍遠低於源自體內的胚胎。在許多研究指出，胚胎存活率可能因培養系統變得更複雜而相對的提昇，因此，體外胚生產過程中於受精後培養條件的修飾便成爲了促進囊胚品質的決定因素。許多致力於最適培養條件的研究已在進行，亦有許多的人工合成培養液被建議用於支持體外生產胚胎之發育。合成輸卵管液（SOF）常被用來使用於牛、羊胚之體外培養，該培養液原於綿羊輸卵管液生化分析結果之基礎上被建立的低氧培養系統，後來相關研究者陸續將該培養液加以修飾，包含添加必需與非必需氨基酸、檸檬酸、去除葡萄糖成分及在培養初期之72小時添加EDTA等。此外，有研究指出利用細胞共培養系統，相較於無細胞支持之培養，顯著提昇囊胚之品質與存活力。輸卵管上皮細胞共培養爲另一常被用於牛、羊胚體外培養之系統，在山羊亦被證實可成功的獲得體外生產之囊胚。

本分所多年前曾因黃分所長政齊親自前往該中心並取回相關技術，但在本分所實施時於某些試驗過程中遭遇困難。儘管吾等後續針對相關困難點予以修飾，並可獲致30-40%囊胚率且成功生產後代，但所有試驗程序上便變的與法方有所差異。因此，本次研習另一重要任務即是詳細了解該技術之實際操作。於屠宰場取回之卵巢組織，法方是利用真空幫浦進行卵丘-卵母細胞複合體之吸取，且平均1顆卵巢僅取1-2個卵母細胞，該點應是其一次所取得之卵巢數量眾多（約200顆），較可嚴格篩選品質最佳之卵母細胞。而在台灣則因羊肉消費形態關係，很難一次取得如此數量之卵巢。儘管如此，若謹守吸取2-6mm大小濾泡及謹慎依據卵丘-卵母細胞複合體形態篩選，應可達到一致的成效，唯試驗樣品數量可能降低。在體外操作部分，儘管其於相關胚操作轉移所使用之工具與一般國內使用者不同，但對胚之影響應不至於有太大不同。法方之體外受精與體外培養是以SOFaa低養培養液爲主要基礎，儘管過去數年來已獲致良好且穩定之結果，但近年來亦開始發展輸卵管

上皮細胞共培養之系統，以期提升胚體外生產之整體效率。該工作由 Mis. Babara 及 Mis. Amanda.Cordova 兩位前後任博士生負責評估中。

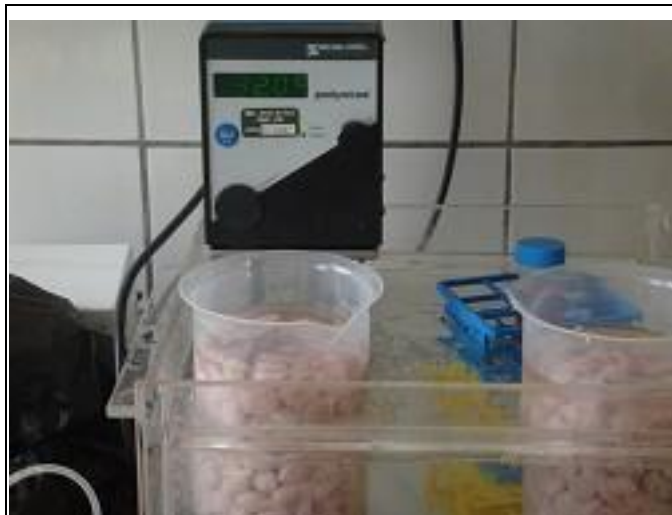


圖 11. 自屠宰場取回之卵巢組織



圖 12. 利用真空幫浦進行卵丘-卵母細胞複合體之吸取



圖 13. 吸取 2mm-6mm 之濾泡

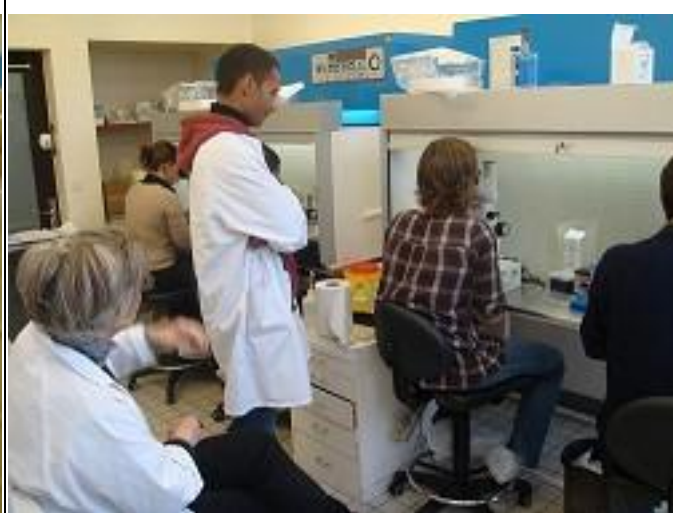


圖 14. 於顯微鏡下收集卵丘-卵母細胞複合體



圖 15. 清洗卵丘-卵母細胞複合體



圖 16. Mis. Amanda.Cordova 進行 Bovine oviduct epithelial cell 之製備

五、5月7日參訪 Reserve de la haute-touche 動物園。該動物園隸屬於法國政府，為 Museum national d'histoire naturelle 散佈於法國境內 3 座動物園之一，亦為佔地最大者，園內總面積達 500 公頃，收集來自全球 5 大洲、100 多個物種和超過 1000 頭以上的各類動物。該動物園主要任務為保存國際上各種瀕危的野生動物，在飼養管理上，該園提供一廣大且接近自然的環境，有利於進行野生動物行為研究與觀察。在人工繁殖發展上，該園建有先進之實驗室，進行生殖細胞冷凍保存與試管生產研究。多年來，該園即與法國國家農業研究院（INRA）之 Tours 分院進行野生動物繁殖生理之研究。本次由於 Dr. Yann Locatelli 本身部分時間服務於該園，因此有機會前往參訪。該園所屬之繁殖生理研究室內包含了所有外科手術器材、手術室、胚操作與培養及生殖細胞冷凍保存製作與保存等相關儀器。在近年重大成果方面，該園成功的利用腹腔鏡取卵技術進行梅花鹿胚之體外生產後，移置於代孕母鹿並產下 4 頭仔鹿。該成果則進一步證實利用家畜多年來於人工生殖科技上之發展經驗，可成功應用於某些野生動物，對於瀕危動物之復育具有極為正面的意義。



圖 17. 法國國家野生動物中心園區分布



圖 18. 野生動物中心管理與研究部門



圖 19. 野生動物中心之生殖生理研究室



圖 20. 野生動物中心梅花鹿復育成果

參、心得

法國不僅為全世界羊乳生產大國之一，且其所擁有完備之乳羊性能育種改良架構及世界上獨一無二種公羊性能檢定與冷凍精液生產中心，為其乳羊產業能夠傲視全球的核心價值之所在，無論是在乳羊產業發展抑或是山羊人工生殖技術研究等方面是值得吾等多所借鏡之處。透過本次研習過程，清楚了解腹腔鏡取卵過程中所需具備之器械、操作程序與相關條件之設立，有助於縮短本分所未來研發該項技術之時程。而在山羊胚體外生產部分，未來國內仍需建立與法方相同之方式，以期提升國內於該技術之生產效率。

最後，本次研習過程非常感謝黃分所長政齊與數位法方人員在各項行程上的細心安排，得以讓本人能順利成行。Dr. Pascal Mermillod 在行前非常積極且細心的依本人之需求安排行程；Mr. Nicolas Duffard 在訓練過程中，詳細的解說試驗流程及成果分享；Dr. Yann Locatelli 非常熱情的於百忙之中撥冗傳授及說明技術操作技巧，並不吝分享其豐富之經驗且給予專業建議。

肆、建議

- 一、腹腔鏡操作過程中，卵母細胞回收率介於約 30-70% ，似仍有改善之空間。
- 二、於下半年法方研究人員來訪前，擬安排進行先前試驗，及早發現該項技術實施過程中可能發現之問題，以利未來討論與改善。
- 三、未來應針對不同的體外胚生產系統進行比較，以期提升該技術之生產效率。

伍、相關附錄

參考文獻

- Baldassarre, H., B. Wang., N. Kafidid., C. Keefer., A. Lazaris and C. N. Karatzas. 2002. Advance in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and in vitro embryo production technologies. *Theriogenology*. 57: 275-284.
- Baldassarre, H. and C-N. Karatzas. 2004. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Anim. Reprod. Sci*: 255–266.
- Barboni, B. and M. Mattioli. 1996. Oocyte maturation involves important changes required for activation competence. *Reprod. Domest. Anim*. 31: 589–594.
- Graff, K. J., M. Meintjes, Y. Han, B. C. Reggio, R. S. Denniston, W. Gavin and et al. 2000. Comparing follicle stimulating hormone from two commercial sources for oocyte production from out-of-season dairy goats. *J. Dairy. Sci*. 83: 484–487.
- Izquierdo, D., P. Villamediana and M. T. Paramio. 1999. Effect of culture media on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. *Theriogenology*. 52: 847-861.
- Keskintepe, L., G. M. Darwish., A. T. Kenimer and B. G. Brackett. 1994. Term development of caprin embryos derived from immature oocytes in - vitro. *Theriogenology*. 42:527-535.
- Younis, A. I., K. A. Zuelke., K. M. Harper., M. A. L. Oliveira and B.G Brackett. 1991. *In vitro* fertilization of goat oocytes. *Biol. Reprod*. 44: 1177-1182.